

**FERNANDA CASSANDRI**

**IDENTIFICAÇÃO “IN SITU” DE CÉLULAS DE LANGERHANS, MACRÓFAGOS E  
MOLÉCULAS MHC DE CLASSE II EM PACIENTES INFECTADAS PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO, COM LESÕES DE ALTO E BAIXO GRAU, EM  
CAMPO GRANDE, MS**

**CAMPO GRANDE  
2010**

**FERNANDA CASSANDRI**

**IDENTIFICAÇÃO “IN SITU” DE CÉLULAS DE LANGERHANS, MACRÓFAGOS E  
MOLÉCULAS MHC DE CLASSE II EM PACIENTES INFECTADAS PELO  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO, COM LESÕES DE ALTO E BAIXO GRAU, EM  
CAMPO GRANDE, MS**

Dissertação apresentada como exigência para 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**

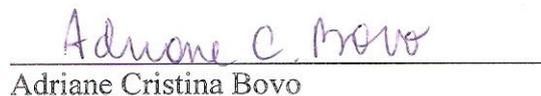


## TERMO DE APROVAÇÃO

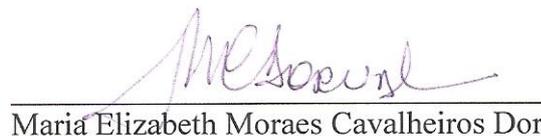
A dissertação intitulada IDENTIFICAÇÃO "IN SITU" DE CÉLULAS DE LANGERHANS, MACRÓFAGOS E MOLÉCULAS MHC DE CLASSE II EM PACIENTES INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO, COM LESÕES DE ALTO E BAIXO GRAU, EM CAMPO GRANDE – MS, apresentada à banca examinadora por FERNANDA CASSANDRI, como exigência para a obtenção 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

  
Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval – UFMS

Campo Grande, 29 de janeiro de 2010.

Agradeço através deste estudo, a oportunidade que me é concedida de amadurecer e evoluir de mãos dadas com o conhecimento.

“Crescer significa abandonar os mais queridos sonhos megalomaniacos da infância. Crescer significa saber que eles não podem ser realizados. Crescer significa adquirir sabedoria e a habilidade para conseguir o que se deseja, dentro dos limites impostos pela realidade – uma realidade que consiste de poderes diminuídos, liberdades restritas e, com as pessoas amadas, conexões imperfeitas”

Judith Viorst

## AGRADECIMENTOS

À querida Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Inês Aparecida Tozetti, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, incentivo, colaboração e amizade, minha eterna admiração e gratidão.

Aos meus pais (Pascoal e Irani) e irmão (José Luiz), por terem sido responsáveis pela minha formação moral e intelectual. Sempre presentes nas minhas dificuldades. Agradeço a Deus, a todo instante, a graça de tê-los como companheiros de jornada.

Às amigas da disciplina de Imunologia: Alda Maria Teixeira Ferreira e Cacilda Tezelli Junqueira Padovani pela amizade e ajuda em todos os momentos que precisei.

À aluna de iniciação científica Flávia Gatto de Almeida e a técnica do Laboratório de Imunologia Miriam Santos Miranda, pelo auxílio na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, meus agradecimentos pela colaboração na análise estatística.

À Prof. Msc. Maria Auxiliadora Gomes Sadin Abdo, pela disposição em sanar as dúvidas histopatológicas.

Às Prof. Dra. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval e Prof. Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro pelas devidas correções e sugestões para o epílogo dos trabalhos.

Às pacientes que voluntariamente participaram da pesquisa, enriquecendo os resultados e permitindo a geração de conhecimento.

Ao Centro de Prevenção ao Câncer, na pessoa da Dra. Ilzia Doraci Lins Scapulatempo, pela contribuição para a realização deste estudo.

Aos colegas de pós-graduação, pelo apoio e incentivo.

A todos os professores e funcionários da Pós-graduação que colaboraram para a minha formação, meus agradecimentos.

À fundação de apoio ao desenvolvimento do ensino, ciência e tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e ao conselho nacional de pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

A infecção persistente por alguns tipos de HPV no trato genital feminino pode causar neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e carcinoma. Sabe-se que, pequenas quantidades de partículas virais são expostas ao sistema imunológico no início da infecção. Investigação "in situ" da resposta imune por Imunohistoquímica pode explicar eventos importantes para resolução da infecção viral. A pesquisa teve por objetivo detectar a presença de células e moléculas da resposta imune em amostras histológicas de colo uterino de pacientes infectadas com o HPV. Foram incluídas 58 amostras de biópsia de colo uterino, sendo, 34 positivas para HPV DNA de alto risco oncogênico e com diagnóstico de NIC I, II, III e 14 negativas para HPV DNA e com diagnóstico histopatológico negativo para lesão intra-epitelial e malignidade (NILM), sendo o restante positivas pelo teste de captura híbrida e com diagnóstico histopatológico NILM. A imunohistoquímica foi realizada com anticorpos monoclonais anti-S100, anti-CD68, anti-HLA-DR e sistema de detecção de LSAB+Sys HRP (Dako), as lâminas foram observadas em aumento de 100X e 400X. A análise por imunohistoquímica mostrou que quanto mais severa a lesão maior a presença de células Langerhans ( $p=0,001$ ) e de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MHC II) ( $p=0,021$ ). Com relação aos macrófagos, não se observou correlação estatística entre a presença destas células e os achados histopatológicos. A correlação entre os diferentes níveis de carga viral e a presença simultânea de células de Langerhans, macrófagos e MHC II foi significativa ( $p=0,022$ ). Houve escassa quantidade de células de Langerhans e macrófagos, bem como da expressão de MHC II, nas amostras NILM, mesmo no grupo que, apesar de não possuir alterações celulares, era positivo para DNA HPV. Os resultados mostraram que nas amostras positivas para o DNA de HPV, mas que não apresentam alterações histopatológicas (NILM) ou apenas eram portadoras de lesão de baixo grau, e nas amostras com baixa carga viral, não estavam ocorrendo os sinais adequados para o início da ativação da resposta imune.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, resposta imune, imunohistoquímica

## ABSTRACT

Persistent infection of female genital tract by some HPV types takes to cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and carcinoma. In begin of infection small amounts of viral particles are exposed to the immune system. Immunohistochemistry investigation about "in situ" immune response can explain important events to resolved viral infection. The research aimed to detect immune cells presence in uterine cervix histological samples from HPV infected patients. We included in this study 58 uterine cervix biopsy samples from 34 positive patients to oncogenic high risk HPV DNA and with CIN I, II, III diagnostic, and 14 negative samples to HPV DNA and with histopathological diagnostic of negative to intraepithelial lesion and malignancy (NILM), the remaining samples were positive by hybrid capture and with NILM diagnostic. The immunohistochemistry were made with monoclonal antibodies anti-S100, anti-CD68, anti-HLA-DR and detection system LSAB+Sys HRP (Dako). The sections were observed in 100X and 400X. Analysis by Immunohistochemistry showed that how severe the injury as greater Langerhans cells ( $p=0.001$ ) and major histocompatibility complex class II molecules (MHC II) ( $p=0.021$ ) presence. About macrophages, there wasn't statistical correlation among cells presence and histopathologic findings. The correlation between the different levels of viral load and the simultaneous presence of Langerhans cells, macrophages and MHC II was significant ( $p=0.022$ ). There was a small quantity of Langerhans cells and macrophages and expression of MHC II in NILM samples; even within the group despite having no cellular changes were positive for HPV DNA. The results showed that in the samples positive for HPV DNA, but have no histopathological changes (NILM) or only low-grade lesion, and samples with low viral load isn't going the adequate stimulus to the beginning of activation immune response.

key words: Human Papillomavirus, immune response, immunohistochemistry

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	10
2.1 HISTÓRICO.....	10
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	11
2.2.1 Fisiopatologia da lesão induzida pelo HPV.....	11
2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	13
2.4 ASPÉCTOS CLÍNICOS.....	17
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 GERAL.....	22
3.2 ESPECÍFICOS.....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 TIPO DA PESQUISA.....	23
4.2 LOCAL DA PESQUISA.....	23
4.3 AMOSTRAS.....	23
4.4 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS.....	25
4.4.1 Material biológico.....	25
4.4.2 Técnica da marcação imunohistoquímica.....	25
4.4.3 Análise quantitativa.....	26
4.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	27
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	27
<b>5 RESULTADOS</b> .....	28
5.1 ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	28
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>APÊNDICE</b> .....	51
<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções pelo Papilomavírus humano (HPV) são amplamente dispersas pelo globo. Os HPV infectam a pele e as mucosas e podem induzir a formação de verrugas e displasias do epitélio genital. A infecção persistente do trato genital feminino por alguns tipos de HPV considerados como de alto risco oncogênico, pode levar às neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) e a carcinomas invasivos. Dados demonstram que o câncer cervical é a segunda causa de morte, por câncer, em mulheres no mundo, e que cerca de 99% dos casos são atribuídos ao HPV.

A infecção é iniciada quando o vírus penetra no hospedeiro por via sexual, através de microtraumatismos no epitélio da mucosa. A progressão da fase de latência para a de expressão ativa depende de três fatores: da permissividade celular, do tipo de vírus e do estado imunológico do hospedeiro.

Sabe-se que a resposta imune é vital para a proteção contra os Papilomavírus. A investigação "in situ" sobre o perfil imunohistoquímico da resposta imune na infecção do trato genital pelo HPV foi recentemente desenvolvida por alguns grupos. Entretanto, os mecanismos exatos que ativam uma resposta imune eficiente contra lesões relacionadas a este vírus, ainda não são conhecidos. Associação significativa entre o número de células imunocompetentes e o grau da NIC foi demonstrada, indicando que a resposta imune local pode ser importante para o desenvolvimento e a progressão do câncer cervical, principalmente em um estágio inicial do processo carcinogênico.

A forte associação entre HPV e o câncer de colo de útero torna relevante a identificação e quantificação "in situ" da presença de células de Langerhans e macrófagos responsáveis pela apresentação do antígeno durante a fase inicial da resposta imune. A avaliação da presença e quantidade de células apresentadoras de antígeno, bem como de sua atividade através da presença do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MHC II) em sua superfície e a correlação com o grau da lesão observada, poderia sugerir a importância desta etapa para o controle da infecção. A definição de tais parâmetros poderá ser útil para o estabelecimento do perfil prognóstico para a resolução e/ou progressão da lesão.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

Em 1867, Virchow descreveu massas com pequenas elevações na superfície, semelhantes à couve-flor, denominando-as “condiloma”, que foram divididos em dois tipos: acuminado, sob a forma de papilas pontiagudas ou grânulos, e plano, na forma úmida. A relação entre as verrugas genitais e as epiteliais é atribuída a Gémy (1893), por meio da similaridade histológica observada (ORIEL, 1971). Vários estudos foram realizados e demonstraram então o caráter contagioso, as vias de transmissão, o período de incubação e a etiologia comum às verrugas vulgares e condilomas (CIUFFO, 1907; GOODMAN; GREENWOOD, 1934).

A ocorrência de verrugas também foi observada por alguns autores em humanos, bovinos, cães e coelhos, relatando-se epiteliotropismo e especificidade de acordo com a espécie (KIDD, 1938; SHOPE; HURST, 1933). Foi demonstrado, também, o desenvolvimento de imunidade e a persistência ou regressão espontânea das lesões (RULISON, 1942). Durante algum tempo, lesões papilomatosas na cérvix uterina foram associadas à gravidez, o que aumentaria a susceptibilidade à inflamação aguda e crônica (SURAN; MEISTER, 1948; WOLFE, 1950). Após algumas observações, concluiu-se, porém que a frequente associação com a gravidez, refletia o fato de que muitas mulheres só se submetiam aos exames ginecológicos já com esta infecção em evolução (MARSH, 1952).

A verdadeira etiologia dos condilomas só foi demonstrada em 1949, por meio da microscopia eletrônica, com a observação de partículas virais em verrugas cutâneas, distribuídas em padrão cristalino (STRAUSS et al., 1949), sendo mais tarde relacionado ao Papiloma humano classificado no grupo Papova (DUNN; OGILVE, 1968; MELNICK, 1962).

Seguiram-se estudos que determinaram o período de latência entre três a doze meses; identificaram o DNA do HPV; a existência de diferentes tipos virais; a demonstração de que os *Papilomavírus* são imunologicamente diferentes dos *Poliomavírus*, constituindo dois gêneros diferentes pertencentes à família Papovaviridae e a sugestão do Papilomavírus como agente etiológico do câncer cervical (GISSMANN; ZUR HAUSEN, 1976; ROWSON; MAHY, 1967; ZUR HAUSEN et al., 1974; ZUR HAUSEN, 1976; 1977).

## 2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

### 2.2.1 Fisiopatologia da lesão induzida pelo HPV

Os Papilomavírus pertencem à família Papovaviridae e formam partículas icosaédricas, não envelopadas, de diâmetro aproximado de 55nm, contendo uma dupla fita circular de DNA, com cerca de 7500 a 8000 pares de bases (HOWLEY, 2007; ZUR HAUSEN, 1982). O genoma do HPV, com cerca de 9 a 10 genes, é organizado em regiões gênicas, onde cerca de sete a oito genes estão na região conhecida como precoce ou *early*, e dois na região conhecida como tardia ou *late*. Os genes da região precoce 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 (VILLA, 1998).

A zona de transformação cervical é um anel de tecido com alta suscetibilidade para a carcinogênese por HPV. Os vírus penetram na mucosa cervical através de microlesões do epitélio e se introduzem nas células basais. Essas células tornam-se infectadas e o DNA do HPV se estabelece no núcleo dessas células, mas de forma epissomal, ou seja, não integrado ao genoma do hospedeiro. Na camada basal da mucosa são expressos os genes precoces, com baixo número de cópias virais, e à medida que progride a maturação celular, a quantidade de cópias virais destes genes aumenta. Nas camadas superficiais da pele expressam-se os genes tardios formando os *virions* infectantes (STANLEY, 1998). Deste modo, na camada basal da epiderme existe replicação mínima do HPV e como não ocorre lise celular e nem inflamação local, não há estímulo do sistema imune mediado pelas células apresentadoras localizadas preferencialmente na porção basal do epitélio. O atraso no reconhecimento do HPV é também responsável pela natureza recalcitrante das lesões cervicais (COX; SCHIFFMAN; SOLOMON, 2003; PEREYRA; PARELLADA; CHUERY, 2000; RIETHMULLER, 2006; RIETHMULLER; SCHAAL; MOUGIN, 2002).

Na persistência da infecção e na carcinogênese são importantes as diferentes características globais biológicas dos HPV, como as variantes do HPV oncogênico, a influência de sua carga viral e o grau de integração viral no DNA das células. Para

que o câncer cervical se manifeste, é necessário o aparecimento sequencial de múltiplas e progressivas alterações genéticas (GÓMEZ; CASTILLO, 2004).

Atualmente são conhecidos cerca de 230 tipos de HPV, sendo que os tipos 6,11, 42, 43 e 44 são os mais comumente associados a lesões benignas, condiloma acuminado e verrugas, com raros casos de evolução para malignidade e considerados de baixo risco oncogênico. Os tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 66, classificados como de alto risco oncogênico, estão associados à lesão de alto grau e câncer cervical (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Em material de biópsia de câncer cervical, em 1983 e depois em 1984, foi identificada pela primeira vez, a presença dos tipos 16 e 18 do HPV. Pouco tempo depois foi demonstrado que o seu papel como causa de câncer cervical estava relacionado com a expressão dos oncogênes virais E6 e E7. Entre os anos de 1992 e 1995 apareceram resultados de diferentes estudos epidemiológicos de casos e controles, indicando que infecções persistentes por HPV oncogênicos é um fator de risco mais significativo e necessário para o aparecimento de câncer cervical (GÓMEZ; CASTILLO, 2004; ZUR HAUSEN, 2002).

Ensaios *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que os genes *E6* e *E7* dos tipos de alto risco oncogênico, são capazes de imortalizar e transformar as células epiteliais. Nas células imortalizadas, *E7* parece ser o oncogene capaz de provocar instabilidade cromossômica e aneuploidias. Os queratinócitos transformados mantêm um fenótipo no qual as células suprem seu crescimento, adquirem própria sinalização de crescimento independente de sinais externos, não fazem a apoptose, desenvolvem um ilimitado potencial de proliferação, gerando sua própria rede de vasos sanguíneos, ou seja, são capazes de angiogênese. Também se observam, nas células transformadas, mecanismos que permitem que estas se separem da massa principal, ocasionando metástases (HANAHAN; WINBERG, 2000).

Experimentos demonstram que os genes virais *E5*, *E6* e *E7* se colocam inicialmente de forma episomal, ou seja, extracromossomal posteriormente se integrando ao DNA celular. A proteína E6 ativa a telomerase, com bloqueio da proteína pró-apoptótica – BAK, inibindo a apoptose e como consequência, evitando a instabilidade cromossômica. Esta mesma proteína também mostra um papel importante na transformação celular, graças a sua capacidade de complexar-se com a proteína p53, que protege a integridade da célula. Alguns autores defendem que a E6 estimula a degradação da p53, diminuindo sua concentração, bloqueando nessas

células a parada do ciclo celular em G1 e permitindo o prosseguimento da divisão celular, mesmo com o DNA danificado. A ligação E6-p53 impede a ação supressora de tumor da p53, e se a pRb, outra proteína supressora de tumor, não compensar, a transformação pode de fato ocorrer (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002). Já a proteína E7, acredita-se que interage com a pRb, liberando o fator de transcrição E2F. A pRb perderia, então, a função de regular a transcrição G1/S do ciclo celular (NGUYEN et al., 2005).

### 2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Sabe-se que a resposta imune é vital para a proteção contra os Papilomavírus. A investigação “in situ” sobre o perfil imunohistoquímico da resposta imune na infecção do trato genital pelo HPV foi recentemente desenvolvida por alguns grupos (JIMENEZ-FLORES et al., 2006; MONNIER-BENOIT et al., 2006; VILLADA et al., 2004). Entretanto, o que se observa são análises isoladas de alguns tipos celulares, principalmente linfócitos T CD4+ e CD8+.

As células de Langerhans estão presentes na maioria dos órgãos não linfóides, incluindo o epitélio (epiderme e mucosa), e apresentam morfologia diversa de acordo com seu estágio de maturação. As do *tipo 1* caracterizam-se por apresentar forma irregular, estrelada, exibindo numerosos prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados que partem do corpo celular seguindo direções variadas; por outro lado, as do *tipo 2* apresentam-se com morfologia arredondada e prolongamentos citoplasmáticos curtos. Os extensivos prolongamentos citoplasmáticos das células de Langerhans, requeridos e adquiridos morfologicamente em fase mais tardia, durante os processos de ativação e diferenciação dessas, são responsáveis pela sua capacidade de interação celular. Encontram-se distribuídas entre os queratinócitos basais e supra-basais do epitélio escamoso da epiderme e da mucosa, perfazendo cerca de 3% a 8% do total desse epitélio (LINS et al., 2003).

Quando um antígeno penetra no epitélio mucoso ele permeia a camada epitelial, onde se encontram as células de Langerhans residentes que o captam e o endocitam em vesículas, recebendo ação de citocinas. Perdendo sua aderência, estas células arredondam-se e migram para vasos linfáticos dos linfonodos. Assim, a partir do momento em que essas células se tornam residentes nos linfonodos, são

potentes apresentadoras de antígenos. Os linfócitos T virgens que circulam através dos linfonodos, ao encontrarem essas células, dão início à resposta imune (LINS et al., 2003).

Os macrófagos são as principais células fagocitárias e podem internalizar partículas de forma mais rápida e eficiente que outras células. Na fagocitose de partículas externas, o macrófago é capaz de realizar a degradação intracelular e a apresentação de fragmentos de peptídeos na sua superfície celular, associado ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) I ou II, atuando como célula apresentadora de antígenos (APC) (WU et al., 2004). Os antígenos associados ao MHC classe I são partículas intracelulares e reconhecidos pelos receptores das células T CD8+ citotóxicas; antígenos ligados ao MHC classe II originam-se de partículas extracelulares e são reconhecidos pelo receptor das células T CD4+ auxiliares. Essa interação resulta na ativação tanto do linfócito quanto da APC e, com isso, o início de uma rápida resposta imune adaptativa. Células de Langerhans também são potentes células fagocitárias e são consideradas as principais APCs (ALBERT; SAUTER; BHARDWAJ, 1998).

As células apresentadoras de antígenos especializadas, como as células de Langerhans (S100+) e os macrófagos (CD68+), capturam antígenos protéicos extracelulares, os interiorizam e processam, além de exibirem peptídeos associados ao MHC II (HLA-DR). As células de Langerhans são as células apresentadoras mais eficientes para iniciar resposta primária por ativação de linfócitos T não expostos a antígenos, e os macrófagos apresentam antígenos a linfócitos T auxiliares diferenciados na fase efetora da imunidade celular e nas respostas imunes humorais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro, embora limitados, necessitam do reconhecimento do antígeno. Linfócitos T CD4+ reconhecem o antígeno apresentado por células Langerhans ou macrófagos, associados às moléculas do MHC II (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Proteínas do HPV, tais como E5 e E7, são capazes de inibir promotores que regulam a expressão de TAP-1 (Peptídeo Transportador Associado ao Processamento de Antígenos -1) e LMP-2 (Proteínas Latentes de Membrana -2). Ambas são proteínas envolvidas no transporte do complexo peptídeo antigênico ligado ao MHC I, à superfície celular, inibindo a apresentação do antígeno. A habilidade de E7 regular esses promotores, pode estar

relacionada com sua atividade oncogênica (GEORGOPOULOS; PROFFITT; BLAIR, 2000).

A proteína E5 é pequena, altamente hidrofóbica e localizada, pelo menos em cultura de células, nos compartimentos internos do retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Essa molécula parece interferir no transporte de proteínas para a superfície celular, incluindo o complexo MHC II ligado ao antígeno (DIMAIO; MATTON, 2001; FACCINI et al., 1996; PENNIE et al., 1993; SCHAPIRO et al., 2000).

Uma variação quantitativa ou qualitativa das APC poderia determinar alteração na resposta imunológica, independente da contagem de linfócitos T CD4+ (LEVI et al., 2005; LINS et al., 2003; UCHIMURA et al., 2005; UCHIMURA et al., 2004a). Evidências de depressão da resposta imunológica, com diminuição no número de células de Langerhans, têm sido associada à progressão das lesões induzidas pelo HPV, pois o epitélio glandular da área que sofre metaplasia, área suscetível à infecção pelo HPV, pode inibir a migração destas células, tornando essa área como de risco para o desenvolvimento de neoplasia, não só pelo fato de ser local de proliferação celular, mas também pela diminuição do fluxo das APC (UCHIMURA et al., 2005; UCHIMURA et al., 2004b). Palaoro, Rocher e Blanco (2002) observaram que o número de células de Langerhans decrescia à medida que aumentava o grau da lesão histopatológica, o que levou a acreditar que a iniciação e a progressão de lesões determinadas pelo HPV, estivessem associadas com as alterações na presença e quantidade destas células no epitélio escamoso da mucosa da zona de transformação do colo uterino (GIANNINI et al., 2002).

Vários estudos na literatura suportam a forte associação existente entre a oncogênese e progressão neoplásica relacionada ao HPV e ao sistema imunológico, entretanto, os mecanismos exatos que ativam uma resposta imune eficiente para a eliminação do HPV ainda não são conhecidos (GIANNINI et al., 2002; LEVI et al., 2005; LINS et al., 2003). Associação significativa entre o número de células imunocompetentes e o grau da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) foi demonstrada. Este achado indicou que a resposta imune local pode ser importante para o desenvolvimento e a progressão do câncer cervical, principalmente em um estágio inicial do processo carcinogênico (TAKEHARA, 1996). A maior incidência de infecções pelo HPV em indivíduos imunossuprimidos, também ilustra a importância

do mecanismo de resposta imune mediada por células na resolução e controle das infecções (CHIRGWIN et al., 1995; FENNEMA et al., 1995).

Os linfócitos T são as principais células no sistema imune adaptativo e subdividem-se em linfócitos T CD4+ (LT CD4+) ou helper e linfócitos T CD8+ (LT CD8+) ou citotóxico. A ativação do LT CD4+ resulta na secreção de uma variedade de citocinas. O padrão de expressão destas citocinas define dois subtipos de LT CD4+, conhecidos como T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). Os linfócitos Th1 secretam citocinas responsáveis pela ativação da imunidade mediada por células, tais como macrófagos, células Natural Killer e LT CD8+, gerando a resposta imune eficiente à eliminação de patógenos intracelulares. As células Th2 secretam citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, promovendo a imunidade humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O mecanismo que dá início ao reconhecimento espontâneo do vírus pelo organismo não é conhecido. Em resposta ao reconhecimento do HPV, macrófagos e monócitos liberam citocinas, tais como os interferons - alfa, beta e gama, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e outras. Tais citocinas também atuam como quimioatrativos e deste modo, monócitos ativados chegam ao local da infecção. A apresentação de antígenos ativa células T helper e citotóxicas, que se multiplicam preparando-se para eliminação viral (COX; SCHIFFMAN; SOLOMON, 2003; PEREYRA; PARELLADA; CHUERY, 2000).

O exame histológico das lesões em regressão e das persistentes, provenientes da infecção pelo HPV, revela diferentes populações celulares. Nas verrugas genitais em regressão observou-se um infiltrado de LT CD4+, LT CD8+ e macrófagos no estroma e epitélio, enquanto que em lesões persistentes, ocorreu escassa presença de células de defesa no sítio da infecção, com poucos LT CD8+ intra-epiteliais e células mononucleares no estroma (STANLEY, 1998).

Dentro da avaliação da resposta imune local, os mecanismos iniciais da resposta imune, como o processo de apresentação do antígeno e seus elementos participantes, células e moléculas de superfície, são essenciais à ativação e manutenção de uma resposta eficiente, que contribua para a eliminação do vírus ou pelo menos para o controle de sua replicação.

## 2.4 ASPECTOS CLÍNICOS

No trato anogenital, o vírus 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 encontra-se aparentemente normal (MCCANCE, 1994). A infecção produtiva pode ser: a) clínica - condiloma acuminado e carcinoma invasivo ou b) subclínica - neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de baixo e alto grau. No trato genital feminino, as lesões intra-epiteliais ocorrem quase totalmente na zona de transformação, área entre o epitélio maduro do exocérvice e o epitélio colunar do canal endocervical. Nessa área, a célula alvo da infecção pelo HPV encontra-se na forma metaplásica imatura e o epitélio é hormonalmente controlado, surgindo na puberdade e reduzindo ou desaparecendo na menopausa. Acredita-se que, em decorrência de abrasão ou microlesões da pele e mucosa, as infecções ocorram inicialmente nas camadas basais da epiderme (MCCANCE, 1994).

O câncer cervical é, geralmente, de evolução lenta e precedido por lesões pré-cancerosas do colo que são caracterizadas, histologicamente, por uma desorganização da arquitetura do epitélio malpighiano, por atipias nucleares e por figuras de mitoses anormais. A maioria das transformações epiteliais iniciais do colo, desenvolve-se ao nível da zona de junção dos epitélios malpighiano e cilíndrico. Essa zona, chamada de zona de transformação na nomenclatura colposcópica se constitui numa zona de competição entre os dois epitélios (GOMPEL; KOSS, 1997).

As lesões pré-cancerosas foram inicialmente descritas como carcinomas *in situ*; e somente mais tarde organizou-se a classificação desse grupo de lesões. Em 1943, Papanicolau propôs uma classificação citológica que distinguia cinco classes de esfregaços. Ainda hoje esta classificação é utilizada por certos laboratórios, devendo ser substituída gradativamente, em virtude de equívocos quanto à interpretação dos resultados (GOMPEL; KOSS, 1997).

As classificações mais usadas são a de Richart, que agrupa estas lesões em Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC), para as análises histopatológicas e a de Bethesda para as avaliações citológicas, agrupando as lesões em Lesões Intra-epiteliais Malpighianas (LIM) (Quadro 1) (GOMPEL; KOSS, 1997).

Quadro 1 - Classificação de Richart e Bethesda.

Richart		Bethesda	
Denominação	Significado	Denominação	Significado
Normal	Sem alterações	Normal	Sem alterações
NIC I	Neoplasia Intra-epitelial Cervical de baixo grau	LIM de baixo grau	Lesão Intra-epitelial Malpighiana de baixo grau
NIC II	Neoplasia Intra-epitelial Cervical de alto grau	LIM de alto grau	Lesão Intra-epitelial Malpighiana de alto grau
NIC III			

Os graus I, II e III da NIC se referem à altura do epitélio implicado nas anomalias. Uma NIC pode regredir ou persistir durante longos anos antes de se tornar uma lesão invasiva. O risco de progressão é ligado ao grau histológico. De um a 2/3 das lesões intra-epiteliais de alto grau ou NIC III evoluirão para lesões cancerosas em um período de poucos anos se não tratadas (HOLLOWATY et al., 1999; GÓMEZ; CASTILLO, 2004).

A evolução das NIC de baixo grau, que incluem o condiloma e NIC I, continua imprevisível no aspecto morfológico. Essas lesões regredem amiúde e progridem apenas em 10 a 15% dos casos (OSTOR, 1993).

## 2.5 EPIDEMIOLOGIA

A papilomavírose é uma doença de contato sexual, podendo causar de verrugas benignas a carcinoma invasivo. Alguns tipos de HPV estão diretamente envolvidos com processos malignos na cérvix uterina, dos quais mais de 99% dos casos são atribuídos à infecção pelo HPV oncogênico (BOSCH et al., 1995). O controle e a prevenção do câncer estão entre os mais importantes desafios da saúde pública que fascinam o 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).

No norte da África, 92% dos casos de câncer invasivo foram atribuídos ao HPV, sendo que os tipos mais comuns nesses casos foram o 16 e o 18 (CHAOUKI et al., 1998). Na Alemanha, o DNA viral do HPV16 foi detectado em 70% dos casos e no Reino Unido, em 80% (MCCANCE; CAMPION; CLARKSON, 1985; WAGNER et al., 1984). Nos Estados Unidos, o HPV16 e o HPV18 foram encontrados em 55% das lesões escamosas e 70% das doenças malignas da cérvix (MCCANCE, 1994).

No Brasil, Eluf-Neto et al. (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 recente realizado em Campo Grande, MS, detectou predomínio dos tipos 6/11, 66 e 45 em pacientes infectadas pelo HPV encaminhadas para exame de rotina ou com suspeita de infecção (TOZETTI et al., 2006).

Para o ano de 2008 a estimativa de câncer do colo do útero para o Brasil foi de 18.680 novos casos, com risco estimado de 19 destes casos a cada 100 mil mulheres. O câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (22/100.000). Nas regiões Sul (24/100.000), Centro-Oeste (19/100.000) e Nordeste (18/100.000) os novos casos ocupam a segunda posição e no Sudeste (18/100.000) a quarta posição, com estimativa de 9.840 mil novos casos para o ano de 2008, excluindo os tumores de pele não melanoma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2009).

Estudos epidemiológicos mostraram que a detecção do HPV está associada a um risco 10 vezes maior de NIC (KOUTSKY et al., 1992). A progressão da infecção, por sua vez, está associada à persistência do HPV, presença de tipos de alto risco, alta carga viral e integração do DNA viral. 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).

Estudo comparando pacientes soropositivas e negativas para o HIV, verificou que as lesões intra-epiteliais cervicais eram significativamente mais frequentes e agressivas nas soropositivas (38%) que nas soronegativas (12%) ( $p < 0,001$ ) (SONCINI; CONDEMI, 2003). Outros estudos que evidenciaram associação entre o grau da lesão intra-epitelial cervical e a imunossupressão induzida pelo HIV, sugerindo que quanto menor for a contagem de linfócitos T CD4+, maior o risco de

ocorrer lesão intra-epitelial de alto grau (DUERR et al., 2006; PALEFSKY, 2006; SONCINI; CODEMI, 2003).

## 2.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A maioria das alterações celulares cervicais induzidas por HPV são transitórias e 90% sofrem regressão espontânea dentro de 12 a 36 meses. Somente uma pequena proporção das lesões cervicais leves e moderadas evolui para câncer invasivo; entretanto, o risco de progressão de uma anormalidade celular cervical severa até câncer invasivo é de pelo menos 12% (BURD, 2003).

Segundo literatura do Conselho Regional de Medicina (2006), a prevenção do HPV consiste no uso de preservativo, por diminuir a possibilidade de transmissão por contato sexual; e na utilização de vacinas. A prevenção primária do câncer de colo uterino pode ser alcançada através da prevenção e do controle da infecção genital pelo HPV. Estratégias de promoção à saúde no sentido de mudar o comportamento sexual, com enfoque nas doenças sexualmente transmissíveis, podem ser efetivas na prevenção desta infecção viral (FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001).

Segundo Burd (2003), fatores como idade da paciente, desejo de engravidar, saúde geral, condição imunológica, características do tumor, envolvimento de linfonodos, e preferência da paciente determinam o curso do tratamento.

No tratamento clínico são usados agentes cáusticos, que produzem destruição tecidual. O mais usado é o ácido tricloroacético (ATA) (50 a 80%) sobre a lesão, porém tem limitações em pele queratinizada, onde a aplicação provoca ardor intenso (BAKER; TYRING, 1997).

Agentes imunomoduladores tais como Imiquimod tem sido utilizados para tratar doenças causadas pelo HPV, como condiloma acuminado e lesão intra-epitelial cervical. Este medicamento é estimulador da resposta imunológica, aumentando a produção local de IFN alfa, beta e gama e do fator de necrose tumoral alfa que provocam a melhoria da imunidade local e a indução da imunidade celular. A aplicação diária da droga a 2% ou 5%, sob a forma de creme ou gel, durante três a quatro semanas, é segura e efetiva erradicando os condilomas em 50% dos casos (SYED et al., 2000).

No que se refere a vacinas, dois tipos principais estão sendo desenvolvidos: a) vacinas profiláticas (ou preventivas), que protegem o hospedeiro de adquirir a infecção pelo HPV e conseqüentemente de desenvolver diversas doenças associadas a este vírus e b) vacinas terapêuticas (curativas), que induziriam a regressão de lesões pré-malignas ou do câncer cervical avançado (FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001).

Segundo Stern (2004), as estratégias profiláticas incluem a utilização de partículas semelhantes a vírus (VLPs - virus-like particles), compostas pela proteína L1 do capsídeo viral, as quais induziriam a produção de anticorpos neutralizantes, e abordagens terapêuticas, utilizando produtos oncogênicos virais *E6* e/ou *E7*, visando à produção de células T específicas. Estudo recente de Villa et al. (2006), demonstrou que a proteína L1 do capsídeo viral do HPV, quando expressa em leveduras, forma partículas semelhantes ao vírus (VLPs), não infecciosas, as quais apresentam semelhanças com virions nativos. Estas partículas são estruturas altamente imunogênicas, não replicantes, que mimetizam o HPV em morfologia e imunogenicidade. São geralmente bem toleradas e induzem respostas neutralizantes contra o HPV.

O entendimento do genoma do HPV permitiu o desenvolvimento e a utilização, inclusive no Brasil, de duas vacinas profiláticas capazes de proteger as mulheres vacinadas contra a infecção persistente por HPV e a neoplasia intra-epitelial cervical, com elevada eficácia. As vacinas produzidas pela Merck (Gardasil) e pela GlaxoSmithKline (Cervarix) são direcionadas contra os tipos de HPV 16 e 18. A vacina Gardasil® também é direcionada aos tipos de HPV 6 e 11, responsáveis por mais de 80% dos casos de verrugas genitais. Estas vacinas são altamente imunogênicas e apresentam excelente perfil de segurança (SCHMIEDESKAMP; KOCKLER, 2006; SPECK; TYRING, 2006). A avaliação do impacto da utilização da vacina quadrivalente Gardasil® na doença clínica relacionada ao HPV em adolescentes e mulheres adultas jovens, está sendo efetuada através de estudos clínicos realizados no mundo todo com mais de 25.000 pacientes (VILLA et al., 2006).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a ativação da resposta imunológica local em amostras de cérvix uterina, com diagnósticos de lesão intra-epitelial de baixo e alto grau ou negativa para lesão intra-epitelial e malignidade (NILM), infectadas ou não pelo HPV de alto risco oncogênico.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- a) analisar a associação entre a presença e quantidade de células de Langerhans (S100), macrófagos (CD68) e moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC II - HLA-DR) com o grau da lesão intra-epitelial observada;
- b) analisar a associação entre a presença e quantidade de células de Langerhans (S100), macrófagos (CD68) e MHC II (HLA-DR) com a carga viral atribuída à amostra; e
- c) comparar com o perfil celular e molecular de ativação da resposta imune presente em pacientes NILM e negativas para DNA de HPV.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DA PESQUISA

Foi realizado um estudo de natureza quantitativa experimental de caráter transversal.

### 4.2 LOCAL DA PESQUISA

As amostras foram coletadas durante o período de 2000 a 2002, no Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande, MS, laboratório de referência para o Estado e credenciado ao Sistema Único de Saúde. Quanto à estrutura física necessária à execução da parte experimental foram utilizados: o Laboratório de Histologia do Departamento de Morfofisiologia, o Laboratório de Imunologia Básica e o equipamento de Morfometria e fotodocumentação do Laboratório de Patologia, ambos do Departamento de Patologia, todos integrantes do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS).

### 4.3 AMOSTRAS

Foram utilizadas no estudo 58 amostras 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). Tais amostras, incluídas em parafina, obtidas da cérvix uterina, foram aleatoriamente selecionadas de pacientes com idade entre 18 e 57 anos.

Dentre as 58 amostras incluídas nesse estudo, 34 foram selecionadas segundo os seguintes critérios:

- a) positividade pelo teste de captura híbrida, para HPV de alto risco oncogênico;
- e
- b) constatação por exame histopatológico da presença de neoplasia intra-epitelial cervical de alto e baixo grau.

As 24 amostras restantes foram obtidas de pacientes com diagnóstico histopatológico NILM, sendo que 14 foram provenientes de pacientes negativas para DNA de HPV e o restante, positivas pelo teste de captura híbrida (Tabela 1).

Tabela 1 – Amostras segundo achados histológicos, Campo Grande – 2009 (n=58)

<b>Diagnóstico</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
NILM HPV DNA negativo	14	24,1
NILM HPV DNA positivo	10	17,2
NIC I	10	17,2
NIC II	09	15,5
NIC III	07	12,2
Carcinoma	08	13,8
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>100</b>

NILM: negativo para lesão intra-epitelial e malignidade;

NIC: neoplasia intra-epitelial cervical.

Para uma melhor análise da resposta imunológica nos diferentes estágios da lesão, consideramos em separado as amostras NIC III e carcinoma.

A carga viral, quantificada pelo teste de captura híbrida, foi classificada de acordo com Lorincz et al. (2002) em baixa, moderada, moderadamente alta e alta, correspondendo respectivamente, a 0,1 a <10, 10 a <100, 100 a <1000 e  $\geq$  1000RLU/PCB (Tabela 2). Os dados relativos à carga viral e aos achados histopatológicos são provenientes de estudos anteriores (TOZETTI, 2006).

Tabela 2 – Amostras segundo os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande – 2009 (n=58)

<b>Classificação</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
Negativa	14	24,1
Baixa	08	13,8
Moderada	07	12,1
Moderadamente alta	17	29,3
Alta	12	20,7
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>100</b>

Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta:  $\geq$  1000RLU/PCB

## 4.4 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

### 4.4.1 Material biológico

O estudo utilizou dados secundários referentes à pacientes encaminhadas ao Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande, MS para exames de rotinas ou por suspeita clínica de infecção. Tais amostras foram coletadas 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 Intracervical de Alto e Baixo Grau”.

### 4.4.2 Técnica da marcação imunohistoquímica

Os blocos de parafina com o material processado histologicamente, foram resfriados em congelador e cortados em micrótomo rotativo. Desta maneira foram obtidos cortes histológicos de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de espessura, utilizando navalhas próprias para este fim. As fitas de parafina obtidas no processo de corte pela microtomia foram cuidadosamente colocadas em banho-maria a 37°C e depositadas em lâminas previamente tratadas com silano. Em seguida as lâminas foram incubadas a 60°C por 24 horas para melhor adesão do tecido e 30 minutos no xilol à temperatura ambiente para desparafinização. Foi realizada então, uma sequência de banhos de álcool absoluto até 80% para hidratação. Posteriormente ocorreu a reação de imunohistoquímica para detecção dos marcadores S100 de células Langerhans, CD68 de macrófagos e HLA-DR de MHC II utilizando a recuperação antigênica por calor úmido, descrita por Santos et al. (1999).

Em panela de pressão as lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM pH 6,0 e mantidas por 2:30 minutos sob pressão forte. Após as lâminas resfriarem, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena por incubação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% por 10 minutos em 2 etapas. Posteriormente as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e colocadas em cuba com tampão fosfato salino (PBS), por 10 minutos em 2 etapas. Após secas, em lâminas distintas, foram aplicados sobre os cortes, os anticorpos primários monoclonais murinos anti-S100 (ZYMED, Ref. 18-0046), anti-CD68 clone KP1 (DAKO, Ref. M0814) e anti-HLA-DR cadeia alfa clone tal.1B5 (DAKO, Ref. M0746) previamente diluídos em PBS. Em seguida as mesmas

foram levadas para incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora e posteriormente a 8°C por 12 horas. Cortes de tonsila humana foram utilizados como controle positivo, seguindo o procedimento acima descrito de aplicação dos anticorpos primários. Para o negativo utilizou-se a aplicação somente de solução tampão.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e incubadas novamente em PBS por 5 minutos, e posteriormente secas para aplicação do anticorpo secundário, sistema de detecção LSAB + System-HRP (DAKO, Ref. K0690) marcado com estreptoavidina. Em câmara úmida, os cortes foram novamente incubados a 37°C, por 40 minutos e então, seguiu-se nova etapa de lavagem e incubação em PBS. Sobre os cortes secos foi adicionado o complexo biotina-estreptoavidina e as lâminas levadas para nova incubação a 37°C, por 40 minutos, seguido de lavagem e posterior incubação em PBS com solução reativa DAB cromógeno com diaminobenzidina (DAB) (DAKO, Ref. K 3468) (Diaminobenzidina 60mg%), a 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, os cortes foram lavados e incubados em água destilada por mais 5 minutos para interromper a reação. As lâminas foram submetidas à contra-coloração com Hematoxilina por 10 segundos.

Finalizando o processo, as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e levadas a uma sequência de banhos de: etanol 50% 1 etapa; 95% 1 etapa; 100% 3 etapas, finalizando com 3 etapas de xilol. Posicionando as lâminas em uma bandeja, foi aplicado o Entelan e os cortes cobertos com lamínulas. As lâminas foram observadas em microscopia óptica de campo claro em aumento de 100X e 400X e a positividade caracterizada pela presença de células apresentando coloração acastanhada na membrana citoplasmática. Para complementação e documentação as mesmas foram observadas através do Sistema de Captura e Análise de Imagem e de Morfometria (Leika, sist. Las DFC 420).

#### 4.4.3 Análise quantitativa

A leitura foi realizada por dois observadores, em objetiva de 10X, com confirmação em 40X e padronizando a observação de 10 campos aleatórios, para quantificação subjetiva de acordo com o *score* 0, 1, 2 e 3, para ausência, presença discreta, moderada e em grande quantidade, respectivamente.

#### 4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram organizados em formulário construído especificamente para fins da presente pesquisa e analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS 10.0 através do teste do  $\chi^2$ .

#### 4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho é parte integrante do projeto “Identificação *in situ* de células dendríticas, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células NK em lesões de alto e baixo grau em pacientes HPV infectadas” sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Inês Aparecida Tozetti. O referido projeto e o presente trabalho foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética da UFMS, protocolo 975 (Anexo B), protocolo 1355 (Anexo C) respectivamente.

Considerando tratar-se de coleta de dados secundários, foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram analisadas 58 amostras de pacientes com idade entre 18 a 57 anos (média=27,7). Nas figuras 1, 2 e 3 pode-se observar a distribuição da presença de células de Langerhans, macrófagos e MHC II respectivamente, entre os diferentes achados histopatológicos.

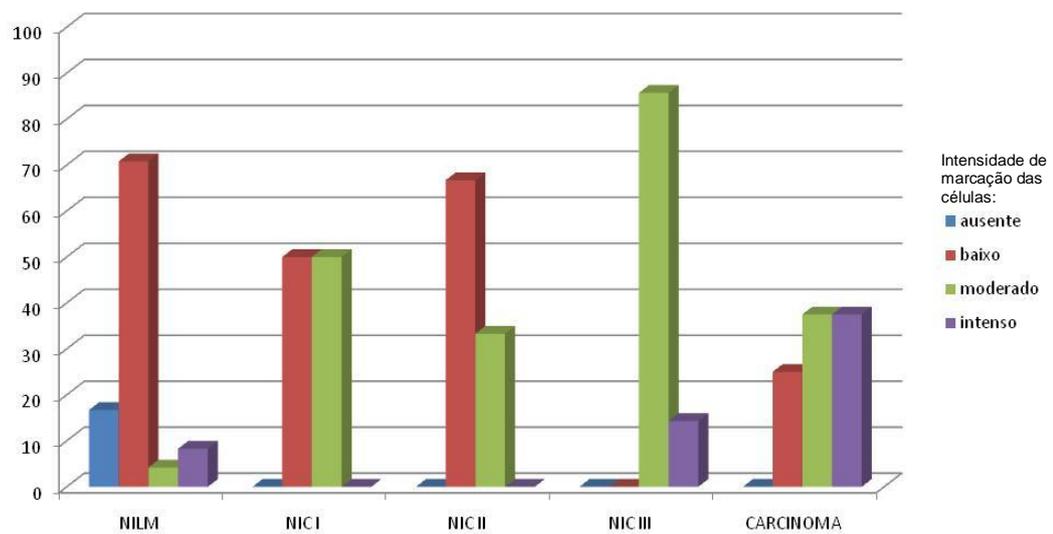


Figura 1 – Percentual das amostras segundo a distribuição das células de Langerhans entre os achados histopatológicos, Campo Grande - 2009 (n=58).  $p=0,001$ . NILM: negativo para lesão intra-epitelial e malignidade; NIC: neoplasia intra-epitelial cervical.

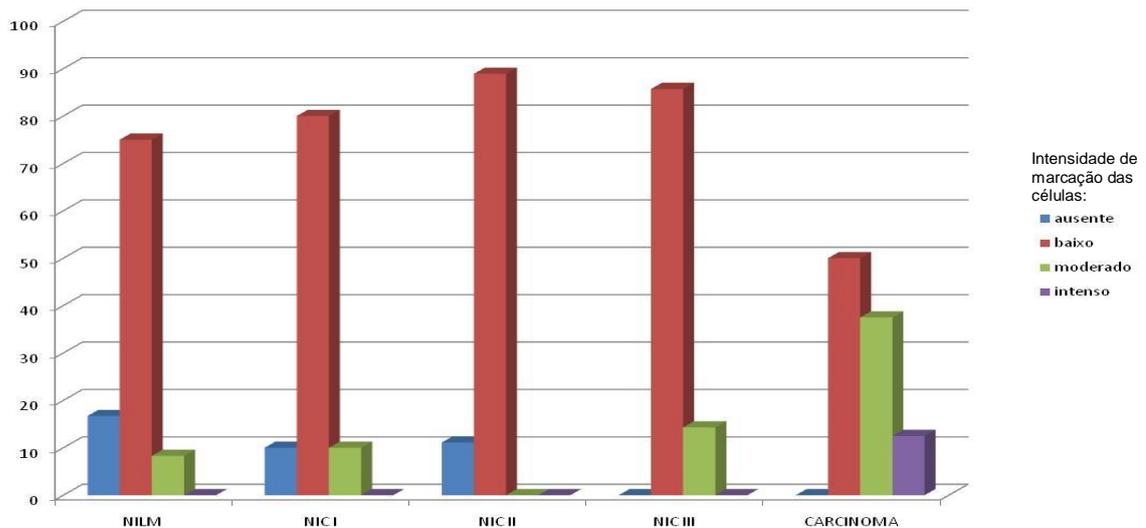


Figura 2 – Percentual das amostras segundo a distribuição dos macrófagos entre os achados histopatológicos, Campo Grande - 2009 (n=58).  $p>0,05$ . NILM: negativo para lesão intra-epitelial e malignidade; NIC: neoplasia intra-epitelial cervical.

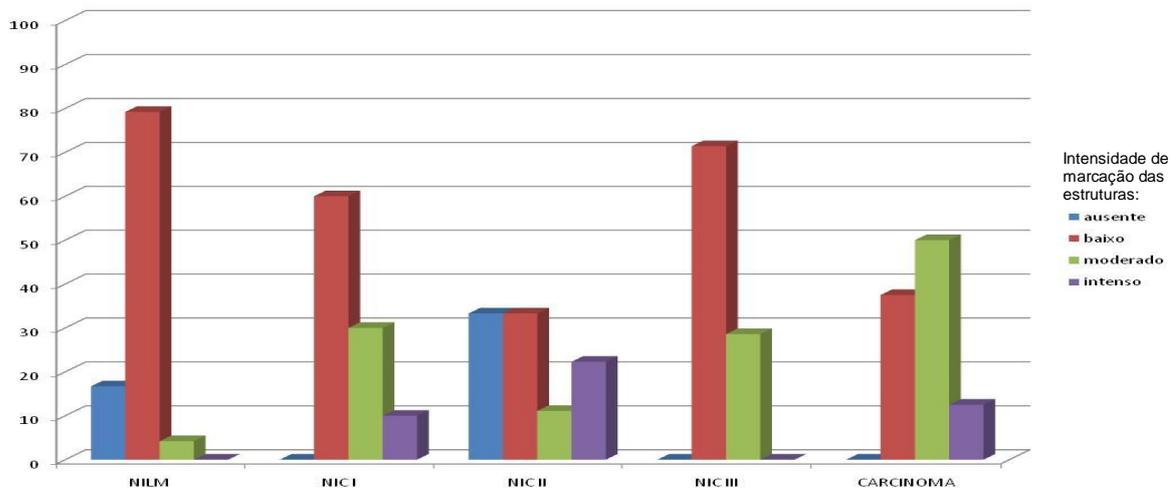


Figura 3 – Percentual das amostras segundo a distribuição de MHC II entre os achados histopatológicos, Campo Grande - 2009 (n=58).  $p=0,021$ . NILM: negativo para lesão intra-epitelial e malignidade; NIC: neoplasia intra-epitelial cervical.

Houve correlação significativa entre a presença de macrófagos e MHC II nas lesões de alto grau ( $p=0,048$ ).

A distribuição da presença de células de Langerhans, macrófagos e MHC II, entre os diferentes níveis de carga viral pode ser observada nas figuras 4, 5 e 6 respectivamente.

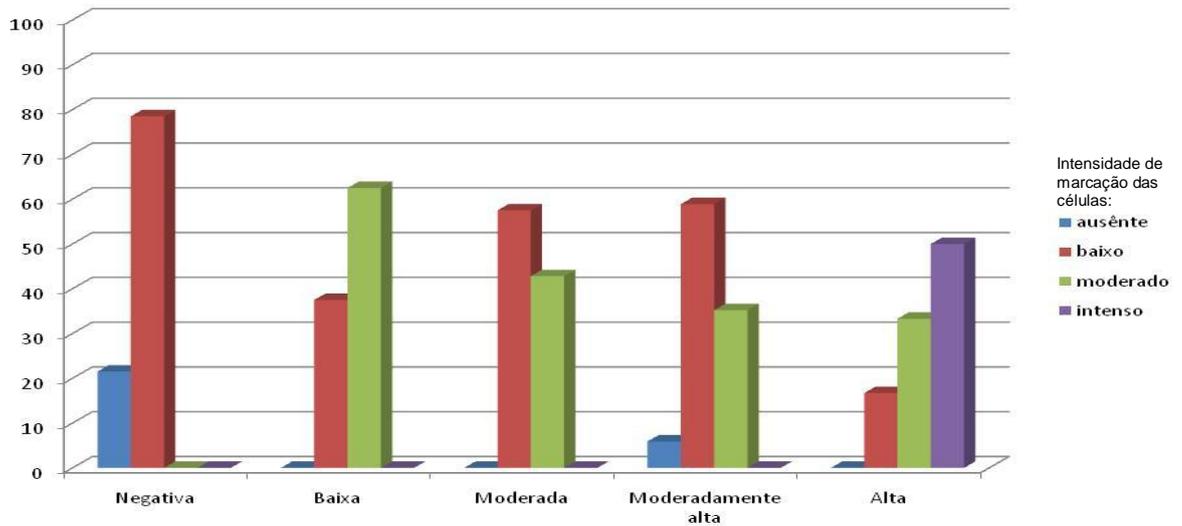


Figura 4 – Percentual das amostras segundo a distribuição das células de Langerhans entre os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande - 2009 (n=58).  $p=0,05$ . Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta:  $\geq$  1000RLU/PCB

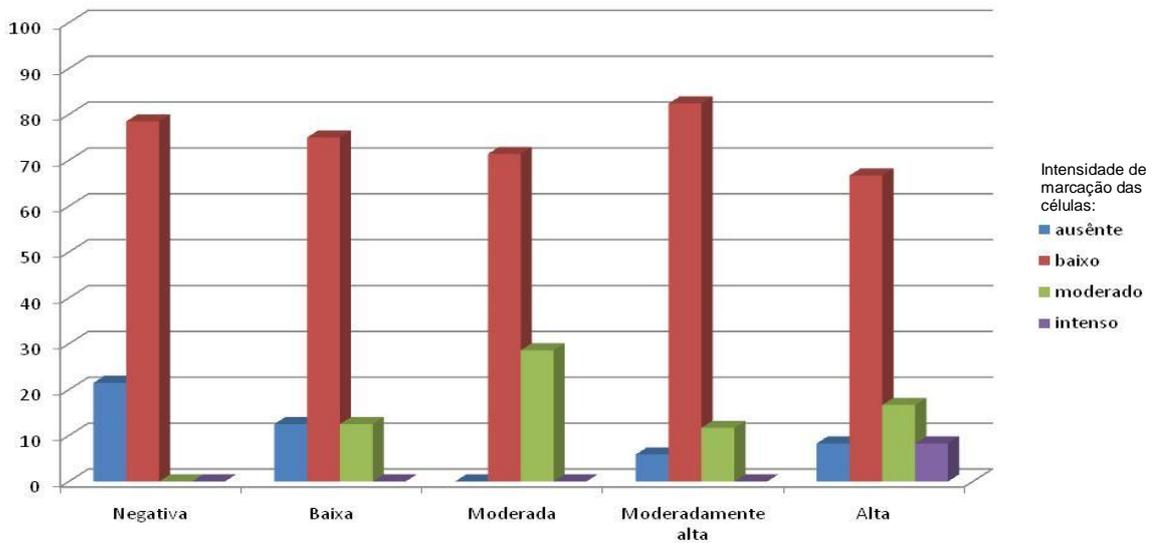


Figura 5 – Percentual das amostras segundo a distribuição dos macrófagos entre os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande - 2009 (n=58). Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta:  $\geq$  1000RLU/PCB

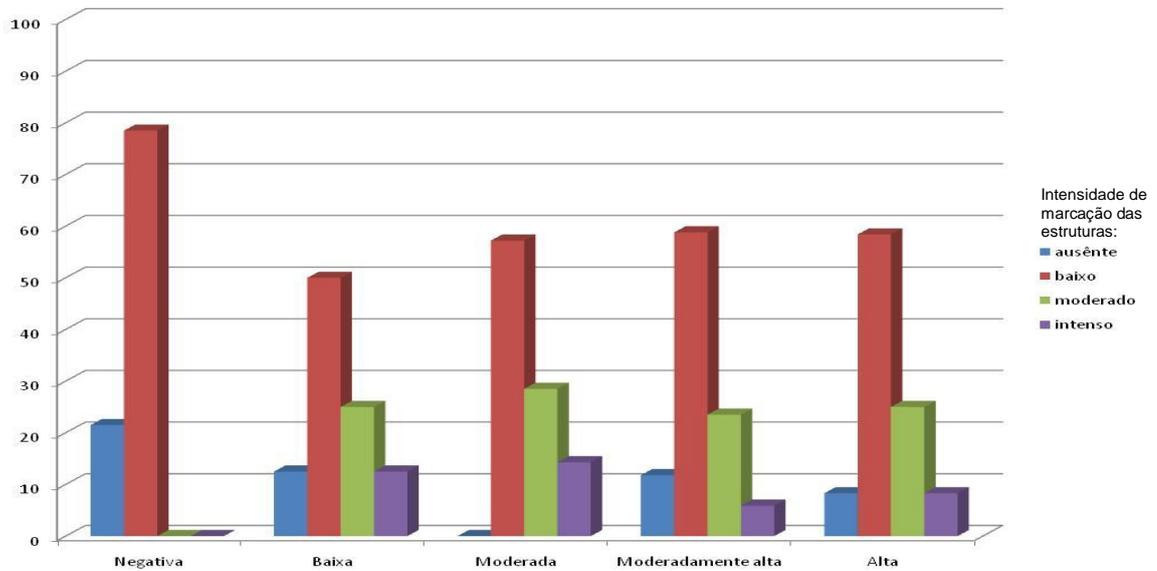


Figura 6 – Percentual das amostras segundo a distribuição de MHC II entre os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande - 2009 (n=58). Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta:  $\geq 1000$ RLU/PCB

A correlação entre os diferentes níveis de carga viral e a presença simultânea de células de Langerhans, macrófagos e MHC II foi estatisticamente significativa ( $p=0,022$ ; Kruskal-Wallis).

Na figura 7 está representada a marcação por imunohistoquímica destas células e estruturas. Os respectivos controles positivo e negativo são apresentados na figura 8.

Houve correlação significativa entre a presença de células de Langerhans e macrófagos ( $p=0,002$ ), e entre MHC II e macrófagos ( $p=0,010$ ) nas amostras NILM (n=24).

Nas figuras 9, 10 e 11 estão representadas a presença de células de Langerhans, macrófagos e a expressão de MHC II nas amostras NILM, segundo a carga viral. A distribuição destas estruturas, de uma forma geral, dentro das amostras NILM pode ser observada na figura 12, pela qual se constata a pouca marcação de macrófagos e MHC II ( $p=0,01$ ), porém uma expressão ligeiramente aumentada de S100.

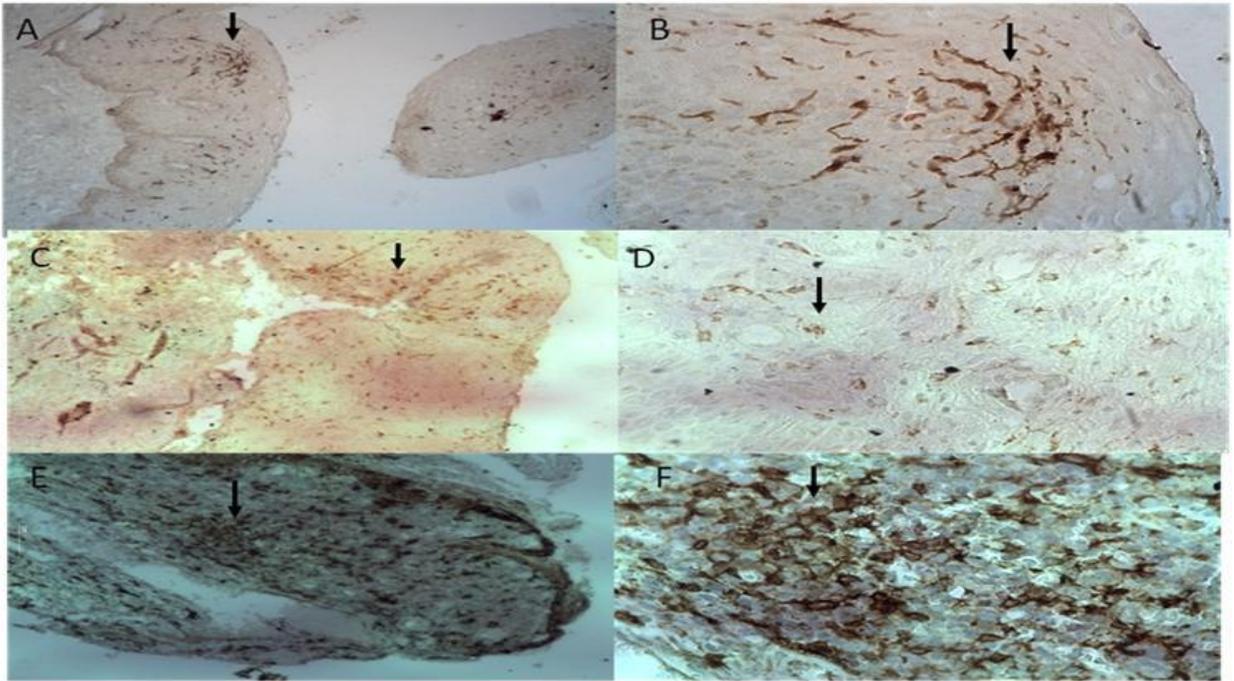


Figura 7 - Biópsia de cérvix uterina das amostras segundo a detecção de células Langerhans (A-100x, B-400x), macrófagos (C-100x, D-400x); MHC II (E-100x, F-400x) (IHQ).

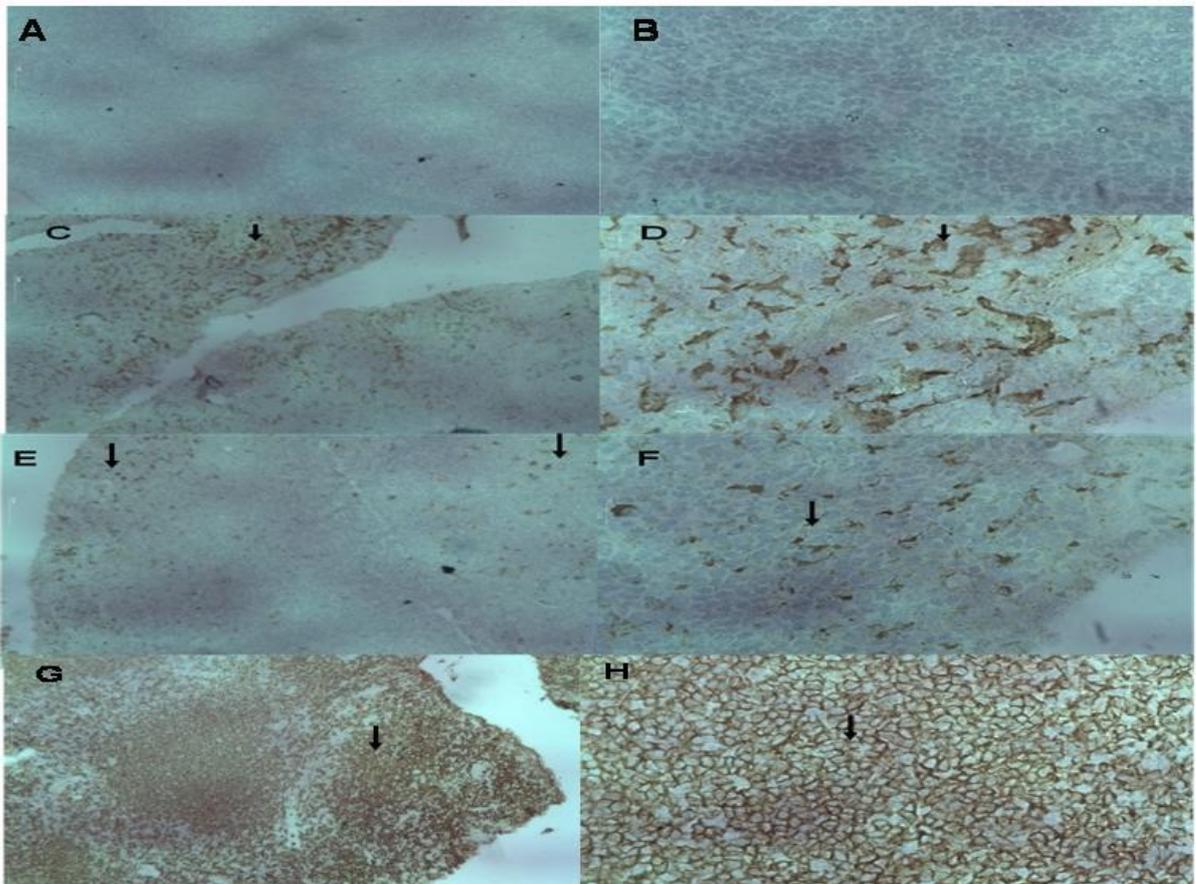


Figura 8 - Imunohistoquímica em tonsila humana, controle negativo (A-100x, B-400x), controle positivo de células de Langerhans (C-100x, D-400x); controle positivo de macrófagos (E-100x, F-400x); controle positivo de MHC II (G-100x, H-400x).

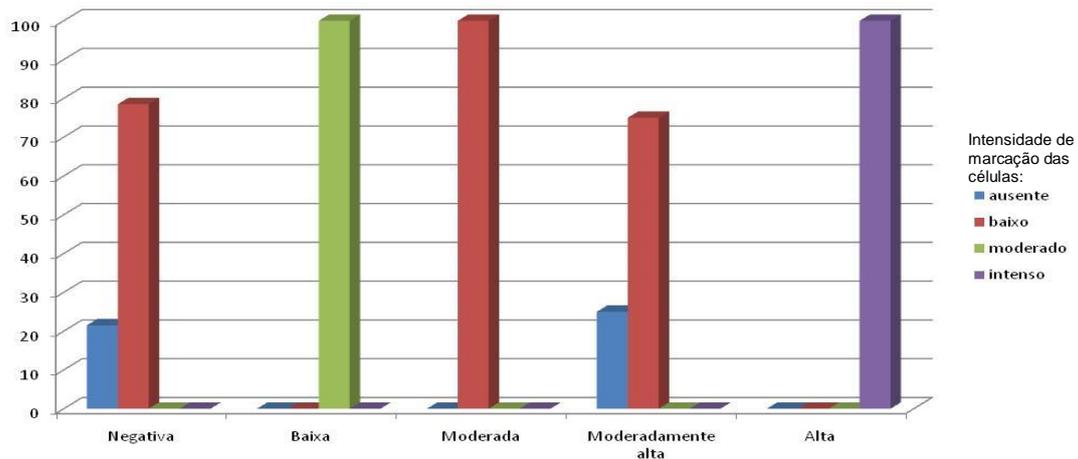


Figura 9 – Percentual das amostras NILM segundo a distribuição das células de Langerhans entre os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande - 2009 (n=24). Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta: ≥ 1000RLU/PCB

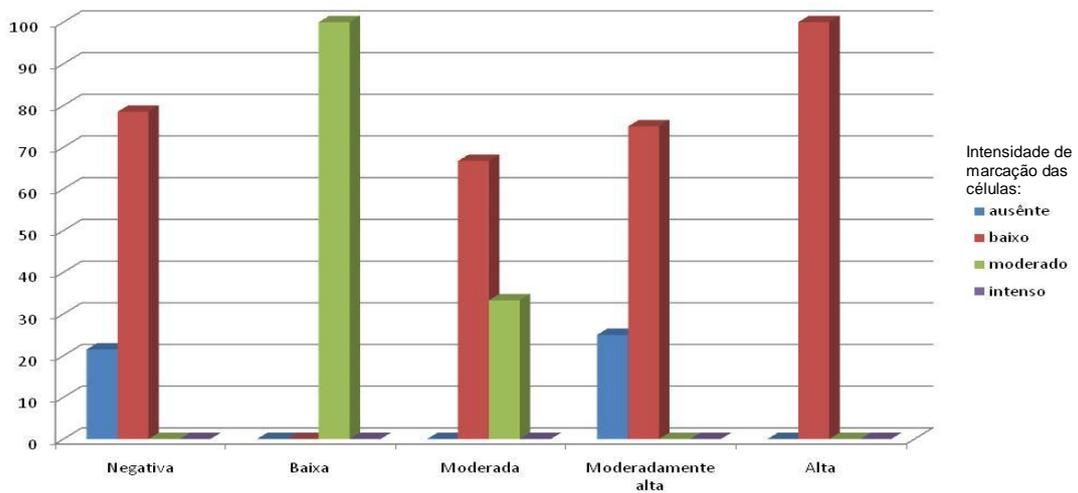


Figura 10 – Percentual das amostras NILM segundo a distribuição de macrófagos entre os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande - 2009 (n=24). Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta: ≥ 1000RLU/PCB

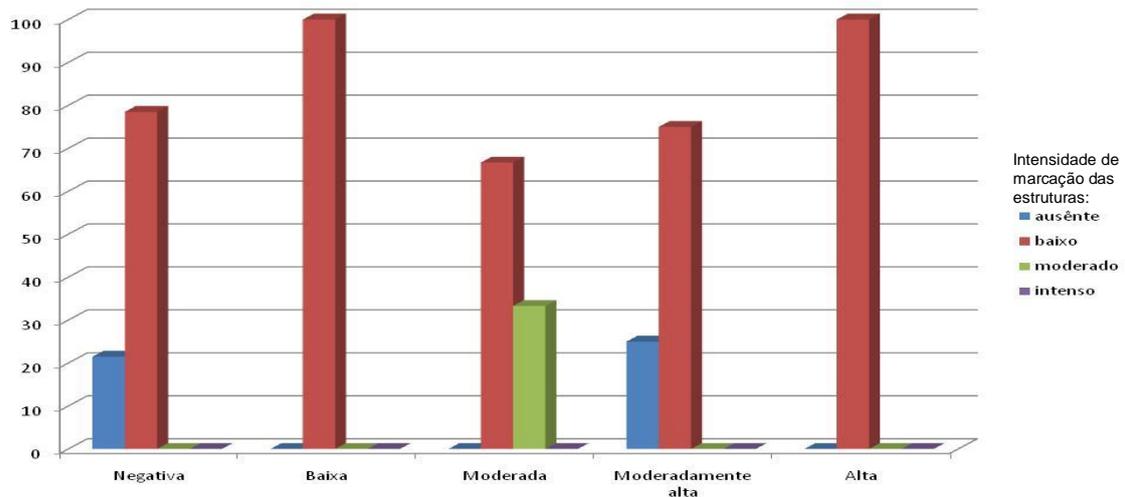


Figura 11 – Percentual das amostras NILM segundo a distribuição de MHC II entre os diferentes níveis de carga viral, Campo Grande - 2009 (n=24).  
 Negativa: 0,0RLU/PCB; Baixa: 0,1 a <10RLU/PCB; Moderada: 10 a <100RLU/PCB; Moderadamente alta: 100 a <1000RLU/PCB; Alta:  $\geq 1000$ RLU/PCB

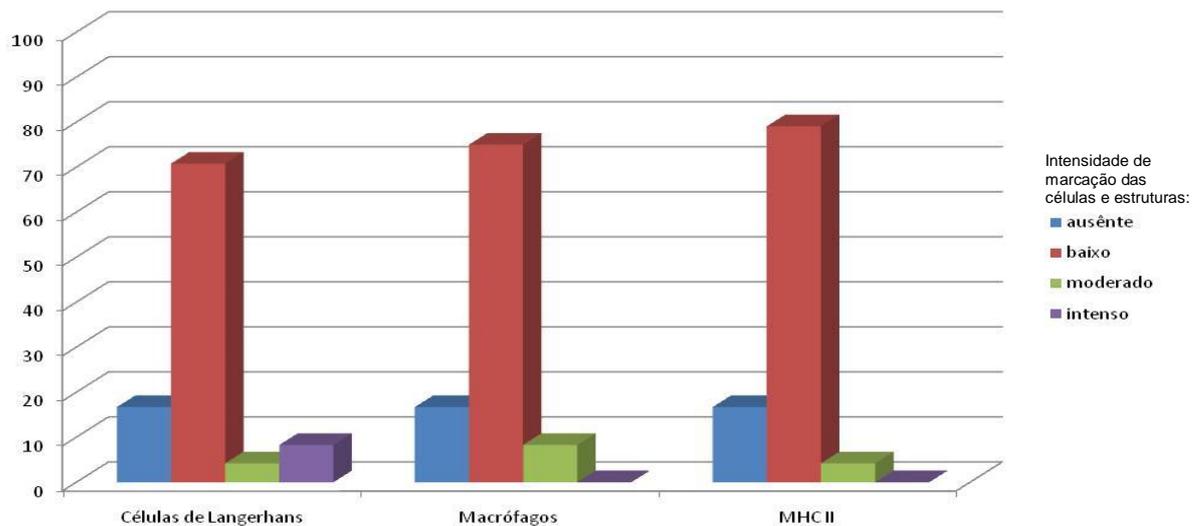


Figura 12 – Percentual das amostras NILM segundo a distribuição de células de Langerhans, macrófagos e MHC II, Campo Grande - 2009 (n=24)

## 6 DISCUSSÃO

Dentre todos os cânceres, o câncer cervical é o que apresenta um dos maiores potenciais de prevenção e cura, sendo este próximo a 100%, quando diagnosticado precocemente. Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países do mundo a introduzir o exame de Papanicolau para a detecção precoce do câncer cervical, a doença continua sendo um grave problema de saúde pública. Tal fato pode ser explicado, pois apenas 30% das mulheres se submetem ao exame citopatológico, pelo menos três vezes durante a vida, o que resulta em diagnóstico de câncer em fase avançada em cerca 70% dos casos (LEAL et al., 2003).

A análise das amostras no que se refere à presença de células ou estruturas relacionadas à apresentação do antígeno, entre os diferentes achados histopatológicos, demonstrou que as células de Langerhans predominaram nas amostras com lesões de alto grau (NIC III) e carcinoma. Poderia-se justificar este fato, pois nestas amostras, uma vez observada a alteração celular, haveria replicação intensa do vírus, mesmo nas camadas basais, disponibilizando partículas virais na camada de tecido conjuntivo, abaixo do epitélio, onde as células do sistema imune estariam presentes para o reconhecimento antigênico. Tal fato foi observado por outros autores, que estudaram as células de Langerhans com diversos marcadores, nas infecções por HPV, constatando redução do seu número em 60% com marcadores OKT6, ATPase e HLA-DR, e depleção completa de células S100+ (TAY et al., 1987).

Al-Saleh et al. (1998) confirmaram redução do número de células de Langerhans no epitélio metaplásico e em NIC independentemente do tipo de HPV causador da infecção. O epitélio glândular da área de metaplasia parece inibir a migração das células de Langerhans, tornando essa área de risco para desenvolvimento de neoplasia, não só pelo fato de ser local de instabilidade tecidual, mas também pela diminuição das células apresentadoras de antígenos.

Neste contexto, a redução local no número de células de Langerhans em lesões do tipo NIC, em associação ao HPV, pode refletir uma falência precoce da ativação de eventos influenciada pela expressão viral (CONNOR et al., 1999). Alguns autores mostraram que nesse tipo de lesão cervical, as células de Langerhans apresentam redução na produção de citocinas, tais como fator de

necrose tumoral (TNF)-alfa e uma superexpressão de citocinas imunossupressoras como a IL-10, em comparação com o epitélio cervical normal (MOTA et al., 1999).

Segundo Bais et al. (2005), a resposta imune nas NIC tem um perfil predominantemente imunoinibitório/supressor, com secreção elevada de algumas citocinas tal como a IL-10, ocasionando um ambiente propício à persistência do vírus e às transformações neoplásicas, permitindo a progressão das lesões cervicais para o câncer cervical. Outros autores, também encontraram níveis mais altos de IL-10 em pacientes com lesão intra-epitelial de baixo grau e hipotetizaram que a superexpressão desta citocina poderia contribuir para o bloqueio ou inibição da resposta imune em estágios iniciais das lesões cervicais (AZAR et al., 2004).

Os efeitos biológicos de IL-10 resultam de sua capacidade de inibir funções de macrófagos ativados, além de inibir a expressão de moléculas de MHC classe II em macrófagos, o que, por sua vez, diminui a ativação de células T e a imunidade mediada por células. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Tais fatos, justificariam a pouca presença de macrófagos e baixa expressão de MHC II, nas lesões de baixo grau e nas amostras sem alterações histopatológicas mesmo sendo infectadas pelo HPV.

Jimenes-Flores et al. (2006) compararam, através de IHQ, a frequência de células de Langerhans em tecidos cervicais HPV negativos e em amostras de mulheres com HPV de alto risco, observando que este tipo celular é menos numeroso em mulheres HPV positivas, podendo representar um mecanismo viral de escape do sistema imune, reduzindo a apresentação antigênica. Fato semelhante foi observado em nossos resultados, demonstrando que para essas células o estímulo de migração para o local afetado pode ocorrer somente quando a lesão estiver em grau mais avançado. O infiltrado de células de Langerhans, quando presente, é de melhor prognóstico nos carcinomas intra-epiteliais e no invasivo escamoso de colo do útero (NAKANO et al., 1989) bem como nos carcinomas de pulmão, tireóide e gástrico (FOX et al., 1989; SCHRODER et al., 1988; TSUJITANI et al., 1987).

A imunidade local, mediada pelas células de Langerhans, pode ser a chave do mecanismo defensivo do hospedeiro contra infecção por HPV e contra o desenvolvimento de carcinoma cervical. Em nossos achados, verificou-se correlação estatística entre a presença dessas células com o aumento do grau da lesão ( $p=0,001$ ), observando que estas, começaram aparecer de forma moderada de acordo com a evolução da lesão. As características não inflamatórias desta infecção

viral podem ser responsáveis pela ausência de estímulos para a migração destas células para o local da infecção. Com o aumento do grau da lesão, estímulos seriam gerados, tais como a produção de quimiocinas, as quais promoveriam então o afluxo de células de Langerhans.

A transformação maligna da célula infectada, ocasionando a neoplasia, é um dos efeitos da integração do DNA viral, entretanto, também devido à integração do genoma viral, pode-se ter a inibição da apresentação do antígeno, uma vez que o vírus interfere com a síntese das moléculas de classe I e II (O'BRIEN; SAVERIA CAMPO, 2002). Em condições inflamatórias e infecções virais, as células apresentadoras de antígenos expressam altos níveis de MHC de classe II ativando mais intensamente as células T (SERVET; ZITVOGEL; HOSMALIN, 2002). Estudo com amostras oriundas de pacientes infectadas por HPV 16 e HPV 18 mostrou diminuição da expressão de MHC II no epitélio cervical (GONÇALVES et al., 2004). Este fato também foi relatado para o MHC de classe I, com a progressão da lesão cervical sendo marcador prognóstico para lesão vulvar (BONTKES et al., 1998).

No presente estudo houve expressão de moderada a intensa somente entre as amostras com carcinoma. No restante em média apenas 30% das amostras expressavam quantidades moderadas de MHC II. Tal achado pode ser decorrência da supressão viral na síntese desta molécula, fato comprovado na literatura e associado à evolução do câncer de colo uterino (CAMPOLI; CHANG; FERRONE, 2002; MARINCOLA et al., 2003). Além disto, como falado anteriormente, a superexpressão de IL-10 pode ocasionar a diminuição da expressão de MHC II nas fases iniciais da resposta imune, contribuindo para a inibição da ativação de células T.

O predomínio de macrófagos quando o carcinoma já estava instalado pode estar associado também, às características virais de inibição ou retardo na ativação do sistema imune, tendo em vista que essas células estão mais ativas na fase efetora da resposta imunológica. Infiltrado inflamatório, composto de macrófagos e células CD4+ é observado em condilomas que regredem, além disso, um microambiente que não favoreceria a presença de macrófagos, com diminuição da resposta Th1 e baixa produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é observada em pacientes com lesão intra-epitelial de alto grau (LEE et al., 2004).

Estudos demonstraram que em pacientes com carcinoma cervical, a associação entre presença de macrófagos e estágio avançado, sugerindo que os

macrófagos de lesões ainda não invasivas (NIC) poderiam ser ineficazes na infecção pelo HPV, e tal efeito poderia ser produzido por proteínas virais imunossupressoras ou por citocinas do próprio hospedeiro. Ainda seria possível que, o aumento do número de macrófagos no carcinoma invasivo fosse reflexo de uma reação desencadeada pela invasão do estroma e não uma resposta imune específica contra o tumor (DAVIDSON; GOLDBERG; KOPOLOVIC, 1997).

Analisados em conjunto, dados de literatura apontam que o acúmulo de leucócitos nas lesões cancerosas pode ser fator negativo para o prognóstico da doença (GEBHARD et al., 2000). Sabe-se que os macrófagos ativados podem estimular a angiogênese, através da liberação de fatores de crescimento. Em consequência, menor número de macrófagos infiltrados no sítio tumoral corresponde a uma menor vascularização e, portanto, podem representar estágios mais precoces da progressão tumoral (GEBHARD et al., 2000; LEEK et al., 1996; UENO et al., 2000).

Avaliando a presença das células e estruturas relacionadas à ativação da resposta imune nas amostras, de acordo com a carga viral, encontrou-se predomínio de células de Langerhans nas amostras com carga viral acima de 1000 RLU/PCB, ou seja, quando haveria intensa replicação viral. Embora se tenha observado correlação estatística significativa entre a presença simultânea de todas as estruturas analisadas, com relação à presença de macrófagos e MHC II o que se vê é a distribuição quase que equitativa entre todos os níveis de carga viral. Alguns estudos confirmam que a carga viral de pacientes com HPV de alto risco oncogênico, pode ser usada como marcador de progressão para lesão pré-cancerosa, o que os dados obtidos neste estudo corroboram, uma vez que, nas fases onde a replicação viral não estaria ocorrendo, os estímulos para a ativação da resposta imune também não estariam presentes, persistindo a infecção viral e contribuindo para a progressão maligna da doença (RABELO-SANTOS et al., 2005; SANTOS, et al., 2003).

Como parâmetro de comparação, efetuou-se as análises por IHQ em um grupo de amostras sem alterações histopatológicas (NILM), subdivididas em dois grupos, negativas (n=14) ou não (n=10) para a presença de DNA de HPV. Observou-se escassa quantidade de células de Langerhans e macrófagos, bem como expressão de MHC II nestas amostras, mesmo dentro do grupo que apesar de não possuir alterações celulares eram positivas para DNA HPV. Quando se analisou em separado as amostras NILM positivas para DNA de HPV, constatou-se que

somente para as células de Langerhans, ocorre uma elevação da presença destas células, quando a carga viral é maior que 1000 RLU/PCB. Tal fato sugere que a replicação viral intensa seria um evento necessário para a apresentação do antígeno e ativação da resposta imune.

A diferença entre a resposta inflamatória benéfica e a prejudicial é um processo complexo. É proposto que nos tumores esta transformação seja gradual, dependendo não só do tipo tumoral como também dos mediadores produzidos no microambiente e que dão suporte para a natureza nociva ou não da inflamação (BEN-BARUCH, 2006). Uma possível explicação para diferenças observadas nos vários estudos, sobre alterações de funções de leucócitos, poderia ser decorrente do estágio do tumor. Já foi sugerido que o aumento de funções de leucócitos pode ser resultado da ativação do sistema imune celular em resposta à célula tumoral, em fases iniciais (SUSS; BAKACS; RINGWALD, 1984), enquanto que redução dessas funções poderia ser consequência da progressão da doença (LUKAC et al., 1994; GEBHARD et al., 2000).

Considerando que a presença e atividade de células apresentadoras de antígenos e moléculas de classe II no início da infecção são fatores determinantes para sua resolução, e que provavelmente devido à superexpressão de IL-10 e outros fatores supressores virais, encontrou-se uma deficiência nesta fase da resposta nas amostras positivas para HPV, isto levaria a concluir que inicialmente não está ocorrendo apresentação do antígeno aos linfócitos T. Posteriormente, quando a replicação viral se torna intensa e o vírus ocasiona alterações celulares características, observou-se a implantação da resposta imune. Porém, a persistência da replicação viral e a presença de atipias celulares são consideradas fatores de risco para a malignidade (ORTH, 1987).

## 7 CONCLUSÕES

Os achados deste estudo levaram a concluir que:

Nas pacientes positivas para o DNA de HPV, mas que não apresentam alterações histopatológicas (NILM) ou apenas com lesão de baixo grau, e nas pacientes com baixa carga viral, não está ocorrendo os sinais adequados para o início da ativação da resposta imune.

As células de Langerhans foram detectadas em quantidade de moderada a intensa nas lesões de alto grau e com elevada carga viral.

No que diz respeito aos macrófagos, não se observou correlação estatística entre a presença destas células, os achados histopatológicos e a carga viral.

Houve escassa quantidade de células de Langerhans e macrófagos, bem como da expressão de MHC II, nas amostras NILM, mesmo dentro do grupo que apesar de não possuir alterações celulares eram positivas para DNA HPV.

Nas amostras NILM positivas para DNA de HPV, as células de Langerhans estão presentes de forma relevante quando a carga viral é mais elevada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Processamento de antígenos e apresentação aos linfócitos T. In:\_\_\_\_\_ **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 5, p. 83-106.
- ALBERT, M. L.; SAUTER, B.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. **Nature**, London, v. 392, n. 5, p. 86-89, Mar. 1998.
- AL-SALEH, W.; GIANNINI, S. L; JACOBS, N.; MOUTSCHEN, M.; DOYEN, J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. **The Journal of Pathology**, London, v. 184, n. 3, p. 283-290, Mar. 1998.
- AZAR, K. K.; TANI, M.; YASUDA, H.; SAKAL, A.; INOUE, M., SASAGAWA, T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Human Pathology**, New York, v. 35, n. 11, p. 1376-1384, Nov. 2004.
- BAIS, A. G.; BECKMANN, I.; LINDEMANS, J.; EWING, P. C.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; HELMERHORST, T. J. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 58, n. 10, p. 1096-1100, Oct. 2005.
- BAKER, G. E.; TYRING, S. K. Therapeutic approaches to papillomavirus infections. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 331-340, Apr. 1997.
- BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Seminars in Cancer Biology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 38-52, Feb. 2006.
- BEUTNER, K. R.; TYRING, S. Human papillomavirus and human disease. **American Journal of Medicine**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 9-15, May 1997.
- BONTKES, H. J.; WALBOOMERS, J. M.; MEIJER, C. J.; HELMERHORST, T. J.; STERN, P. L. Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. **Lancet**, London, v. 351, n. 9097, p. 187-188, Jan. 1998.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 11, n. 87, p. 796-802, June 1995.
- BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 1, p. 1-17, Jan. 2003.

CAMPOLI, M.; CHANG C. C.; FERRONE S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. **Vaccine**, Netherlands, v. 20, n. 4, p. 40–45, Dec. 2002.

CIUFFO, G. Innesto positivo com filtrato di verruga volgare. **Giornale Italiano de Male Vennereo**, Roma, v. 48, n. 1, p. 12-17, Dec. 1907.

CHAOUKI, N.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J.; EL GUEDDARI, B.; EL GAHZI, A.; DEACON, J.; CATELLSAGUE, X.; WALBOOMERS, J. M. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. **International Journal of Cancer**, New York, v. 75, n. 4, p. 546-54, Feb. 1998.

CHIRGWIN, K. D.; FELDMAN, J.; AUGENBRAUN M.; LANDESMAN, S.; MINCOFF, H. Incidence of venereal warts in human immunodeficiency virus-infected and uninfected women. **The Journal of Infected Diseases**, Chicago, v. 172, n. 1, p. 235-238, July 1995.

CONNOR, J. P.; FERRER, K.; KANE, J. P.; GOLDBERG, J. M. Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 75, n. 1, p. 130-135, Oct. 1999.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA. Papilomavírus Humano (HPV): diagnóstico e tratamento. **Ética Revista**, Brasília, v. 4, n. 3, p.10-13, Mar. 2006.

COX, J. T.; SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 188, n. 6, p. 1406-1412, June 2003.

DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Pathology, Research and Practice**, New York, v. 193, n. 7, p. 491-495, May 1997.

DIMAIO, D.; MATTON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, Philadelphia, v. 20, n. 54, p. 7866-7873, Nov. 2001.

DUERR, A.; PARAMSOTHY, P.; JAMIESON, D. J.; HEILIG, C. M.; KLEIN, R. S.; CUUVIN, S.; SCHUMAN, P.; ANDERSON, J. R. Effect of HIV infection on atypical squamous cells of undetermined significance. **Clinical Infections Diseases**, Chicago, v. 42, n. 6, p. 855-861, Mar. 2006.

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

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.

FACCINI, A. M.; CAIRNEY, M.; ASHRAFI, G. H.; FINBOW, M. E.; CAMPO, M. S.; PITTS, J. D. The bovine papillomavirus type 4 E8 protein binds to ductin and causes loss of gap junctional intercellular communication in primary fibroblasts. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 12, p. 9041-9045, Dec. 1996.

FENNEMA, J. S. A.; VAN AMEIJDEN, E. J. C.; COUTINHO, R. A.; VAN DEN HOEK, J. A. R. HIV, sexually transmitted diseases and gynaecologic disorders in women: increased risk for genital herpes and warts among HIV-infected prostitutes in Amsterdam. **AIDS**, London, v. 9, n. 9, p. 1071-1078, Sept. 1995.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 164, n. 7, p. 1017-1025, Apr. 2001.

FOX, S. B.; JONES, M.; DUNNILL, M. S.; GATTER, K. C.; MASON, D. Y. Langerhans cells in human lung tumors: and immunohistological study. **Histopathology**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 269-75, Mar. 1989.

GEBHARD, B.; GNANT, M.; SCHÜTZ, G.; ROKA, S.; WEIGEL, G.; KANDIOLER, D.; TAUCHER, S.; GRÜNBERGER, T.; ROTH, E.; JAKESZ, R.; SPITTLER, A. Different transendothelial migration behaviour pattern of blood monocytes derived from patients with benign and malignant diseases of the breast. **Anticancer Research**, Greece, v. 20, n. 6B, p. 4599-4604, Nov./Dec. 2000.

GEORGOPOULOS, 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**, Philadelphia, v. 19, n. 42, p. 4930-4935, Oct. 2000.

GIANNINI, S. L.; HUBERT, P.; DOYEN, J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans' cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. **International Journal of Cancer**, New York, v. 97, n. 5, p. 654-659, Feb. 2002.

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.

GOMPEL, G.; KOSS, L. G. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1997.

GÓMEZ, V. M. V.; CASTILLO, V. E. V. Perspectivas actuales en el estudio y en la atención de las pacientes com cáncer cervicouterino. **Ginecología y Obstetricia de México**, México, v. 72, n. 1, p. 29-38, Ene. 2004.

GONCALVES, M. A.; SOARES, E. G.; FERNANDES, A. P.; FONSECA, B. A.; BETTINI, J. S.; SIMÕES R. T.; DONADI, E. A. Langerhans cell count and HLA class II profile in cervical intraepithelial neoplasia in the presence or absence of HIV infection. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Ireland, v. 114, n. 2, p. 221-227, June 2004.

GOODMAN, J. J.; GREENWOOD A. M. Verruca, a review. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 30, n. 5, p. 659-671, Nov. 1934.

HANAHAN, D.; WINBERG, A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Genova, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan. 2000.

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

HOLLOWAY, P.; MILLER, A. B.; ROHAN, T.; TO, T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 91, n. 16, p. 252-58, Aug. 1999.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde - Brasil. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer de colo de útero**, INCA, 2008–2009. Disponível em: <www.inca.org.br>. Acesso em: 22 sept. 2009.

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

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 vírus infection decreases the frequency the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. **Immunology**, London, v. 117, n. 2, p. 220-228, Feb. 2006.

KIDD, J. G. Course of virus-induced rabbit papilomas as determined by virus, cells, and host. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 68, n. 6, p. 551-573, Oct. 1938.

KOUTSKY, L. A.; HOLMES, K. K.; CRITCHLOW, C. W.; STEVENS C. E.; PAAVONEN, J.; BECKMANN A. M.; DEROUEN 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. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 327, n. 18, p. 1272-1278, Oct. 1992.

LEAL, E. A.; LEAL JUNIOR, O. S.; GUIMARAES, M. H.; VITORIANO, M. N.; NASCIMENTO, T. L.; COSTA, O. L. N. Lesões precursoras do câncer de colo em mulheres adolescentes e adultas jovens do município de Rio Branco - Acre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 81-86, Fev. 2003.

LEE, B. N.; FOLLEN, M.; SHEN, D. Y.; MALPICA, A.; ADLER-STORTHZ, K.; SHEARER, W. T.; REUBEN, J. M. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington v. 11, n. 2, p. 239-244, Mar. 2004.

LEEK, R. D.; LEWIS, C. E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; HARRIS, A. L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Research**, Chicago, v. 56, n. 20, p. 4625-4629, Oct. 1996.

LEVI, G.; FELDMAN, J.; HOLMAN, S.; SALARIEH, A.; STRICKLER, H. D.; ALTER, S.; MINKOFF, H. Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, St. Louis, v. 31, n. 2, p. 178-184, Apr. 2005.

LINS, R. D. A. U.; FREITAS, R. A.; FIGUEIREDO, C. R. L. V.; SILVEIRA, E. J. D. M.; BEZERRA, K.; GODOY, G. P. Células dendríticas: origem, distribuição, morfologia, estrutura, atividade funcional e métodos de identificação - uma revisão. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, Natal, v. 2, n. 3, p. 29-35, Jul./Set. 2003.

LORINCZ, A.; CASTLE, P.; SHERMAN, M.; SCOTT, D.; GLASS, A.; WACHOLDER, S.; RUSH, B.; GRAVITT, P.; SCHUSSLER, J.; SCHIFFMAN, M. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN 3 or cervical cancer. **Lancet**, London, v. 360, n. 9328, p. 228-29, Dec. 2002.

LUKAC, J.; LECHPAMMER, S.; KUSIC, Z.; BOLANCA, A.; DAKOVIĆ, N. Prognostic significance of phagocytic functions in breast cancer patients. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 30A, n. 14, p. 2185-2186, Dec. 1994.

MARINCOLA, F. M.; WANG, E.; HERLYN, M.; SELIGER, B.; FERRONE, S. Tumors an elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 335-42, June 2003.

MARSH, M. R. Papilloma of the cervix. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 64, n. 2, p. 281-291, Aug. 1952.

MCCANCE, D. J. Human Papillomaviruses. **Infectious Disease Clinics North America**, St. Louis, 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**, London, v. 92, n. 11, p. 1101-1105, Aug. 1985.

MELNICK J. L. Papova virus group. **Science**, Cambridge, 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 pré-malignant and malignant lesions of uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, St. Louis, v. 102, n. 1, p. 22-31, July 2006.

MOTA, F.; RAYMENT, N.; CHONG, S.; SINGER, A.; CHAIN, B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 116, n. 1, p. 33-40, Apr. 1999.

NAKANO, T.; OKA, K.; ARAI, T.; MORITA, S.; TSUNEMOTO, H. Prognostic significance of Langerhans cells infiltration in radiation therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 113, n. 5, p. 507-511, May 1989.

NGUYEN, H. H.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T.; ALVAREZ, R. D.; VU, H. L.; ANDRASI, J.; BREWER, L. R.; JIN, G.; MESTECKY, J. Immune responses to human papillomavirus in genital tract so women with cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 96, n. 2, p. 452-61, Feb. 2005.

O'BRIEN, P. M.; SAVERIA CAMPO, M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. **Virus Research**, Amsterdam, v. 88, n. 1-2, p. 103-117, Sept. 2002.

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

ORTH, G. Epidermodysplasia verruciformis. In. SALZMAN N. P.; HOWLEY P. M., **The papillomaviruses**. 1. ed. New York: Plenum Publishing Corporation, 1987. cap. 66, p. 199-243.

OSTOR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **International Journal of Gynecological Pathology**, New York, v. 12, n. 2, p. 186-192, Apr. 1993.

PALAORO, L. A.; ROCHER, A. E.; BLANCO, A. M. Células de Langerhans y lesiones intraepiteliales de cuello uterino. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 36, n. 1, p. 51-6, Ene. 2002.

PALEFSKY, J. Human papillomavirus-related tumors in HIV. **Current Opinion in Oncology**, Philadelphia, v. 18, n. 5, p. 463-468, Sept. 2006.

PENNIE, W. D.; GRINDLAY, G. J.; CAIRNEY, M.; CAMPO, M. S. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. **Virology**, Amsterdam, v. 193, n. 2, p. 614-620, Apr. 1993.

PEREYRA, E. G.; PARELLADA, C. I.; CHUERY, A. C. S. Papilomavirus humano. In: MARTINS, N. V.; PEREYRA, E. G. **Conhecendo o HPV: patologia do trato genital inferior, colposcopia e cirurgia de alta freqüência**. 1. ed. Sao Paulo: Frontis Editorial, 2000. cap. 1, p. 1-12.

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. 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, p.197-201, June 2005.

RIETHMULLER, D. Ano-genital papillomavirus infections in women. **La Revue du Praticien**, Paris, v. 56, n. 17, p. 1893-1900, Nov. 2006.

RIETHMULLER, D.; SCHAAL, J. P.; MOUGIN, C. Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus. **Gynécologie, Obstétrique & Fertilité**, Paris, v. 30, n. 2, p. 139-146, Feb. 2002.

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

RULISON, R. H. Warts. A statistical study of nine hundred and twenty-one cases. **Archives of Dermatology and Syphilology**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 67-81, Jan. 1942.

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**, v. 121, n. 6, p. 238-243, Jan. 2003.

SANTOS, R. T. M.; WAKAMAT, S. U. A.; KANAMURA, C.; NONOGAKI, S.; PINTO, G. A. Procedimentos laboratoriais em imunohistoquímica e hibridização "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.

SCHAPIRO, F.; SPARKOWSKI, J.; ADDUCI, A.; SUPRYNOWICZ, F.; SCHLEGEL, R.; GRINSTEIN, S. Golgi alkanization by the papillomavirus E5 oncoprotein. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 148, n. 2, p. 305-315, Jan. 2000.

SCHMIEDESKAMP, M. R.; KOCKLER, D. R. Human papillomavirus vaccines. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 40, n. 7/8, p. 1344-1352, July 2006.

SCHRODER, S.; SCHWARZ, W.; REHPENNING, W.; LÖNING, T.; BÖCKER, W. Dendritic/Langerhans cells and prognosis in patients with papillary thyroid carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 89, n. 3, p. 295-300, Mar. 1988.

SERVET, C.; ZITVOGEL, L.; HOSMALIN, A. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 2, n. 8, p. 739-756, Dec. 2002.

SHOPE, R. E.; HURST, W. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 58, n. 5, p. 607-625, Oct. 1933.

SONCINI, E.; CONDEMI, V. Intraepithelial cervical carcinoma and HIV: prevalence, risk factors and prevention strategies. **Minerva Ginecologica**, Torino, v. 55, n. 1, p. 51-55, Feb. 2003.

SPECK, L. M.; TYRING, S. K. Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. **Skin Therapy Letter**, Vancouver, v. 11, n. 6, p. 1-3, July 2006.

STANLEY, M. The immunology of genital human papilloma virus infection. **European Journal of Dermatology**, Mountrouge, v. 8, n. 7, p. 8-12, Oct./Nov. 1998.

STERN, P. L. Recent developments in human papillomavirus vaccines. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 13, n. 8, p. 959-971, Aug. 2004.

STRAUSS, M. J.; SHAW, E. V.; 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. 2, p. 46-52, Feb. 1949.

SURAN, R. R.; MEISTER, P. C. Papiloma of the cervix uteri in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 55, n. 2, p. 342-345, Feb. 1948.

SUSS, J.; BAKACS, T.; RINGWALD, G. Increased number of phagocytic cells among the peripheral blood lymphocytes of mammary tumor patients. **Allergie and Immunologie**, Leipzig, v. 30, n. 3, p. 183-187, Mar. 1984.

SYED, T. A.; HADI, S. M.; QURESHI, Z. A.; AH, S. M.; KWAH, M. S. Treatment of external genital warts in men with imiquimod 2% in cream. A placebo-controlled double-blind study. **The Journal of Infection**, London, v. 41, n. 2, p. 148-151, Sept. 2000.

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

TAY, S. K.; JENKINS, D.; MADDOX, P.; CAMPION, M.; SINGER, A. Subpopulation of Langerhans cells in cervical neoplasia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 94, n. 1, p. 10-5, Jan. 1987.

TOZETTI, I. A. **Correlação entre os resultados da citologia, captura híbrida, nested PCR PGMY/GP+ e PCR tipospecífico na infecção por Papilomavírus Humano**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 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 women in Campo Grande, MS, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 5, p. 309-310, Oct. 2006.

TSUJITANI, S.; FURUKAWA, T.; TAMADA, R.; OKAMURA, T.; YASUMOTO, K.; SUGIMACHI, K. Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma. **Cancer**, London, v. 59, n. 3, p. 501-505, Feb. 1987.

UCHIMURA, N. S.; RIBALTA, J. C. L.; FOCCHI, J.; BARACAT, E. C.; UCHIMURA, T. T. Influência do uso de anticoncepcionais hormonais orais sobre o número de células de Langerhans em mulheres com captura híbrida negativa para papiloma vírus humano. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 12, p. 726-730, Dez. 2005.

UCHIMURA, N. S.; RIBALTA, J. C.; FOCCHI, J.; BARACAT, E. C.; UCHIMURA, T. T. Fatores biocomportamentais e as alterações no número das células de Langerhans. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 289-294, Mar. 2004a.

UCHIMURA, N. S.; RIBALTA, J. C.; FOCCHI, J.; SIMOES, M. J.; UCHIMURA, T. T.; SILVA, E. S. Evaluation of Langerhans' cells in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**, Padova, v. 31, n. 4, p. 260-262, Apr. 2004b.

UENO, T.; TOI, M.; SAJI, H.; MUTA, M.; BANDO, H.; KUROI, K.; KOIKE, M.; INADERA, H.; MATSUSHIMA, K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 6, n. 8, p. 3282-3289, Aug. 2000.

VILLA, L. L.; AULT, K. A.; GIULIANO, A. R.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; BROWN, D. R.; FERENCZY, A.; HARPER, D. M.; KOUTSKY, L. A.; KURMAN, R. J.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; OLSSON, S. E.; RONNETT, B. M.; SKJELDESTAD, F. E.; STEINWALL, M.; STOLER, M. H.; WHEELER, C. M.; TADDEO, F. J.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; MARCHESE, R.; ESSER, M. T.; BRYAN, J.; JANSEN, K. U.; SINGS, H. L.; TAMMS, G. M.; SAAH, A. J.; BARR, E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n. 27/28, p. 5571-5583, May 2006.

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**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. cap. 4, p. 51-58.

VILLADA, I. B.; BARRACO, M. M.; ZIOL, M.; CHABOISSER, A.; BARGET, N.; BERVILLE, S.; PANIEL, B.; JULLIAN, 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.

WOLFE, S. A. Papilloma of the cervix, associated with pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 60, n. 2, p. 448-451, Aug. 1950.

WU, R.; VAN DER HOEK, K. H.; RYAN, N. K.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. Macrophage contributions to ovarian function. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 119-133, Mar./Apr. 2004.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cells carcinomas. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 78, n. 2, p. 1-30, Feb. 1977.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 36, n. 2, p. 794, Feb. 1976.

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

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. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, n. 5, p. 342-350, May 2002.

## APÊNDICE A – SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TCLE

OFÍCIO Nº01/08

Data: 05/12/08

PARA:Prof. Odair Pimentel

Presidente da Comissão de Bioética em pesquisa envolvendo seres humanos

Prezado Professor

Solicitamos a V.Sa a dispensa da utilização do consentimento informado para o projeto “Identificação “in situ” de Células Dendríticas e Macrófagos em pacientes HPV infectadas com lesões de alto e baixo grau EM CAMPO GRANDE, ms”, tendo em vista que as amostras envolvidas neste estudo foram coletadas no projeto “Detecção de DNA de Papilomavírus Humano (HPV) através da reação de polimerização em cadeia (PCR), em amostras de endocervice, vagina e vulva de pacientes com resultados inconclusivos nos métodos de citopatologia, colposcopia e captura de híbridos”, aprovado pelo parecer nº 276/2001 emitido por esta comissão e estão sendo novamente objeto de estudo no projeto “Identificação *in situ* de células dendríticas, linfócitos T CD4 e CD8 e células NK em lesões de alto e baixo grau em pacientes HPV infectadas” cujo o novo procedimento foi também aprovado por esta comissão sob nº 975.

*Fernanda Cassandri*

## **ANEXOS**

## 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.*

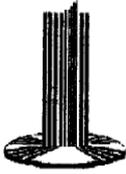
*Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos*

*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](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
 fone 0XX67 345-7187

## ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO Nº975



**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 975 da Pesquisadora Inês Aparecida Tozetti intitulado "Identificação in situ de células dendríticas, linfócitos T CD4+ e C8+ e células NK em lesões de alto e baixo grau em pacientes HPV infectadas", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 31 de julho de 2007, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. ~~Odair~~ ~~Almeida~~ ~~Martins~~*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 31 de julho de 2007.*

**ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO Nº1355**

**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 1355 da Pesquisadora Fernanda Cassandri intitulado “Identificação “in situ” de células dendríticas, macrófagos e moléculas MHC de classe II em pacientes HPV infectadas com lesões de alto e baixo grau 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.*