

THIAGO THEODORO MARTINS PRATA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS COM FUNÇÃO
IMUNORREGULATÓRIA EM AMOSTRAS DE CÉRVIX UTERINA**

**CAMPO GRANDE
2015**

THIAGO THEODORO MARTINS PRATA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS COM FUNÇÃO
IMUNORREGULATÓRIA EM AMOSTRAS DE CÉRVIXE UTERINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da UFMS como requisito à obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Inês Aparecida Tozetti.

**CAMPO GRANDE
2015**

À minha família, por sonhar este sonho comigo, dando-me o apoio e incentivo necessários para sua concretização. Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sou grato a Deus por me permitir passar por essa experiência que tanto me moldou e me fez crescer. Desejo, de todo meu coração, que esses resultados glorifiquem seu santo nome, sendo úteis na vida de outras pessoas.

À minha família, agradeço por inculcar em mim ensinamentos e valores que não se aprendem nos bancos da Universidade. Vocês são meu exemplo, apoio, incentivo. Obrigado por acreditarem e investirem em meus sonhos. Eu amo vocês.

À professora Dra. Inês Aparecida Tozetti, muito obrigado por ser mais que uma orientadora, uma amiga. Aprendi bem mais que imunologia contigo. A seu exemplo, aprendi a ser um profissional sério, dedicado, humano e ético. Suas exortações e conselhos me moldaram tanto! Obrigado por sua confiança e paciência. Sou grato a Deus pelo privilégio de ser seu discípulo e por poder caminhar contigo todos esses anos.

À professora Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira, obrigado por ver em mim adjetivos que eu não via, nem o espelho expressava, mas que só pessoas iluminadas como você são capazes de perceber. Seus conselhos preciosos fizeram a diferença em muitos dos meus momentos de indecisão. E sua alegria contagiante tornou os meus dias de trabalho, diversão.

À professora Dra. Cacilda Tezelli Junqueira Padovani, muito obrigado por, com sua inteligência, presteza e competência, sempre contribuir para meu aperfeiçoamento, desde meu TCC até hoje.

Ao professor Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, obrigado por contribuir pacientemente com a análise estatística desse trabalho.

Ao professor Dr. André Fonseca, muito obrigado pelos conselhos pertinentes.

À professora Dra. Ana Rita Coimbra Motta-Castro, agradeço por sua valiosa contribuição tanto à minha formação acadêmica quanto ao enriquecimento desse estudo.

Ao professor Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, agradeço por sua contribuição como participante da banca de defesa desse estudo.

À minha amiga Ana Paula Machado, agradeço por estar por perto tanto em meio às risadas quanto em meio às lágrimas, sendo fonte de consolo e paz. Sua garra, força e competência são exemplos para mim.

À minha amiga Camila Mareti Bonin, pessoas como você são raras nos nossos dias. Foi um privilégio trabalhar todos esses anos com uma pessoa tão competente, dedicada e prestativa quanto você.

Aos meus irmãos em Cristo, agradeço pelo apoio fundamental. Suas orações e torcida me revigoraram. Muito obrigado!

Aos meus amigos Luiz Felipe, Daniele Palhão e Ana Flavia Pina, agradeço pelo importante auxílio na realização da técnica de imuno-histoquímica.

Aos meus amigos Julio Menta, Larissa Zatorre, Gustavo Gonçalves, Karla Mendes, Cynthia Mazzi, Mariana Nocetti, Tiago Andrade e Fabiola Cabral, obrigado pelo apoio e incentivo.

Às pacientes que participaram voluntariamente da pesquisa, muito obrigado. Sem vocês a execução desse trabalho não seria possível.

Ao Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande, MS, obrigado pela parceria essencial para a realização desse projeto.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS) e ao conselho nacional de pesquisa (CNPq), obrigado pelo suporte financeiro.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é o entendimento”.

Provérbios 9:10

RESUMO

A resposta imune específica ao Papilomavírus humano (HPV) no microambiente cervical desempenha papel importante na erradicação da infecção e na eliminação de células mutadas. Essa resposta depende da expressão de moléculas apresentadoras de antígenos e de citocinas produzidas por diferentes fenótipos celulares no local da infecção. No entanto, genótipos de HPV de alto risco oncogênico modulam as células do sistema imune, de forma a induzir nessas um perfil imunossupressor via produção da citocina IL-10, a fim de não serem eliminados. O desenvolvimento deste microambiente imunossuprimido contribui, juntamente com a infecção, para o surgimento de lesões neoplásicas. O objetivo deste estudo foi caracterizar os fenótipos celulares com função imunorregulatória em amostras de cérvix uterina. Desta forma, foram analisadas 84 biópsias de cérvix uterina de pacientes entre 18 e 69 anos (média 39,2 anos), incluindo amostras negativas para lesão intraepitelial e malignidade - NILM (n = 5), com neoplasia intraepitelial cervical de grau I - NICI (n = 21), grau II - NICII (n = 20), grau III - NICIII (n = 16) e carcinoma cervical - CA (n=22), emblocadas em parafina e previamente submetidas à avaliação histopatológica e detecção de HPV-DNA com determinação da carga viral por PCR em tempo real. Pesquisou-se a produção de IL-10 por macrófagos (CD68+ e CD11b+), células de Langerhans (S100+) e células T Regulatórias (Foxp3+) por imuno-histoquímica de dupla marcação. Por marcação simples, pesquisou-se Células Apresentadoras de Antígeno (APC) e queratinócitos expressando MHC II e queratinócitos produzindo IL-10. As lâminas confeccionadas foram digitalizadas e analisadas no software ImageJ para confirmação da dupla marcação, determinação da área das imagens e quantificação das células imunomarcadas. A densidade destas células foi relacionada com o grau das lesões, idade das participantes, carga viral (CV) do HPV e presença de infecção simples ou múltipla. Este estudo foi aprovado pelo CEP UFMS (nº 1628/10). O aumento da produção de IL-10 por todos os fenótipos celulares estudados e da expressão de MHC II por APC e queratinócitos foi associado à lesões neoplásicas cervicais de alto grau. Observou-se também, maior densidade dos fenótipos celulares com perfil imunossupressor em pacientes maiores de 30 anos, alta carga viral e, preferencialmente, entre as infectadas por um único tipo viral, sobretudo por tipos de alto risco oncogênico. Estes resultados indicam que existe um microambiente imunossuprimido composto por elevada quantidade de macrófagos, células de Langerhans, células T regulatórias e queratinócitos produtores de IL-10 em uníssono com o aumento da densidade de APC e queratinócitos MHC II+ nas amostras classificadas como lesões de alto grau (NICII/NICIII) e CA. A imunossupressão corroborada por estes diferentes fenótipos, somada ao aumento da expressão de MHC II nas lesões induzidas por HPV, proporcionam um microambiente favorável à persistência viral e à progressão neoplásica.

Palavras-chave: Papilomavirus humano (HPV); imunossupressão, IL-10.

ABSTRACT

A specific immune response to human papillomavirus (HPV) in the cervical microenvironment plays an important role in eradicating infection, and eliminating mutated cells. This response is dependent on the expression of antigen-presenting molecules and cytokines produced by different cellular phenotypes at the infection site. However, high-risk HPVs modulate immune cells to create an immunosuppressive microenvironment, and induce these immune cells to produce interleukin 10 (IL-10). The development of this immunosuppressed microenvironment contributes, together with the infection, to the onset of neoplastic lesions. The objective of this study was to characterize the cellular phenotypes with immunoregulatory function in uterine cervix samples. In this way were analyzed 84 biopsies of uterine cervix of patients between 18 and 69 years (mean 39.2 years), including negative samples for intraepithelial lesion and malignancy (n = 5), cervical intraepithelial neoplasia grade I (n = 21), grade II (n = 20), grade III (n = 16) and cervical carcinoma (n = 22), paraffin-embedded and previously submitted to histopathological evaluation and detection of HPV DNA with viral load determination by Real-time PCR. We analyzed the production of IL-10 by macrophages (CD68+ and CD11b+), Langerhans cells (S100+) and Regulatory T cells (Foxp3+) by double staining immunohistochemistry. By simple staining immunohistochemistry, it was researched antigen-presenting cells and keratinocytes expressing MHC II and keratinocytes producing IL-10. The prepared slides were scanned and analyzed with ImageJ software for confirmation of double staining, determination of area of images and density of immunostained cells. The density of these cells was related with lesion grade, age of participants, viral load of HPV and presence of single or multiple infections. This study was approved by the UFMS ethics committee (No. 1628/10). The increase in IL-10 production in all studied cellular phenotypes and MHC II expression by keratinocytes and APC was associated with the progression of cervical neoplasia. It was also observed higher density of immunosuppressive phenotypes in patients aged over 30 years, with high viral load, and predominantly, among those infected with a single viral type, particularly for high-risk oncogenic types. These results indicate an immunosuppressed microenvironment with high amount of macrophages, Langerhans cells, regulatory T cells and keratinocytes producing IL-10 together with an increased density of MHC II+ APC and keratinocytes in the samples classified as high grade cervical lesion (NICII / NICIII) and cervical cancer. Immunosuppression developed by these different phenotypes, in addition to increased MHC II expression in HPV-induced lesions, provide a favorable microenvironment for viral persistence and neoplastic progression.

Keywords: Human papillomavirus (HPV); immunosuppression, IL-10.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos genótipos de HPV segundo os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer–Campo Grande – MS, 2012 (n=76).....	45
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fenótipos celulares pesquisados por imuno-histoquímica em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	38
Figura 2	Especificação e diluição empregada para os anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica das amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	39
Figura 3	Distribuição dos achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	44
Figura 4	Tipos de HPV encontrados em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=76).....	45
Figura 5	Distribuição da carga viral do HPV de acordo com os achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer - Campo Grande - MS, 2012 (n=84).....	46
Figura 6	Distribuição dos tipos virais mais frequentes e múltipla infecção segundo os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande – MS, 2012 (n=76).....	47
Figura 7	Média de idade de acordo com os achados histopatológicos de pacientes submetidas a biópsias de cérvix uterina no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	48
Figura 8	Co-expressão dos marcadores fenotípicos/IL-10 detectada por IHQ de dupla marcação em biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	49
Figura 9	Expressão dos marcadores detectados por IHQ de marcação simples em biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	50
Figura 10	Expressão dos marcadores pesquisados por IHQ de marcação dupla em biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	51

Figura 11	Expressão de diferentes fenótipos celulares de acordo com os achados histopatológicos em amostras de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2012 (n=84).....	52
Figura 12	Expressão de diferentes fenótipos celulares em amostras de cérvix uterina de acordo com a idade das pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2012 (n=84).....	54
Figura 13	Expressão de diferentes fenótipos celulares de acordo com a carga viral em amostras de cérvix uterina das pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2012 (n=84).....	56
Figura 14	Expressão de diferentes fenótipos celulares de acordo com os tipos virais encontrados em amostras de cérvix uterina das pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2012 (n=76).....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- APC = *Antigen-presenting cell* (célula apresentadora de antígenos)
- ASC-H = *Atypical squamous cells – cannot exclude HSIL* (Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau)
- ASC-US = *Atypical squamous cells of undetermined significance* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
- CA = Carcinoma cervical
- CDC = *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de controle e prevenção de doenças)
- CV = Carga viral
- DAB = Diaminobenzidina
- DNA= *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DP = Desvio padrão
- DST = Doença sexualmente transmissível
- EDTA = *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiaminotetracético)
- FOXP3 = *Forkhead box protein P3*
- GL = Grau de liberdade
- HPV = *Human Papillomavirus* (papilomavirus humano)
- IHQ = Imuno-histoquímica
- IL = Interleucina
- INF = Interferon
- IST = Infecção sexualmente transmissível
- LC = *Langerhans cell* (célula de Langerhans)
- MCP I = *Human monocyte chemoattractant protein-1* (proteína quimioatrativa de monócitos e macrófagos I)
- MHC I = *Major Histocompatibility Complex I* (complexo principal de histocompatibilidade I)
- MHC II = *Major Histocompatibility Complex II* (complexo principal de histocompatibilidade II)
- MIP-3 alfa = *Macrophage inflammatory protein-3 alpha* (proteína inflamatória do macrófago-3)
- mL = Mililitro
- NF-κB = *Nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)

NIC = Neoplasia intraepitelial cervical

NILM = Negativo para lesão intraepitelial e malignidade

OMS = Organização Mundial da Saúde

p53 = Proteína supressora de tumor p53

PBS = *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PCR = *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pRb = Proteína do retinoblastoma

RT-PCR = *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa)

RFLP= *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RQ-PCR = *Real-Time Quantitative Polymerase Chain reaction* (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)

TGF- β = *Transforming growth factor- β* (Fator de transformação do crescimento beta)

TNF = *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

Th1 = Células T helper do tipo 1

Th2 = Células T helper do tipo 2

TLR = *Toll-like receptor* (receptor do tipo Toll)

Treg = Células T regulatórias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Histórico	23
2.2 Epidemiologia do HPV e do câncer cervical	24
2.3 Transmissão e fatores de risco para aquisição da infecção	26
2.4 Fatores de risco para o câncer cervical	27
2.5 Sistema imune da pele	27
2.5.1 Sistema imune epitelial cervical e o HPV.....	28
2.5.2 Queratinócitos.....	28
2.5.3 Células de Langerhans.....	29
2.5.4 Macrófagos.....	30
2.5.5 Células T regulatórias (Tregs).....	31
2.5.6 Citocinas.....	31
2.5.6.1 Interleucina-10.....	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Caracterização do estudo	37
4.2 Local da pesquisa	37
4.3 Sujeito da pesquisa	37
4.4 Procedimentos e técnicas	38
4.4.1 Imuno-histoquímica de marcação dupla.....	38
4.4.2 Imuno-histoquímica de marcação simples.....	41
4.5 Avaliação quantitativa das lâminas	42
4.6 Análise estatística	43
4.7 Aspectos éticos	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Análise histopatológica, genotipagem e carga viral	44
5.2 Análise imuno-histoquímica	48
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	67
8 REFERÊNCIAS	69

APÊNDICE 81
ANEXO 82

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo HPV é frequente na população sexualmente ativa e considerada um fator fundamental para o desenvolvimento do câncer cervical. O HPV induz a carcinogênese cervical por meio dos oncogenes virais E6 e E7, que inibem, respectivamente, a atividade das proteínas p53 e pRb no controle da replicação celular, provocando divisão celular com instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada, conduzindo eventualmente ao desenvolvimento de lesões neoplásicas.

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública mundial devido a sua alta prevalência e seus altos índices de morbimortalidade. Constitui-se o segundo tumor maligno mais prevalente em mulheres de todo o mundo e a principal causa de morte por câncer entre indivíduos do sexo feminino de países emergentes.

Estudos demonstram a associação entre o desenvolvimento neoplásico cervical e o estado imunológico das pacientes. Um importante mecanismo de escape do sistema de vigilância imunológica desenvolvido pelo HPV, que também corrobora o desenvolvimento neoplásico, é a indução de um microambiente imunossuprimido pela produção da citocina IL-10 por diferentes fenótipos celulares. A IL-10 tem potentes efeitos inibidores sobre a resposta inflamatória e proliferação de células T, atuando a partir da depressão da produção de citocinas com perfil Th1 e inibição da apresentação de antígenos pelas APC profissionais.

A compreensão da influência do HPV na indução da produção da IL-10 por diferentes fenótipos celulares e sua consequente ação sobre as respostas anti-virais e anti-tumorais é de grande relevância para elucidar fatores que contribuem para a persistência da infecção por esse vírus e evolução das lesões neoplásicas, permitindo o desenvolvimento de estratégias profiláticas, terapêuticas e prognósticas no combate ao câncer cervical.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A descrição de verrugas palmares, plantares e genitais é observada em relatos históricos datados desde antes de Cristo. O condiloma acuminado é uma doença conhecida desde o tempo de Hipócrates (460-370 aC). A palavra "condiloma" vem do grego *kondiloma*, que significa "tumor redondo". Associado ao termo "acuminado" traduz-se por "tumor redondo e pontudo", sendo esse último adjetivo derivado da palavra latina *acuminatum* (BÄFVERSTEDT, 1967).

Inúmeras teorias foram criadas tentando explicar a causalidade das verrugas genitais, dando origem a muitas controvérsias. O surto de sífilis na Europa no final do século XV despertou interesse ainda maior pelas doenças genitais. Muitas delas, como gonorreia e sífilis, foram atribuídas ao mesmo agente causal, o "veneno venéreo". Esta teoria levou muitos médicos a considerarem as verrugas anogenitais como uma manifestação da sífilis (RIGONI-STERN, 1842).

Tal teoria foi abandonada e substituída por outra visão errônea de que as lesões estavam, na verdade, ligadas a gonorreia. Médicos do século XIX observaram que os condilomas apareciam em inúmeros pacientes no fim da infecção por gonorreia e, por isso, passaram a chamá-las de "Verrugas Gonorreicas". No entanto, em 1879, após a descoberta do gonococo, agente causal da gonorreia, por Albert Neisser, tornou-se claro que muitos pacientes com condiloma não relatavam sinais de infecção gonocócica prévia, pondo fim à hipótese da relação entre as duas doenças (RIGONI-STERN, 1842).

No final do século XIX foi descoberta a causa infecciosa das verrugas. Em 1891, o médico inglês Joseph F. Payne descreve em seu artigo *On the contagiousness of common warts* o desenvolvimento de verrugas em seu próprio polegar, depois de se auto-inocular raspando a superfície de uma lesão verrucosa de uma criança (PAYNE, 1891). O fato de muitos pacientes que apresentavam verrugas genitais manifestarem também verrugas em suas mãos e a semelhança histológica entre as lesões foram úteis como evidências para elucidar que os condilomas acuminados e as verrugas comuns de pele poderiam ser causadas pelo mesmo agente etiológico (ORIEL, 1971).

No início do século XX, Ciuffo (1907) demonstrou a natureza viral das verrugas genitais ao observar que um extrato de verruga genital era capaz de transmitir a doença, mesmo havendo sido filtrado de forma a eliminar bactérias e fungos, mas não vírus.

Em 1949, utilizando microscópio eletrônico, Maurice Strauss descobre partículas semelhantes a vírus em amostras de papilomas da pele. Um ano mais tarde, Strauss identifica o HPV como o agente etiológico das verrugas (GARFIELD,1988).

No final da década de 1970, foram identificados diversos tipos de HPV em lesões de pele e de mucosas (verrugas, displasias epiteliais e carcinomas de cérvix uterina e de pênis), que reforçou a importância médica desse vírus (ZUR HAUSEN, 1976). Harald zur Hausen publicou, nesta época, a hipótese de que o HPV desempenha importante papel na gênese do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 1976). Mais tarde, identificou os tipos de HPV16 e 18 como mais prevalentes em biópsias de câncer cervical (BOSHART *et al.*,1984), que serviu de base para o desenvolvimento da vacina contra o HPV, introduzida no mercado em 2006. Por sua pesquisa, zur Hausen recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2008.

Ao longo dos anos, a ciência progrediu na profilaxia, diagnóstico e tratamento das lesões causadas pelo HPV. Atualmente, estudos epidemiológicos e clínicos trazem evidências de que a infecção por esse vírus é uma condição fundamental para o desenvolvimento do carcinoma cervical (ROHAN, BURK, FRANCO, 2003). A fim de limitar a propagação do HPV e minimizar a morbimortalidade por ele desencadeada, têm-se investido em medidas preventivas (realização de exames de Papanicolau, educação sexual e vacinação). Grande parte dos estudos de hoje buscam compreender os mecanismos de evasão viral às linhas de defesa do organismo, visando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na imunoterapia para o tratamento das neoplasias desencadeadas pelo HPV.

2.2 Epidemiologia do HPV e do câncer cervical

A infecção pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) viral mais frequente na população sexualmente ativa, haja vista que, em algum momento da vida, a maioria das pessoas é exposta ao vírus (SAN JOSÉ *et al.*, 2007). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que mais de 50% dos indivíduos

sexualmente ativos no mundo serão infectados pelo HPV ao longo da vida e que mais de 80% das mulheres adquirem a infecção por HPV até os 50 anos de idade (SASLOW *et al.*, 2007).

Na população feminina, o HPV apresenta dois picos de prevalência: um mais elevado em mulheres jovens, com queda gradual com a idade, e outro entre a quarta e quinta década de vida. Adolescentes sexualmente ativas apresentam maiores taxas de prevalência da infecção pelo HPV, com mais de 50% desenvolvendo infecção dentro de 2 a 3 anos após o início da atividade sexual (MOSCICKI, 2007). Acredita-se que o segundo pico de infecção reflete a perda da imunidade original contra o vírus ao qual estas mulheres foram expostas previamente (FRANCO, HARPER, 2005).

Além da alta frequência, a importância da infecção pelo HPV reside no fato desse vírus estar relacionado com o desenvolvimento de lesões na pele, nas mucosas e no trato genital. Por esse motivo, pode ser dividido em tipo cutâneo ou mucoso (SANCLEMENT, GILL, 2002).

O tipo cutâneo é encontrado na população em geral e causa verrugas comuns. O tipo mucoso infecta as células basais do epitélio estratificado escamoso e as células metaplásicas da junção escamo-colunar do colo do útero, podendo ainda ser classificado em tipos de alto e baixo risco oncogênico de acordo com seu potencial de desenvolvimento de câncer cervical. Os de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 51, 53, 54, 57, 66, 70, 73, 82, 83 e 84) estão associados às lesões benignas e os de alto risco (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 55, 56, 58, 59 e 68) geralmente associam-se às lesões precursoras de câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Em torno de 90% das infecções pelo HPV regridem espontaneamente em um período de 24 meses. A minoria evolui para lesões neoplásicas. A nomenclatura das lesões precursoras de câncer cervical foi revista em 2001, classificando as NIC I como lesões de baixo grau e as NIC II e III como lesões de alto grau. As alterações celulares que não podem ser classificadas como neoplasia intraepitelial cervical, mas merecem uma investigação melhor são classificadas como células escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas (ASC-US), e células escamosas atípicas de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) (SASLOW *et al.*, 2007).

Atualmente, são conhecidos mais de 200 subtipos diferentes de HPV e cerca de 20 destes possuem tropismo pelo trato genital inferior. Embora a distribuição dos tipos de HPV varie de acordo com a região geográfica, os tipos HPV 16 e 18 são os mais frequentemente associados ao câncer cervical, sendo responsáveis por cerca de 75% dos casos de câncer de colo uterino (BRASIL, 2002).

O câncer do colo do útero é uma das neoplasias malignas mais frequentes no sexo feminino, acometendo principalmente mulheres de países emergentes e, sobretudo, grupos socialmente vulneráveis. De acordo com estimativas da *International Agency for Research on Cancer* (2013), em 2012 o câncer cervical fez 528 mil novos casos no mundo, sendo responsável pelo óbito de 266 mil mulheres, dos quais 87% ocorreram em países em desenvolvimento.

Apesar dos esforços das autoridades brasileiras para reduzir a incidência e mortalidade pelo câncer de colo de útero, os casos ainda são recorrentes. Estima-se que 15.590 novos casos tenham ocorrido em 2014, representando o quarto tumor mais frequente na população feminina brasileira, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma, mama e colon e reto. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.3 Transmissão e fatores de risco para aquisição da infecção

A infecção pelo HPV acontece mediante a penetração do vírus no epitélio através de microlesões e sua adesão às células basais com o auxílio dos receptores de superfície, como integrina alfa-6 e receptores do fator de crescimento epidérmico (EVANDER *et al.*, 1997; SURVILADZE, DZIDUSZKO, OZBUN, 2012). A transmissão do HPV pode ocorrer pelo contato sexual, não-sexual e materno fetal. A transmissão via fômites, embora rara, também pode ocorrer, como em caso de exposição prolongada a peças íntimas compartilhadas e contaminadas (AULT, 2006). No entanto, acredita-se que a principal via de transmissão do HPV seja a sexual, haja vista que o HPV genital está ausente na maioria das mulheres que não possui vida sexual ativa (SHIMADA *et al.*, 2007).

Os principais fatores associados ao risco para aquisição da infecção pelo HPV genital relacionam-se ao comportamento sexual, como o número de parceiros sexuais, história de doença sexualmente transmissível (DST) e idade precoce da primeira relação sexual. Embora eficaz em prevenir a transmissão de outras DST, o uso de preservativo pode não proteger adequadamente os indivíduos à exposição

ao HPV, pois este vírus pode ser transmitido pelo contato com tecidos infectados que não são protegidos pelo preservativo (BURD, 2003).

2.4 Fatores de risco para o câncer cervical

Existem vários fatores que podem estar envolvidos na evolução do câncer de colo de útero, sendo consenso que a infecção pelo HPV, sua carga viral e persistência são os principais fatores envolvidos na evolução das lesões pré-neoplásicas (SCHLECHT *et al.*, 2003).

A infecção por HPV contribui para o desenvolvimento da carcinogênese por meio dos oncogenes virais E6 e E7. As oncoproteínas derivadas desses genes inibem a atividade das proteínas p53 e pRb no controle da replicação celular, provocando o aumento da divisão celular com instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada, conduzindo eventualmente ao desenvolvimento de lesões neoplásicas (BURD, 2003).

No entanto, para que ocorra o câncer cervical é necessária a associação com outros fatores de risco que atuam como cofatores. Destacam-se o tabagismo, a genética, dieta, multiparidade e o uso de contraceptivos orais (GARCÍA-CLOSAS *et al.*, 2005).

Vários estudos demonstram associação entre a progressão neoplásica relacionada ao HPV e o estado imunológico da paciente. Os mecanismos exatos que geram uma resposta imune eficiente contra as lesões provocadas pelo HPV, no entanto, não são ainda totalmente conhecidas. Sabe-se que a participação do sistema imune é fator crucial na evolução da infecção pelo HPV, pois pode eliminar o vírus ou permitir sua persistência no hospedeiro (PINTO, TULIO, CRUZ, 2002).

2.5 Sistema imune da pele

O tecido epitelial, como interface primária entre o corpo e o meio ambiente, fornece a primeira linha de defesa contra microrganismos e injúrias físicas e químicas. Entretanto, a pele não é apenas uma barreira físico-mecânica entre o ambiente e o corpo, mas alberga também importantes constituintes do sistema imunológico.

A função coordenada das várias populações de células da epiderme e derme permite que sejam desenvolvidas rápidas e efetivas respostas a uma grande variedade de injúrias. O sistema imune da pele é composto, principalmente, por queratinócitos, células de Langerhans, macrófagos e linfócitos circulantes. Também são encontrados mediadores inflamatórios solúveis e outros fatores da resposta imune (BRAFF *et al.*, 2005, SENESCHAL *et al.*, 2012).

2.5.1 Sistema imune epitelial cervical e o HPV

Do ponto de vista evolutivo, o HPV é um agente infeccioso bem sucedido, pois é capaz de induzir infecção crônica sem levar o hospedeiro à morte. Embora, após a infecção pelo HPV, a maioria dos indivíduos desenvolva uma resposta imune específica mediada por células, que conduz ao *clearance* viral, em uma pequena proporção dos infectados a infecção persiste, podendo levar a lesões pré-invasivas do câncer de colo de útero (TROTIER, FRANCO, 2006).

A falta de uma resposta imune eficaz contra este vírus está relacionada com a resposta efetora ineficiente do sistema imune do hospedeiro, o que facilita a persistência viral. Isso é possível porque o HPV desenvolveu várias estratégias para evadir do sistema imunológico humano. O entendimento das interações celulares e moleculares entre o sistema imune e o HPV é de extrema relevância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no combate ao câncer cervical (PINTO, TULIO, CRUZ, 2002).

2.5.2 Queratinócitos

Os queratinócitos são importantes e muitas vezes subestimados participantes da resposta imune cutânea. Constituinte cerca de 95% do epitélio cervical, além de conferir a propriedade de barreira física contra patógenos, os queratinócitos participam de muitos mecanismos de defesa ativa, sendo portanto, peça fundamental tanto para a resposta imune inata quanto adaptativa (COLEMAN, STANLEY, 1994).

Por meio da ativação do fator nuclear NF- κ B, via receptores de reconhecimento padrões *Toll-like*, os queratinócitos produzem mediadores imunológicos antimicrobianos importantes para manutenção da homeostase epitelial,

tais como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e peptídeos antimicrobianos (β -defensinas), constituindo a principal fonte epitelial de citocinas (KOLLISCH *et al.*, 2005).

Queratinócitos têm o potencial de apresentação de antígenos virais por expressarem MHC de classe I e II quando estimulados. Contudo, pelo fato de não expressarem moléculas co-estimulatórias acabam induzindo um estado de tolerância ou anergia nos linfócitos (BRAFF *et al.*, 2005).

Quando infecta os queratinócitos das camadas basais, o HPV se estabelece no interior do núcleo dessas células, causando mudanças na sua forma, na função de seus componentes celulares e no padrão de secreção dos seus mediadores. Por mecanismos ainda não bem esclarecidos, os queratinócitos infectados pelo HPV são induzidos a produzir IL-10 e outras citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-6 e IL-13. Esse microambiente imunorregulatório contribui para a mudança da resposta de outras células do sistema imunológico inato e adaptativo, como células de Langerhans, macrófagos e linfócitos T CD4+, para um perfil imunorregulatório e, conseqüentemente, para a manutenção da infecção viral e desenvolvimento de lesões no epitélio cervical (SANCLEMENTE, GILL, 2002).

2.5.3 Células de Langerhans

As células de Langerhans são uma população altamente especializada na apresentação de antígenos. São consideradas sentinelas que patrulham o epitélio na captura de patógenos invasores e células malignas, processando seus antígenos e enviando-os para os linfonodos, onde os linfócitos T *naive* são ativados e desencadeiam uma resposta eficaz antimicrobiana ou antitumoral. Essa resposta é dependente da participação de citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas produzidas pelos queratinócitos (GIANNINI *et al.*, 2002; SANCLEMENTE, GILL, 2002).

Em lesões causadas pelo HPV, tanto o número quanto a função das células de Langerhans estão comprometidas. A proteína viral E7 inibe os genes que medeiam a produção de INF- α e β pelos queratinócitos (HUM *et al.*, 2002). A falta dessas citocinas somada à produção de IL-10 pelos queratinócitos infectados reduz o número de células de Langerhans na região e prejudica sua capacidade de apresentação de antígeno, pois inibem sua ativação e migração para os linfonodos

(GIANNINI *et al.*, 2002). Além disso, esse microambiente imunorregulatório induz esta população celular a produzir IL-10, afetando ainda mais a resposta imune contra o HPV e as mutações a ele relacionadas. Alguns autores sugerem que a depleção intraepitelial das células de Langerhans associada à infecção pelo HPV, juntamente com outras imunodeficiências locais, contribuam significativamente para uma infecção mais prolongada e aumento do potencial de malignidade (MEMAR, STEPHEN, TYRING, 1995; TAUBE *et al.*, 2007).

2.5.4 Macrófagos

Os macrófagos são uma população heterogênea de células mieloides inatas originárias a partir de precursores monocíticos do sangue. Assim como as células de Langerhans, os macrófagos são importantes apresentadores de antígenos (APC), visto que expressam moléculas de MHC de classe I e II, além de moléculas co-estimulatórias (MANTOVANI *et al.*, 2002).

Existem dois estados de polarização diferentes de macrófagos. Em resposta à ativação de sinais de perigo emitidos por produtos bacterianos ou IFN- γ , os macrófagos adquirem um fenótipo M1, que apresenta um perfil efetor, podendo fagocitar e matar células alvo, atrair e ativar células do sistema imune inato e adaptativo e produzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-12. Os macrófagos M2, por sua vez, desenvolvem-se em resposta ao estímulo de citocinas imunorregulatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13 e estão associados com a produção elevada de IL-10, IL-1b, VEGF e metaloproteinases da matriz, sendo, portanto sua presença um mau prognóstico em tumores cervicais, pois suprimem as respostas de células T CD8 +, recruta células T reguladoras para o microambiente tumoral e contribui para a invasão tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2002).

Observa-se que em lesões de alto grau, a redução no número de células de Langerhans no infiltrado tumoral é acompanhada do aumento de macrófagos infiltrantes, refletindo em pior prognóstico para o desenvolvimento do tumor. Supõe-se que tal fato deva-se à presença de macrófagos do perfil M2, que corrobora a persistência da infecção viral e a proliferação neoplásica através da potencialização da resposta imunorregulatória no microambiente tumoral pela secreção de citocinas imunorreguladoras e de perfil Th2, tais como IL-10, TGF- β , IL-4, IL-6 e IL-13 (KOBAYASHI *et al.*, 2008).

2.5.5 Células T regulatórias (Treg)

As células Treg desempenham um papel importante no controle da resposta imune em curso e no silenciamento de células T auto-reativas, sendo, portanto, de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imunológico. As Treg são alvos de intensas pesquisas que especulam sua função como reguladoras das respostas imunes fisiológicas e sua participação em diversas enfermidades, como doenças infecciosas, alérgicas, auto-imunes e neoplásicas (AFZALI *et al.*, 2007; DELEEUW *et al.*, 2012; SAKAGUCHI *et al.*, 2001).

A infecção pelo HPV desencadeia a produção de IL-10 pelas células do sistema imune inato. A presença desta citocina e de outros mediadores induzidos pelo HPV, como a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase, gera a mudança de fenótipo dos linfócitos T CD-4+ *naive* para células Treg, além de recrutar e ativar Treg naturais de outras regiões para o microambiente infectado. Frequentemente, Tregs têm sido observadas infiltrando massas tumorais cervicais, especialmente na fase precoce da progressão do tumor. No câncer do colo de útero, essa população celular desempenha um papel importante na evasão imune do tumor por suprimir a produção das citocinas inflamatórias IL-1, INF- α , INF- β , IL-2, e a proliferação de células T antígeno-específicas (KOJIMA *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2007).

2.5.6 Citocinas

As citocinas são geralmente compostos peptídicos produzidos por diversas populações celulares, tanto linfóides quanto não linfóides. No colo uterino, a maior produção dessas substâncias fica a cargo dos queratinócitos. As citocinas são pró-inflamatórias ou primárias, como TNF- α e IL-1, quando induzem a expressão de moléculas de adesão e a síntese de outros mediadores (citocinas secundárias ou quimiocinas) que ativam as células linfóides e atuam na quimiotaxia (GONÇALVES, DONADI, 2004).

Além disso, são relevantes as citocinas imuno-estimulatórias ou com padrão Th1, como a IL-2, IL-12 e o IFN- γ , que promovem a imunidade celular, as quais são necessárias para uma resposta efetiva contra patógenos intracelulares e células tumorais. A IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 são exemplos de citocinas importantes na imunidade humoral contra patógenos extracelulares e respostas alérgicas. A IL-10 é

considerada um citocina imunorregulatória, mas as demais se encaixam em um padrão Th2 da resposta imune (BAIS *et al.*, 2007).

As citocinas que são produzidas no microambiente do tumor têm um papel importante na patogênese do câncer. Nas infecções por HPV, por este se tratar de um patógeno intracelular, a melhor resposta seria estimulada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e imuno-estimulatórias. No entanto, observa-se que em lesões de alto grau induzidas por HPV há um aumento na expressão de IL-4, TGF- β e IL-10 e diminuição da expressão de IL2, IL-12 e IFN- γ , refletindo num ambiente imunorregulatório e com predomínio da resposta Th2, o que constitui um mau prognóstico por não ser eficaz para desencadear o *clearance* viral (ADURTHI *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2007). A compreensão mais detalhada das interações entre citocinas e células tumorais oferece novas oportunidades para compreensão mais aprofundada da gênese, evolução e invasão do tumor.

2.5.6.1 Interleucina-10

A IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora produzida por muitas populações de células. A sua principal função biológica parece ser a modulação e interrupção de respostas inflamatórias e a regulação da diferenciação e da proliferação de várias células do sistema imunológico, tais como as células T, células B, células *Natural Killer*, células apresentadoras de antígenos, mastócitos e granulócitos. Ademais, numerosas investigações *in vitro* e *in vivo* apontam a importância da IL-10 em doenças inflamatórias, auto-imunes e neoplásicas (SAKAGUCHI *et al.*, 2001).

No colo do útero, a produção da IL-10 atua como um mecanismo imunossupressor que favorece o desenvolvimento de tolerância imunológica em detrimento da resposta efetora aos antígenos de HPV, contribuindo para o desenvolvimento do câncer. A IL-10 inibe a expressão de moléculas co-estimulatórias (B7-1/B7-2) e de MHC de classe II em células de Langerhans e macrófagos, além de limitar a produção de citocinas de perfil Th1 e pró-inflamatórias. Tal fato, afeta diretamente a apresentação de antígenos pelas APC profissionais, pois além de não migrarem para os linfonodos a fim de ativarem e recrutarem grande quantidade de linfócitos T antígeno-específicos para o foco da

infecção, a ausência dos estímulos de co-ativação adequados induzem um perfil de tolerância ou anergia nos linfócitos (MOORE *et al.*,2001; COUPER *et al.*, 2008).

Sabe-se que no carcinoma cervical os queratinócitos, células de Langerhans, macrófagos e Treg adquirem a capacidade de produzir IL-10 (SANCLEMENTE, GILL, 2002; TAUBE *et al.*, 2007; KOBAYASHI *et al.*,2008; KOJIMA *et al.*,2013). No entanto, são escassos os dados sobre qual dessas populações celulares representaria a principal responsável pela imunorregulação mediada por IL-10, qual o estímulo responsável pela mudança de perfil efetor para imunorregulador dessas células e, ainda, qual seria a influência do microambiente imunorregulador sobre a resposta efetora de outras células do sistema imune.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar os fenótipos celulares com função imunorregulatória em amostras de cérvix uterina.

3.2 Específicos

- a) Identificar os fenótipos celulares responsáveis pela produção da citocina imunorregulatória IL-10 em amostras com e sem lesões cervicais;
- b) Associar a quantidade de células imunorregulatórias com características histopatológicas, epidemiológicas e virológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Este estudo caracterizou-se como descritivo, observacional de corte transversal, baseado na identificação dos diferentes fenótipos celulares com perfil imunorregulatório e avaliação da expressão de MHC de classe II pelas células presentes no microambiente imunorregulado pela citocina IL-10.

4.2 Local da pesquisa

O desenvolvimento deste estudo, por permissão da direção do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, realizou-se no laboratório de Imunologia Básica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande-MS.

4.3 Sujeito da pesquisa

Oitenta e quatro amostras de biópsia de colo de útero foram selecionadas de forma não probabilística por conveniência. Parte dessas amostras foi previamente submetida à quantificação do HPV-DNA e tipagem viral. A quantificação foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RQ-PCR), utilizando o *kit SuperScript III Platinum TwoStepqRT PCR com Sybr green*, de acordo com as orientações do fabricante. Para fins de análise dos dados, a carga viral foi ordenada em escores de 0 a 2, onde 0 representa ausência de partículas virais (CV 0), 1 carga viral entre 1.500 a <10.000 partículas virais/mL (CV 1) e 2 carga viral \geq 10.000 partículas virais/mL (CV 2). Para tipagem viral, foi realizada PCR comum associado ao Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (RFLP). Os *primers* utilizados foram os descritos por Payan *et al.*, (2007).

Outra parte das amostras foi incluída em parafina e enviada para análise histopatológica e imuno-histoquímica. Quanto à classificação histopatológica, conforme normatização do Sistema Bethesda (IARC, 2007), as amostras foram classificadas em:

- NIC I: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I

- NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II
- NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III
- CA: Câncer cervical invasivo

4.4 Procedimentos e técnicas

4.4.1 Imuno-histoquímica de marcação dupla

A técnica de dupla marcação por imuno-histoquímica foi utilizada para identificar os diferentes fenótipos celulares (células de Langerhans: S-100+; macrófago: CD11b+ e CD68+; e Treg: Foxp3+) produtores da citocina imunorregulatória IL-10 (fig. 1). A detecção simultânea dos diferentes fenótipos produtores de IL-10 foi desenvolvida em lâminas distintas. Para revelação da reação, foi utilizado o kit EnVision™ G|2 Doublestain System (Dako Denmark A/S, Carpinteria, CA, USA), composto por seis reagentes, identificados numericamente de 1 a 6. Controles positivos e negativos (sem adição dos anticorpos primários) foram desenvolvidos utilizando-se cortes histológicos de tonsila humana.

Figura 1 – Fenótipos celulares pesquisados por imuno-histoquímica em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande – MS, 2012 (n=84).

Fenótipo celular	Tipo de marcação	Anticorpo
Células T regulatórias produtoras de IL-10	Dupla	Anti-Foxp3 + Anti-IL-10
Células de Langerhans produtoras de IL-10	Dupla	Anti-S100 + Anti-IL-10
Macrófagos CD68+ produtores de IL-10	Dupla	Anti-CD68 + Anti-IL-10
Macrófagos CD11b+ produtores de IL-10	Dupla	Anti-CD11b + Anti-IL-10

Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos a partir de material incluídos em parafina e, em seguida, depositados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA).

A desparafinização foi realizada em estufa à 60°C por 24 horas e posterior banho em xilol por 30 minutos a 60°C. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80% e 50%) por 30 segundos e submetidos à recuperação antigênica em calor úmido com tampão ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM pH 8,0. As lâminas permaneceram sob pressão máxima de panela de pressão por dois minutos e meio. Após resfriamento dos cortes por 20 minutos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com três banhos de 5 minutos com peróxido de hidrogênio a 10%. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e em salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,2, por 5 minutos. Posteriormente, aplicou-se 100 µL do bloqueador de enzimas endógenas do kit EnVision™ sobre os cortes e incubou-se por 5 minutos. Decorrido o tempo, lavou-se novamente com PBS.

O anticorpo anti-IL-10 foi diluído com diluente universal de anticorpo (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) na proporção constante na figura 2. Aplicou-se 100 µL do anticorpo diluído em cada lâmina e incubou-se em câmara úmida à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS para remoção do anticorpo não ligado.

Figura 2 – Especificação e diluição empregada para os anticorpos utilizados na reação de imuno-histoquímica das amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande – MS, 2012 (n=84).

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição
Anti-Foxp3	eBioscience	236A/E7	1:50
Anti-S100	Invitrogen	M03	1:500
Anti-CD68	eBioscience	KP1	1:500
Anti-CD11b	eBioscience	ICRF44	1:50
Anti-IL-10	Invitrogen	945A2A5	1:50
Anti-MHC II	Dako	TAL.1B5	1:500

Em seguida, aplicou-se 100 µL de Polímero / HRP (reagente 1) sobre os cortes e incubou-se por 20 minutos, seguindo-se nova lavagem. A solução de Diaminobenzidina (DAB) (reagente 2) foi preparada conforme instruções do fabricante sendo posteriormente aplicados 100 µL sobre as lâminas seguido de incubação por 10 minutos. Decorrido o tempo, os espécimes foram lavados cuidadosamente com água deionizada, recolhendo-se o resíduo em recipiente plástico para posterior descarte junto a materiais de risco biológico.

Finalizada a primeira marcação, procedeu-se a aplicação do reagente *Doublestain Block* (reagente 3), incubando-se as lâminas por 3 minutos, seguida de nova lavagem com PBS. Para identificação do segundo antígeno (marcadores fenotípicos), 100 µL do novo anticorpo primário foi aplicado sobre os cortes, com incubação de 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. A diluição de todos os anticorpos utilizados encontra-se na figura 2. As lâminas foram novamente lavadas para remoção do anticorpo não ligado e na sequência, aplicou-se 100 µL do reagente *Link* (reagente 4), incubando-se por 10 minutos.

Após lavagem com PBS, aplicou-se 100 mL de Polímero/AP (reagente 5) sobre os espécimes, incubou-se por 20 minutos e, novamente, lavou-se com PBS. A identificação do antígeno foi revelada com adição da solução cromógena *Permanent Red* (reagente 6), preparada conforme instruções do fabricante. Aplicou-se 100 µL desta sobre as lâminas e incubou-se por 10 minutos. Decorrido o tempo, os espécimes foram lavados cuidadosamente com água deionizada, recolhendo-se o resíduo em recipiente plástico para posterior descarte junto a materiais de risco biológico, e contra-corados em hematoxilina de Harris. Finalmente, os cortes foram desidratados com banhos em concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e 3 banhos de xilol por 30 segundos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com Entelan[®] (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Germany) para posterior análise.

4.4.2 Imuno-histoquímica de marcação simples

A técnica de marcação simples por imuno-histoquímica foi utilizada para identificar APC e queratinócitos expressando MHCII e queratinócitos produtores da citocina imunorregulatória IL-10. A detecção dos queratinócitos foi baseada nas características histológicas peculiares deste fenótipo celular, não necessitando, portanto, de marcação fenotípica específica, conforme observado em estudos anteriores (KOLLISCH *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 1999). Para revelação da reação de imuno-histoquímica, foi utilizado o sistema *HiDef DetectionTM* (Cell Marque, Rocklin, CA, USA), composto por dois reagentes, descritos a seguir como reagentes 1 e 2. Controles positivos e negativos (sem adição dos anticorpos primários) foram desenvolvidos utilizando-se cortes histológicos de tonsila humana.

Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos a partir de material incluídos em parafina e, em seguida, depositados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxi-silano (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). A desparafinização foi realizada em estufa à 60°C por 24 horas, seguida de banho em xilol por 30 minutos à 60°C. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80% e 50%) por 30 segundos e submetidos à recuperação antigênica em calor úmido com tampão EDTA 10 mM (pH 8,0) para IL-10 e Citrato 10mM (pH 6,0) para MHCII. As lâminas permaneceram sob alta pressão por dois minutos e meio. Após resfriamento dos cortes por 20 minutos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com três banhos de 5 minutos com peróxido de hidrogênio a 10%. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e em PBS (pH 7,2) por 5 minutos.

Os anticorpos anti-MHCII e anti-IL-10 foram diluídos com diluente universal de anticorpo (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) na proporção constante na figura 2. Aplicou-se 100 µL do anticorpo diluído em cada lâmina e incubou-se em câmara úmida à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS para remoção do anticorpo não ligado.

Aplicou-se, em seguida, duas gotas do reagente Amplificador (reagente 1) sobre o tecido e incubou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, aplicou-se duas gotas do reagente Polímero / HRP (reagente 2) e incubou-se durante 20 minutos, seguido de nova lavagem.

A solução de Diaminobenzidina (DAB) (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) foi preparada conforme instruções do fabricante. Aplicou-se 100 μ L desta sobre as lâminas e incubou-se por 10 minutos. Decorrido o tempo, os espécimes foram lavados cuidadosamente com água deionizada, recolhendo-se o resíduo em recipiente plástico para posterior descarte junto a materiais de risco biológico, e contra-corados em hematoxilina de Harris. Finalmente, os cortes foram desidratados com banhos em concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e 3 banhos de xilol por 30 segundos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com Entelan® (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Germany) para posterior análise.

4.5 Avaliação quantitativa das lâminas

As lâminas submetidas à técnica de imuno-histoquímica foram fotodocumentadas pela câmera fotográfica digital Moticam 2300 3.0 Megapixels acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse E200, utilizando-se aumento de 400x. Para a captura das imagens, utilizou-se o programa Motic Images Plus 2.0 e, para quantificação das células imunomarcadas, o software de análise de imagem digital ImageJ do *National Institutes of Health*, EUA com o pacote de *plugins* desenvolvido pela Universidade *MacMaster* (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>).

Foram capturadas 10 imagens de cada lâmina, com tamanho de 1.024x768 pixels com barra de escala de 10 μ m padronizada à marca do microscópio utilizado. A partir da barra de escala, converteu-se o tamanho das imagens de pixels para μ m no *software* ImageJ, utilizando-se a ferramenta *freehand line*. As imagens com dimensão padronizada de 1.024x768 pixels apresentaram 170,62x127,97 μ m. O *plugin* “*Colour Deconvolution*” do *software* ImageJ permite a separação da sobreposição de cores da dupla marcação, sendo fundamental para a identificação das células duplamente marcadas. Todas as imagens das lâminas submetidas à imuno-histoquímica de marcação dupla foram analisadas por este *plugin*. Utilizando-se o *plugin* “*Cell Counter*”, também do *software* ImageJ, foram contadas as células imunomarcadas em cada uma das imagens. O resultado final foi dado pela média das contagens das 10 imagens, expressa pela quantidade de células

imunomarcadas por mm² sem conhecimento prévio do grau de lesão das amostras analisadas.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi desenvolvida usando o programa estatístico SPSS 10.0. As tabelas de frequência foram analisadas utilizando o teste χ^2 , com 95% de intervalo de confiança. A correlação entre os resultados do histopatológico e da imuno-histoquímica foi calculada pelo teste de Kruskal Wallis.

4.7 Aspectos éticos

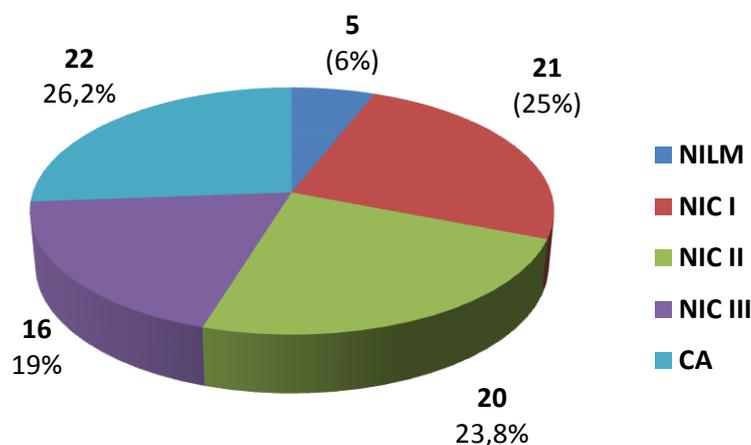
O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – CEP/UFMS sob o número 355.019 de 08 de agosto de 2013 (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica, genotipagem e carga viral

Neste trabalho foram estudadas 84 biópsias de cérvix uterina. Na figura 3, observa-se a distribuição das amostras segundo os achados histopatológicos.

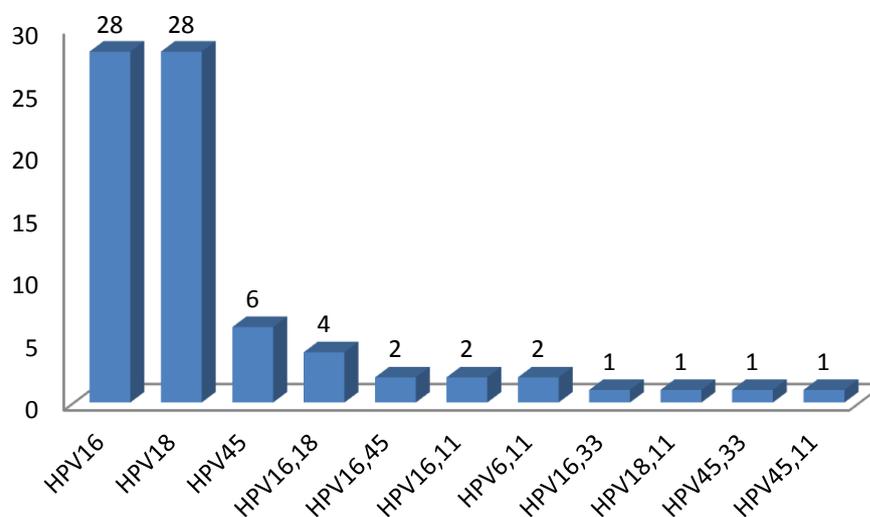
Figura 3 - Distribuição dos achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).



Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **NIC I**: neoplasia intraepitelial cervical de grau I; **NIC II**: neoplasia intraepitelial cervical de grau II; **NIC III**: neoplasia intraepitelial cervical de grau III; **CA**: carcinoma.

Dentre as amostras analisadas, 90,5% (76/84) foram positivas para HPV-DNA. Os tipos virais mais frequentes detectados nas amostras HPV positivas (n=76) foram o HPV16 (n=28, 36,8%), o HPV18 (n=28, 36,8%) e o HPV45 (n=6, 7,9%), sendo os tipos HPV16 e HPV18 responsáveis por 73,6% de todas as infecções. Na figura 4, observa-se a frequência dos tipos encontrados nas amostras positivas para HPV-DNA.

Figura 4 - Tipos de HPV encontrados em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012. (n=76).



Nos casos classificados como carcinoma e NIC III, foram encontrados apenas os tipos HPV16 e HPV18, os quais foram responsáveis também por 65% (13/20) das infecções em amostras classificadas como NIC II e 56,2% (9/16) nas NIC I (Tabela 1).

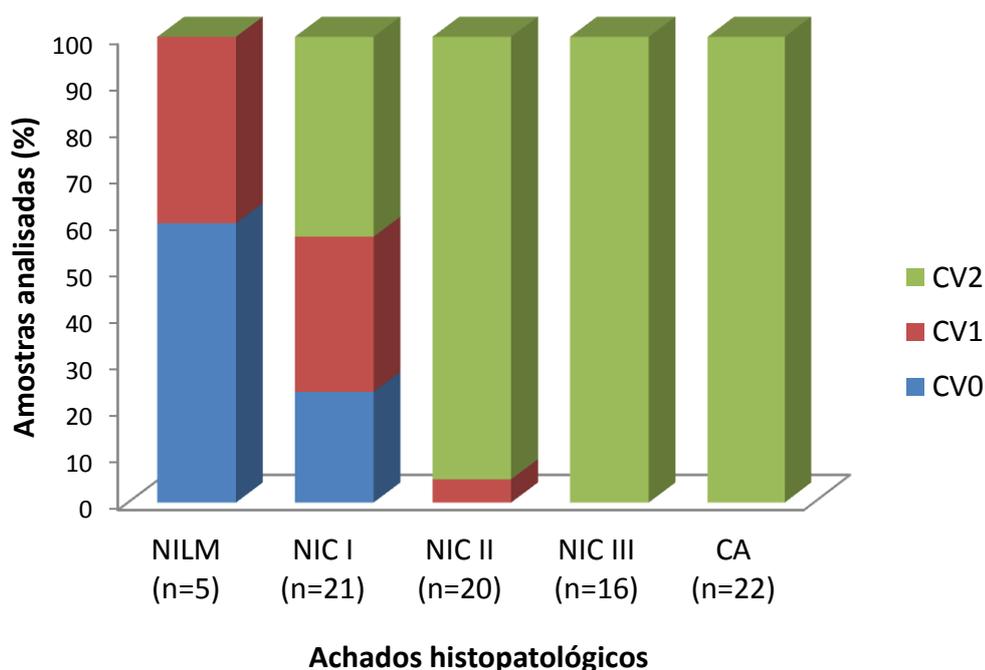
Tabela 1 - Distribuição dos genótipos de HPV segundo os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=76).

Genótipos	NILM		NIC I		NIC II		NIC III		CA	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
HPV 16	-	-	5	31,3	5	25,0	6	37,5	12	54,5
HPV 18	-	-	3	18,8	7	35,0	8	50,0	10	45,5
HPV 45	-	-	3	18,8	3	15,0	-	-	-	-
HPV 16 e 18	-	-	1	6,3	1	5,0	2	12,5	-	-
HPV 16 e 45	-	-	-	-	2	10,0	-	-	-	-
HPV 16 e 11	-	-	2	12,5	-	-	-	-	-	-
HPV 16 e 33	-	-	1	6,3	-	-	-	-	-	-
HPV 18 e 11	-	-	-	-	1	5,0	-	-	-	-
HPV 45 e 33	-	-	1	6,3	-	-	-	-	-	-
HPV 45 e 11	-	-	-	-	1	5,0	-	-	-	-
HPV 6 e 11	2	100	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	2	100,0	16	100,0	20	100,0	16	100,0	22	100,0

NILM: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **NIC I**: neoplasia intraepitelial cervical de grau I; **NIC II**: neoplasia intraepitelial cervical de grau II; **NIC III**: neoplasia intraepitelial cervical de grau III; **CA**: carcinoma.

Segundo a carga viral, 9,5% (8/84) das amostras foram classificadas como CV 0, 10,7% (9/84) como CV1 e 79,8% (67/84) como CV2. Todas as amostras com carcinoma e NIC III (n=22 e n=16, respectivamente), 95% (19/20) das NIC II e 43,7% (7/16) das NIC I tiveram a carga viral ≥ 10.000 cópias virais/mL ($\chi^2= 74,65$; GL= 6; $p<0,001$) (fig. 5).

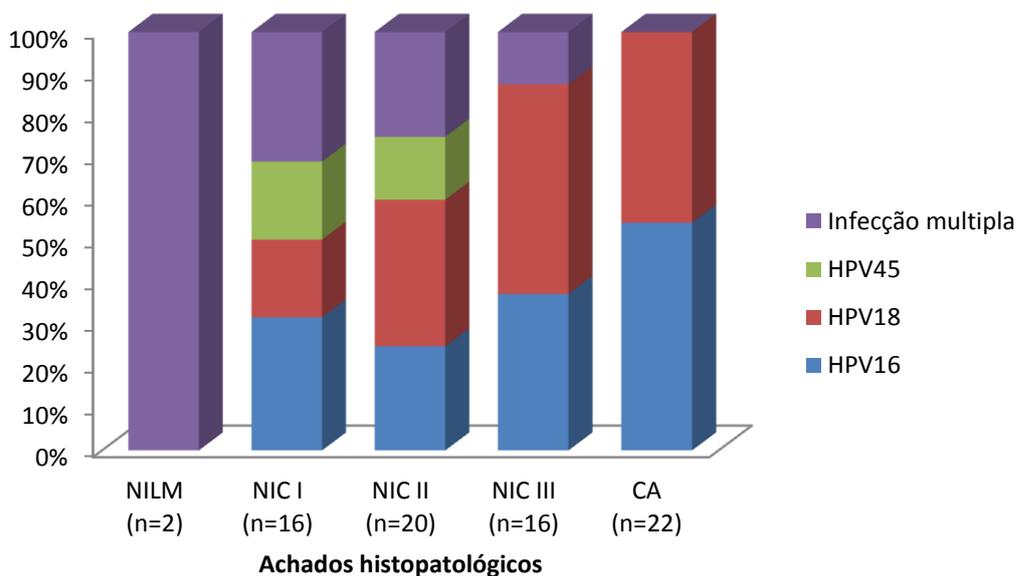
Figura 5 - Distribuição da carga viral do HPV de acordo com os achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).



Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **NIC I**: neoplasia intraepitelial cervical de grau I; **NIC II**: neoplasia intraepitelial cervical de grau II; **NIC III**: neoplasia intraepitelial cervical de grau III; **CA**: carcinoma. **CV0**: negativo para DNA-HPV; **CV1**: 1050 a <10.000 cópias virais/mL; **CV2**: ≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL.

Do total de amostras positivas, 81,6% (62/76) apresentaram apenas um tipo viral, com maior frequência atribuída aos tipos HPV16 (28/62, 45,2%) e HPV18 (28/62, 45,2%). Foram detectadas também infecções múltiplas (14/76, 18,4%), com predomínio do HPV16/HPV18 (4/14, 28,6%). Na figura 6, observa-se a distribuição dos tipos de HPV desenvolvendo infecção simples e múltiplas, segundo os achados histopatológicos ($\chi^2=27,186$; GL=12; $p=0,007$).

Figura 6 - Distribuição dos tipos virais mais frequentes e múltipla infecção segundo os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande – MS, 2012 (n=76).



Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **NIC I**: neoplasia intraepitelial cervical de grau I; **NIC II**: neoplasia intraepitelial cervical de grau II; **NIC III**: neoplasia intraepitelial cervical de grau III; **CA**: carcinoma. Múltiplos tipos de HPV correspondem à associação dos genótipos: HPV11 e 16, HPV11 e 18, HPV11 e 33, HPV11 e 45, HPV16 e 18, HPV16 e 45, HPV33 e 45, HPV6 e 16, HPV6 e 18.

A idade das participantes variou de 18 a 69 anos, com média de idade de $39,2 \pm 13,6$ anos. Observou-se significância estatística entre a idade das pacientes e os achados histopatológicos ($p=0,011$) (fig. 7), com diferença significativa entre os grupos: NIC III vs NIC I ($p=0,038$) e CA vs NIC I ($p=0,002$).

Figura 7 - Média de idade de acordo com os achados histopatológicos de pacientes submetidas a biópsias de cérvix uterina no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).

ACHADO HISTOPATOLÓGICO	MÉDIA DE IDADE ANOS ± DP (faixa etária)	N
NILM	48,8 ± 6,3 (43-57)	5
NIC I	$\left. \begin{array}{l} 32,1 \pm 12,5 (18-62) \\ 41,1 \pm 14,8 (20-67) \\ 44,7 \pm 11,1 (18-69) \\ 44,6 \pm 11,0 (26-69) \end{array} \right\} p=0,038$	21
NIC II		20
NIC III		16
CA		22

Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **NIC I**: neoplasia intraepitelial cervical de grau I; **NIC II**: neoplasia intraepitelial cervical de grau II; **NIC III**: neoplasia intraepitelial cervical de grau III; **CA**: carcinoma; **DP**: desvio padrão.

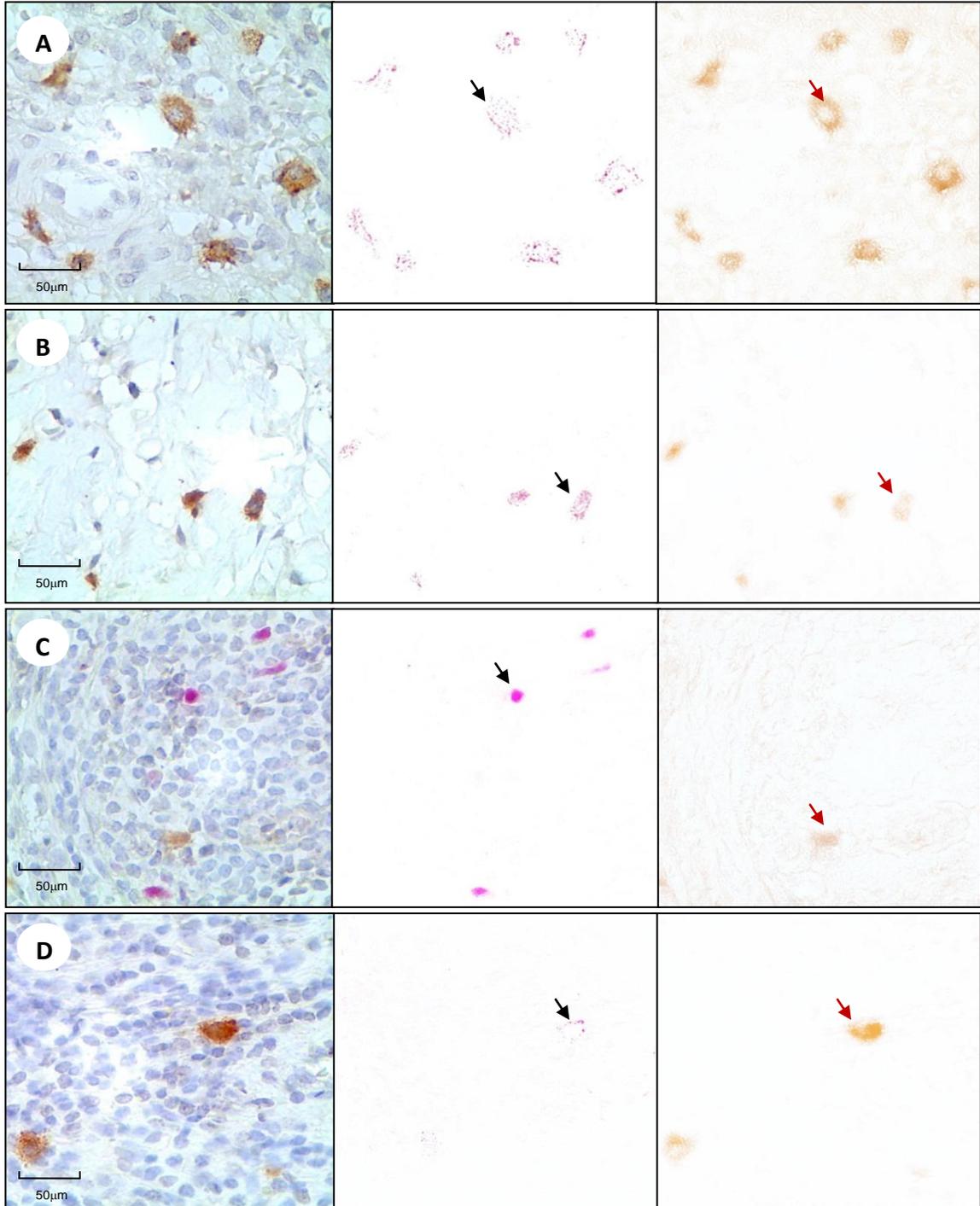
5.2 Análise imuno-histoquímica

Foram capturadas 5.880 imagens das 84 amostras de cérvix uterina para os sete fenótipos celulares pesquisados. Na figura 8, observa-se a co-expressão dos marcadores fenotípicos/IL-10 em biópsia de cérvix uterina, detectada através do *plugin colour deconvolution* do software ImageJ. Os fenótipos celulares produtores de IL-10 estavam distribuídos por todo o epitélio, sobretudo nas camadas basal, espinhosa e estromal. Não foram identificadas células T regulatórias produtoras de IL-10 (duplamente marcadas) (fig. 8C).

Ressalta-se na figura 8D que as células de Langerhans produtoras de IL-10 apresentaram formato esférico, perdendo os dendritos que caracterizam histologicamente este fenótipo celular.

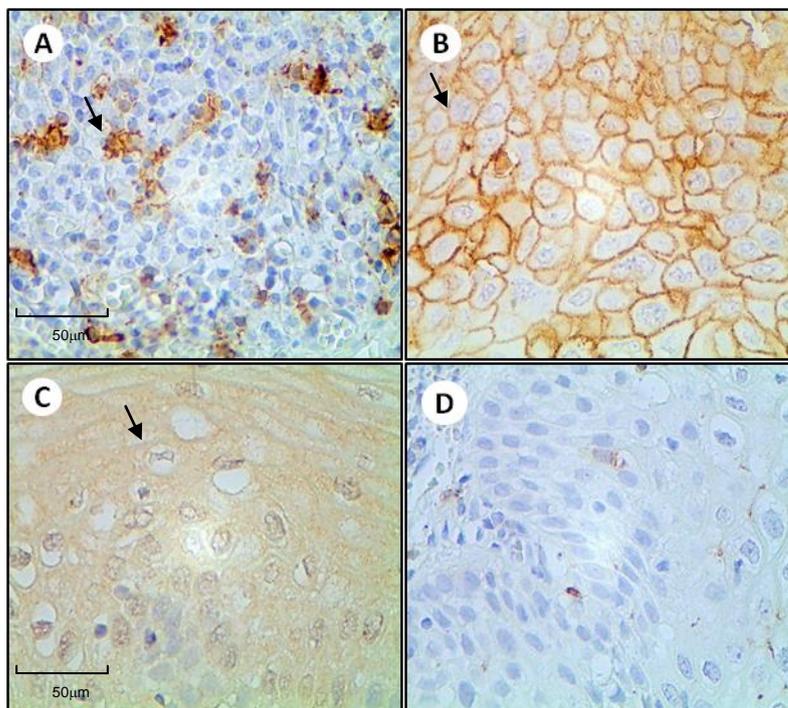
Na figura 9 observa-se a expressão de MHC II em APC e queratinócitos (fig. 9A e B, respectivamente) e produção de IL-10 por queratinócitos (fig. 9C). Não houve expressão de MHC II (fig. 9D) nem produção de IL-10 por queratinócitos em amostras NILM. Os controles positivos e negativos, em tonsila humana, das marcações utilizadas podem ser observadas na figura 10.

Figura 8 – Co-expressão dos marcadores fenotípicos/IL-10 detectados por IHQ de dupla marcação em biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.



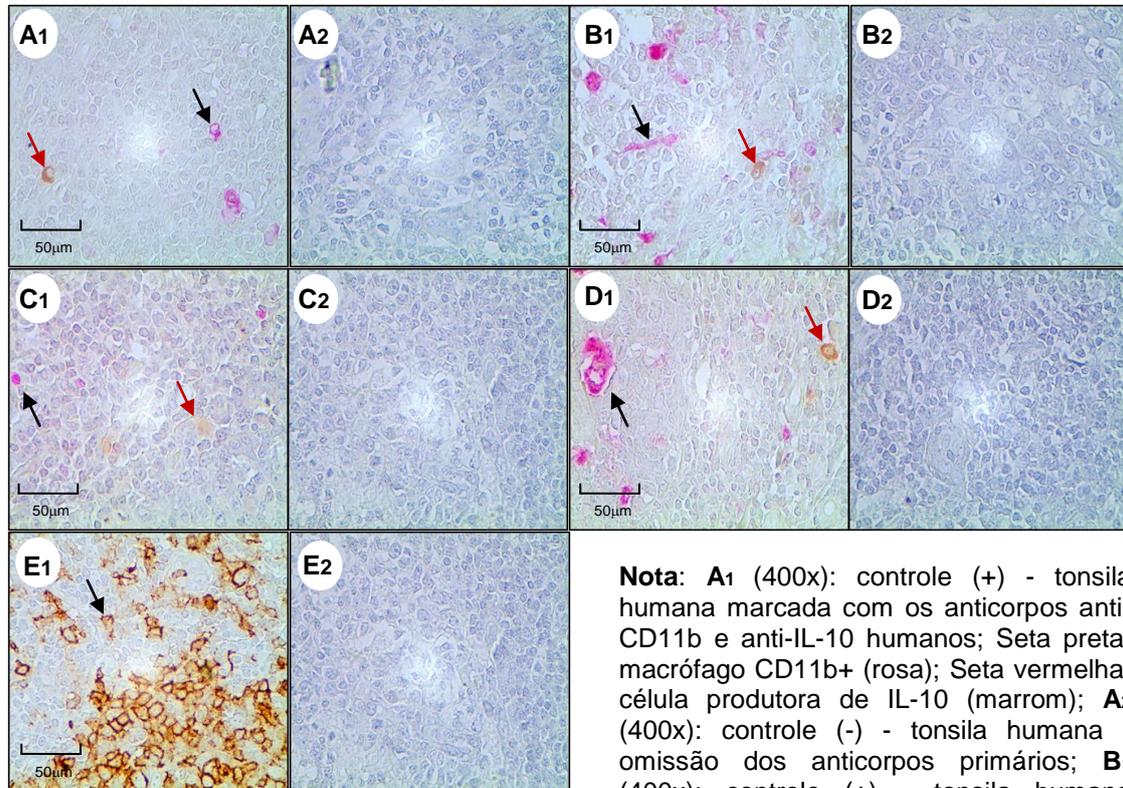
Nota: **A:** Macrófagos CD11b+ produtores de IL-10. Seta preta: células marcadas pelo anticorpo anti-CD11b (rosa); Seta vermelha: células marcadas pelo anticorpo anti-IL-10 (marrom). **B:** Macrófagos CD68+ produtores de IL-10. Seta preta: células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 (rosa); Seta vermelha: células marcadas pelo anticorpo anti-IL-10 (marrom). **C:** Células T regulatórias Foxp3+. Seta preta: células marcadas pelo anticorpo anti-Foxp3 (rosa); Seta vermelha: células marcadas pelo anticorpo anti-IL-10 (marrom). **D:** Células de Langerhans S100+ produtoras de IL-10. Seta preta: células marcadas pelo anticorpo anti-S100 (rosa); Seta vermelha: células marcadas pelo anticorpo anti-IL-10 (marrom).

Figura 9 – Expressão dos marcadores detectados por IHQ de marcação simples em biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.



A (400x): amostra de CA marcada com o anticorpo anti-MHC II; Seta: APC (marrom); **B** (400x): amostra de CA marcada com o anticorpo anti-MHC II; Seta: Queratinócito MHC II+ (marrom); **C** (400x): amostra de CA marcada com o anticorpo anti-IL-10; Seta: Queratinócito produtor de IL-10 (marrom); **D** (400x): amostra NILM marcada com o anticorpo anti-MHC II com ausência de queratinócitos imunomarcados.

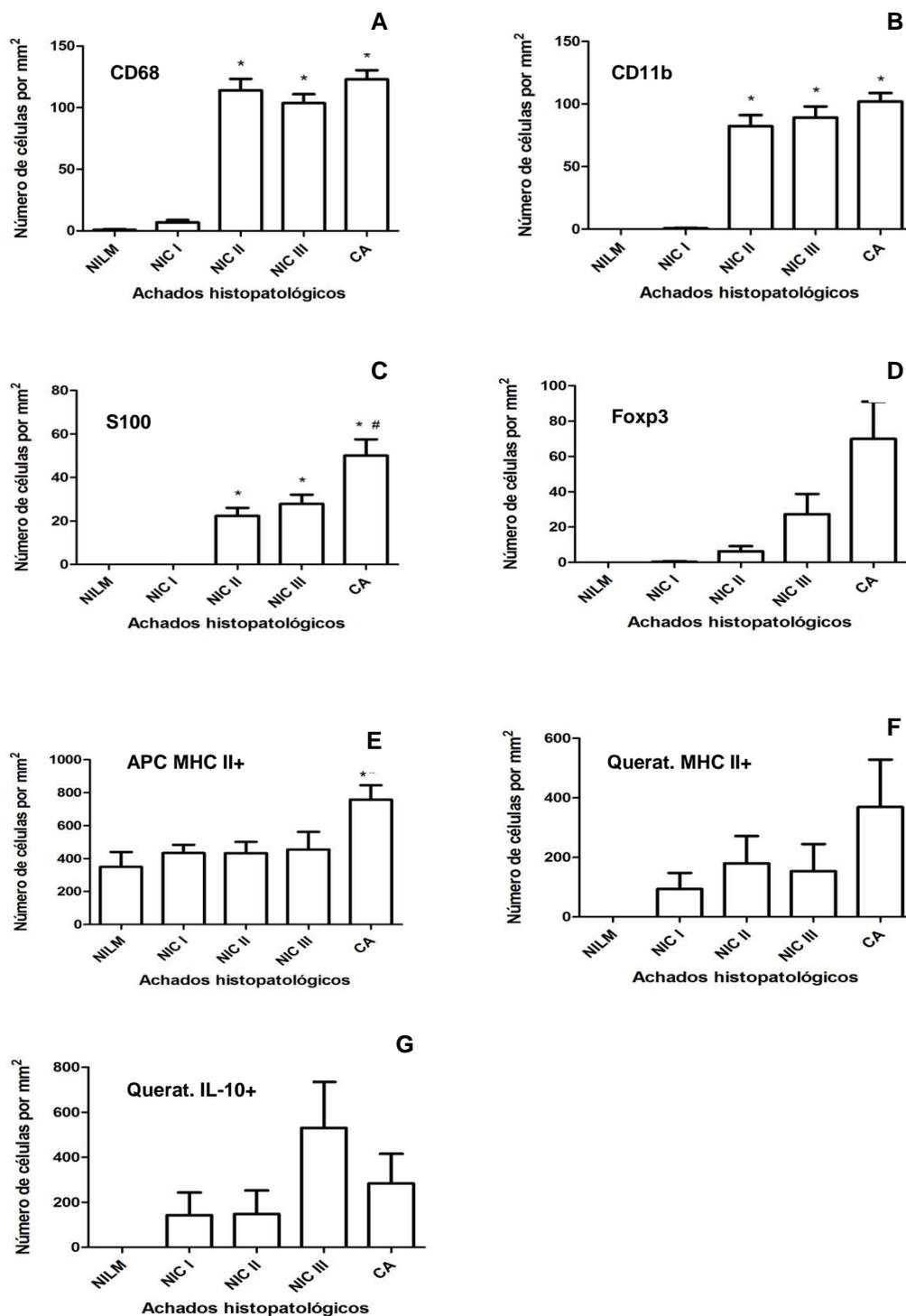
Figura 10 – Expressão dos marcadores pesquisados por IHQ de marcação dupla em biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.



Nota: **A₁** (400x): controle (+) - tonsila humana marcada com os anticorpos anti-CD11b e anti-IL-10 humanos; Seta preta: macrófago CD11b+ (rosa); Seta vermelha: célula produtora de IL-10 (marrom); **A₂** (400x): controle (-) - tonsila humana - omissão dos anticorpos primários; **B₁** (400x): controle (+) - tonsila humana marcada com os anticorpos anti-CD68 e anti-IL-10 humanos; Seta preta: macrófago CD68+ (rosa); Seta vermelha: célula produtora de IL-10 (marrom); **B₂** (400x): controle (-) - tonsila humana - omissão dos anticorpos primários; **C₁** (400x): controle (+) - tonsila humana marcada com os anticorpos anti-Foxp3 e anti-IL-10 humanos; Seta preta: célula T regulatória Foxp3+ (rosa); Seta vermelha: célula produtora de IL-10 (marrom); **C₂** (400x): controle (-) - tonsila humana - omissão dos anticorpos primários; **D₁** (400x): controle (+) - tonsila humana marcada com os anticorpos anti-S100 e anti-IL-10 humanos; Seta preta: célula de Langerhans S100+ (rosa); Seta vermelha: célula produtora de IL-10 (marrom); **D₂** (400x): controle (-) - tonsila humana - omissão dos anticorpos primários; **E₁** (400x): controle (+) - tonsila humana marcada com o anticorpo anti-MHC II; Seta preta: APC (marrom) **E₂** (400x): controle (-) - tonsila humana - omissão dos anticorpos primários;

Observou-se aumento significativo do número de macrófagos CD11b+ e CD68+ produtores de IL-10, células de Langerhans produtoras de IL-10 e APC MHC II+ simultaneamente ao aumento do número de células T regulatórias, queratinócitos expressando MHC II e produtores de IL-10, apesar de não estatisticamente significativo, de acordo com o grau da lesão (fig. 11).

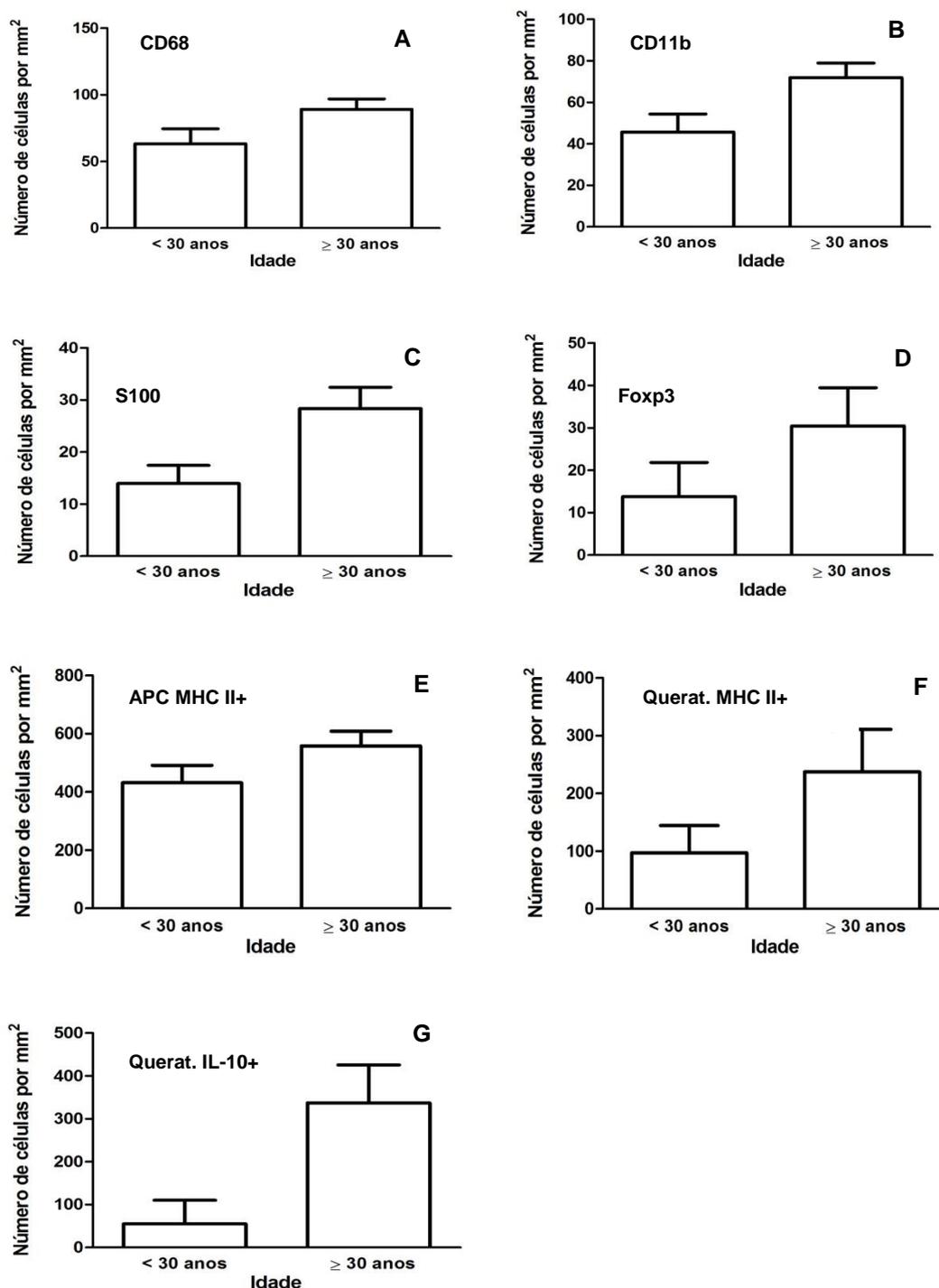
Figura 11 - Expressão de diferentes fenótipos celulares de acordo com os achados histopatológicos em amostras de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2013 (n=84).



Nota: **(A)** Macrófagos CD68+ produtores de IL-10. * p <0,001 em comparação NILM. **(B)** Macrófagos CD11b+ produtores de IL-10. * p <0,001 em comparação NILM. **(C)** Células de Langerhans S100+ produtoras de IL-10. * p <0,001 em comparação NILM. # p <0,05 em comparação NIC I e II. **(D)** Células T regulatórias Foxp3+. **(E)** APC MHC II+. * p <0,05 em comparação NILM, NIC I e II. **(F)** Queratinócitos MHC II+. **(G)** Queratinócitos produtores de IL-10. NILM: n=5; NIC I: n=21; NIC II: n=16; NIC III: n=16; CA: n=22.

Conforme a figura 12 observou-se aumento do número dos diferentes fenótipos celulares com perfil imunossupressor e expressando MHC II por APC e queratinócitos em mulheres com idade superior a 30 anos ($p > 0,01$).

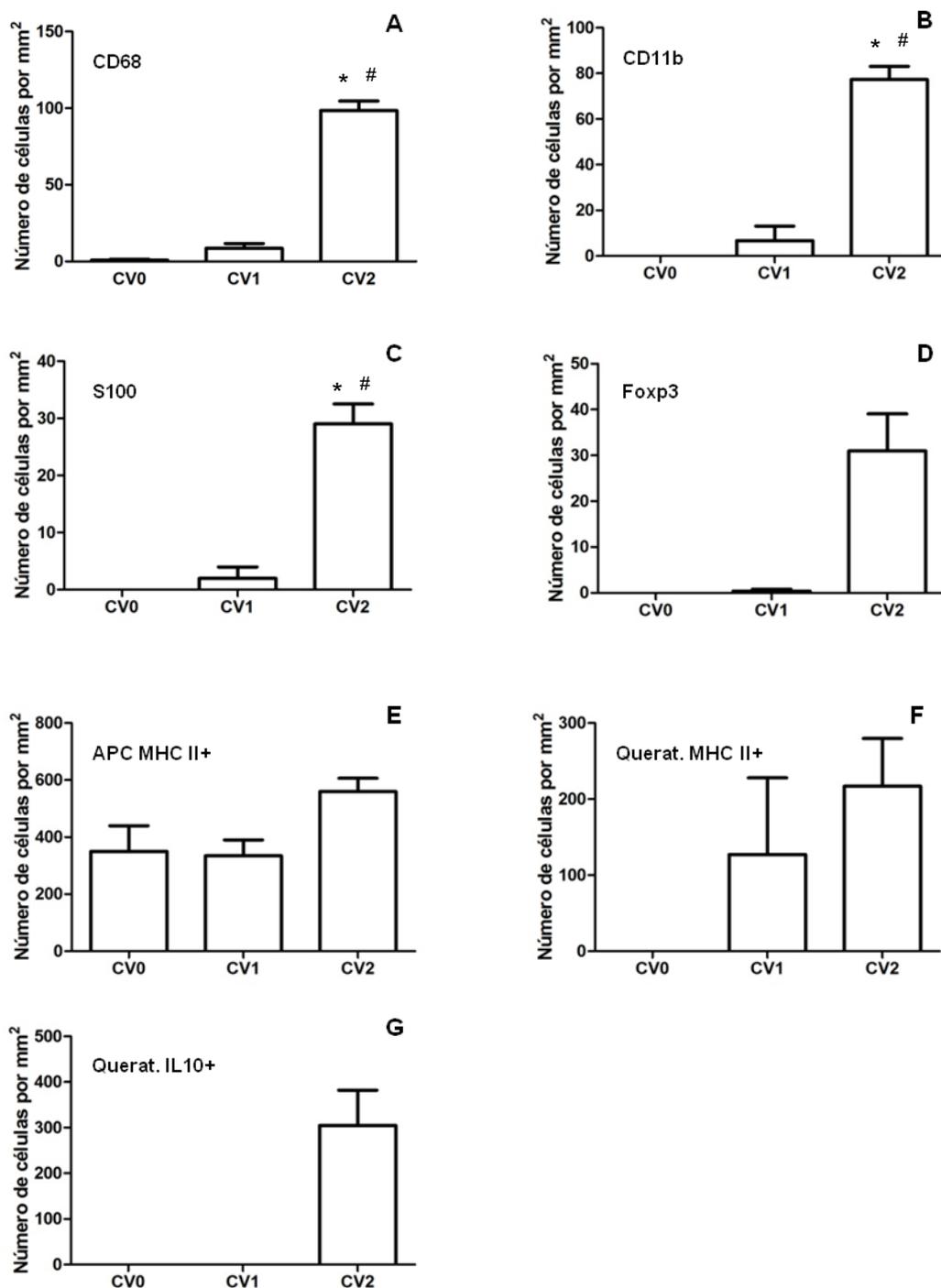
Figura 12 - Expressão de diferentes fenótipos celulares em amostras de cérvix uterina de acordo com a idade das pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2013 (n=84).



Nota: **(A)** Macrófagos CD68+ produtores de IL-10; **(B)** Macrófagos CD11b+ produtores de IL-10; **(C)** Células de Langerhans S100+ produtoras de IL-10; **(D)** Células T regulatórias Foxp3+; **(E)** APC MHC II+; **(F)** Queratinócitos MHC II+; **(G)** Queratinócitos produtores de IL-10. < 30 anos: n=27; ≥ 30 ano: n=57.

Relacionando a densidade das células imunomarcadas segundo a carga viral do HPV, observou-se aumento da quantidade de todos os fenótipos celulares pesquisados, paralelamente ao aumento da carga viral, com significância estatística entre macrófagos CD68 e CD11b positivos e entre células de Langerhans (fig. 13).

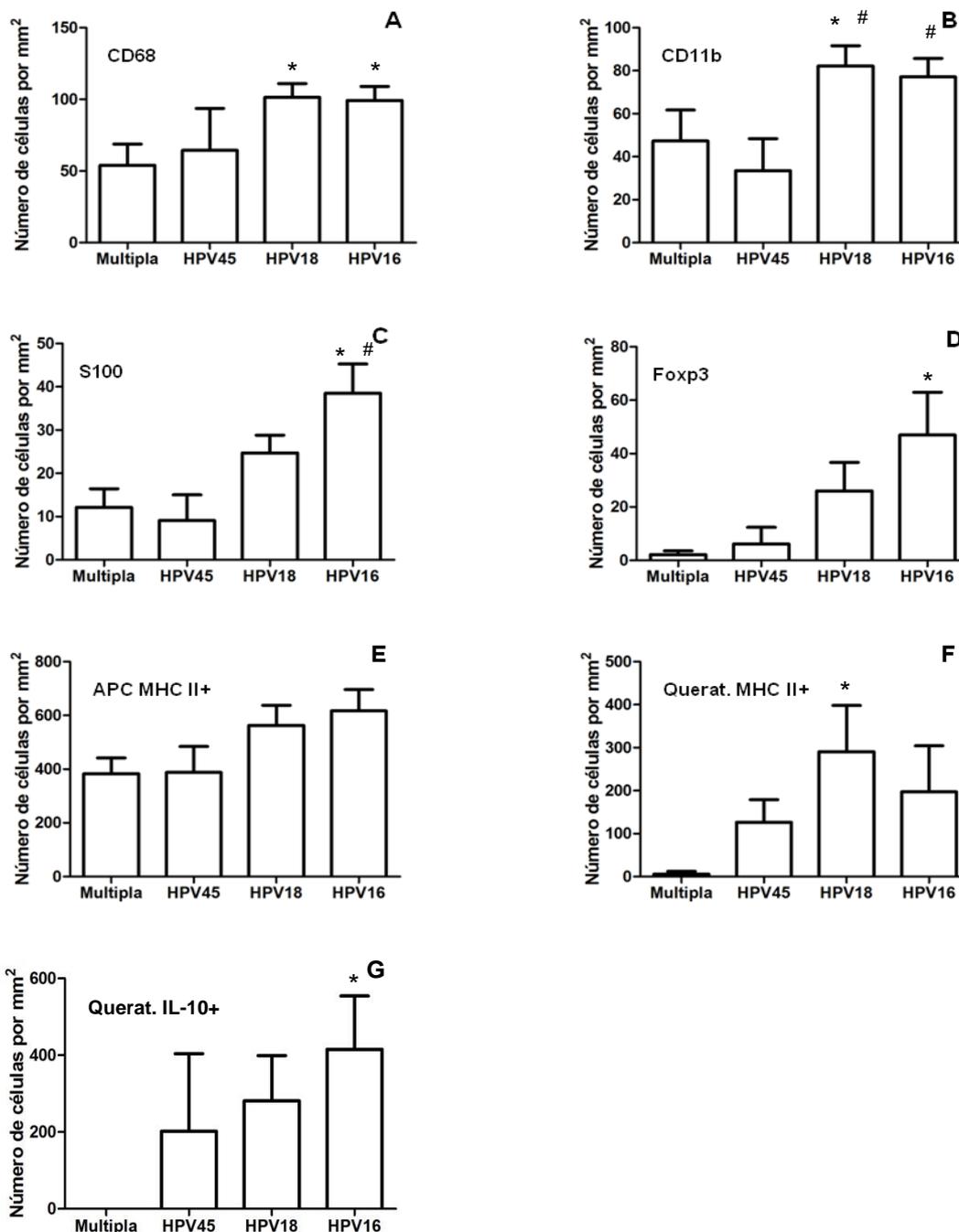
Figura 13 - Expressão de diferentes fenótipos celulares de acordo com a carga viral em amostras de cérvix uterina das pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2013 (n=84).



Nota: **(A)** Macrófagos CD68+ produtores de IL-10; **(B)** Macrófagos CD11b+ produtores de IL-10; **(C)** Células de Langerhans S100+ produtoras de IL-10; **(D)** Células T regulatórias Foxp3+; **(E)** APC MHC II+; **(F)** Queratinócitos MHC II+; **(G)** Queratinócitos produtores de IL-10. * $p < 0,001$ em comparação com CV0. # $p < 0,001$ em comparação com CV1. NILM: n=5; NIC I: n=21; NIC II: n=16; NIC III: n=16; CA: n=22.

Observou-se também aumento dos fenótipos imunossupressores e expressando MHC II nas amostras infectadas com os tipos de HPV 16 e 18 (fig. 14).

Figura 14 - Expressão de diferentes fenótipos celulares de acordo com os tipos virais encontrados em amostras de cérvix uterina das pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer, Campo Grande, MS, 2013 (n=76).



Nota: **(A)** Macrófagos CD68+ produtores de IL-10; **(B)** Macrófagos CD11b+ produtores de IL-10; **(C)** Células de Langerhans S100+ produtoras de IL-10; **(D)** Células T regulatórias Foxp3+; **(E)** APC MHC II+; **(F)** Queratinócitos MHC II+; **(G)** Queratinócitos produtores de IL-10. * p <0,05 em comparação com múltipla infecção. # p <0,05 em comparação com infecção pelo HPV45. Infecção múltipla corresponde à associação dos genótipos: HPV11 e 16, HPV11 e 18, HPV11 e 33, HPV11 e 45, HPV16 e 18, HPV16 e 45, HPV33 e 45, HPV6 e 16, HPV6 e 18. NILM: n=2; NIC I: n=16; NIC II: n=16; NIC III: n=16; CA: n=22.

6 DISCUSSÃO

Nossos dados apontam a existência de um microambiente altamente imunossuprimido em lesões de alto grau (NIC II e III) e CA, desenvolvido a partir da produção de IL-10 por diferentes fenótipos celulares por provável influência dos produtos virais do HPV, tendo em vista a frequência e a alta carga viral dos tipos de alto risco oncogênico nessas lesões.

O principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões neoplásicas cervicais é a infecção pelo HPV, principalmente por tipos considerados de alto risco oncogênico (BOSCH *et al.*, 1995; MUNOZ *et al.*, 2006; WALBOOMERS *et al.*, 1999). No presente estudo, entre as amostras estudadas destacam-se os HPV16 e 18 devido à alta frequência, principalmente nas lesões de alto grau e CA. Estudo multicêntrico realizado em 22 países por Walboomers *et al.* (1999) detectou DNA de HPV em 99,7% dos casos de CA, dos quais 63% eram HPV 16 e 18. Castellsagué *et al.* (2006), por sua vez, detectaram 93% de amostras positivas para DNA de HPV, sendo 81% HPV16 e 18, observando que a infecção por esses dois tipos aumenta em 574 vezes o risco do desenvolvimento de CA.

A carga viral também é apontada como um importante fator para predisposição de lesões de alto grau e câncer cervical (GRAVITT *et al.*, 2007). No presente estudo, observou-se relação estatística ($p < 0,001$) entre o aumento da carga viral e o grau das lesões neoplásicas induzidas pelo HPV. Outros estudos também descrevem esta associação, apontando a carga viral como preditor de lesões cervicais, pois aumenta a possibilidade de integração do material genético do vírus ao do hospedeiro, além de aumentar a toxicidade decorrente das oncoproteínas virais às células infectadas e circunvizinhas (GRAVITT *et al.*, 2007; MOBERG *et al.*, 2004; VAN DUIN *et al.*, 2002).

Estudos apontam valores mais elevados de carga viral quando observada infecção por um único tipo. Em múltiplas infecções, no entanto, a carga viral não é proporcional à encontrada nas infecções simples, não havendo um acréscimo de risco no desenvolvimento de lesões cervicais (FLORES *et al.*, 2006; GRAVITT *et al.*, 2007; MOBERG *et al.*, 2004). Concordando com tais dados, neste estudo houve maior frequência de infecções por um único tipo viral, principalmente por tipos considerados de alto risco oncogênico, em lesões de alto grau e CA.

Estudos demonstram que a faixa etária também é um fator determinante no processo de desenvolvimento neoplásico no colo do útero (CASTLE *et al.*, 2005; NARDELLI-HAEFLIGER *et al.*, 2003). No presente estudo, encontramos relação estatística entre a idade das participantes e a severidade das lesões induzidas por HPV (NILM vs NIC I $p=0,011$), (NIC III vs NIC I $p=0,038$) e (CA vs NIC I $p=0,002$).

A maioria das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regride espontaneamente, enquanto que, acima dessa idade, a persistência é mais frequente, aumentando as chances do desenvolvimento de lesões neoplásicas e CA (CASTLE *et al.*, 2005; HO *et al.*, 1998). Segundo a OMS (2011), a incidência do câncer cervical aumenta entre as mulheres de 30 a 39 anos de idade e atinge seu grau máximo na quinta ou sexta décadas de vida. A maior propensão à persistência da infecção pelo HPV e ao surgimento de lesões neoplásicas cervicais com o aumento da idade se dá provavelmente como consequência das oscilações hormonais ocorridas nesta fase da vida, que interferem na resposta imune tanto sistêmica quanto da mucosa cervical (FRANKLIN, KUTTEH 1999; NARDELLI-HAEFLIGER *et al.*, 2003).

No entanto, a infecção pelo HPV por si só não é suficiente para o desenvolvimento neoplásico, fazendo-se necessário o somatório de outros fatores. Além de aspectos relacionados ao vírus, as características genéticas do indivíduo (MADELEINE *et al.*, 2008), seus hábitos comportamentais (BASEMAN, KOUTSKY, 2005) e sua imunidade (JACOBS *et al.*, 2003) influenciam os mecanismos que determinam a regressão ou a persistência da infecção pelo HPV e o surgimento de lesões precursoras e câncer.

A resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, embora desempenhe papel fundamental na eliminação de mais de 90% das infecções por HPV, em alguns casos, por ativação ineficiente, facilita sua persistência, tornando-se um fator de risco adicional para o desenvolvimento de lesões neoplásicas no colo do útero (PINTO, TULIO, CRUZ, 2002). O entendimento das interações celulares e moleculares do sistema imune com o HPV é de grande relevância para o desenvolvimento de estratégias profiláticas, terapêuticas e prognósticas no combate ao câncer cervical.

O HPV exhibe uma grande variedade de estratégias de evasão da vigilância imunológica. Uma delas é a indução da produção de fatores solúveis com atividade imunossupressora no microambiente da infecção (SYRJÄNEN *et al.*, 2009).

A IL-10 é uma importante citocina imunossupressora produzida por muitas populações celulares. Sua principal função biológica relaciona-se à modulação e interrupção de respostas inflamatórias e à regulação da diferenciação e da proliferação de diferentes células do sistema imunológico, tais como linfócitos T, linfócitos B, células *Natural Killer*, células apresentadoras de antígenos (APC), mastócitos e granulócitos. No entanto, numerosas investigações *in vitro* e *in vivo* apontam a importância desta em doenças inflamatórias, auto-imunes e neoplásicas (MOCELLIN *et al.*, 2003).

O aumento dos níveis peritumorais e séricos da IL-10 é relatado em diversas neoplasias, como renal (NAKAGOMI *et al.*, 1995), coloretal (STANILOV *et al.*, 2010), hepatocelular (CHAN *et al.*, 2011), câncer do ovário (PISA *et al.*, 1992), carcinoma de células escamosas e basais da pele (KIM *et al.*, 1995), glioma (HUETTNER, PAULUS, ROGGENDORF, 1995) e melanoma (KRÜGER-KRASAGAKES *et al.*, 1994). Como observado no presente estudo, outros também identificaram o aumento desta citocina em lesões intra-epiteliais cervicais, sobretudo, naquelas de alto grau, bem como, no câncer do colo do útero (ALCOCER-GONZÁLEZ *et al.*, 2006; GIANNINI *et al.*, 2002; JACOBS *et al.*, 2003). Nestes sítios, em decorrência da sua ação imunossupressora, a IL-10 pode desempenhar papel importante na criação de um microambiente propenso à evasão imune do HPV e à progressão neoplásica (BHAIRAVABHOTLA *et al.*, 2007; SYRJÄNEN *et al.*, 2009).

A IL-10 pode ser produzida por vários fenótipos celulares diferentes, incluindo linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2), linfócitos T reguladores, linfócitos T CD8+, monócitos, macrófagos, alguns subconjuntos de células dendríticas, células B, bem como, alguns granulócitos (eosinófilos e mastócitos) (MOORE *et al.*, 2001; MOSSER *et al.*, 2008), sendo a produção por queratinócitos incomum. No entanto, o HPV é capaz de modificar o perfil de citocinas e moléculas de superfície dos queratinócitos como mecanismo de evasão imune. Como alvo da infecção pelo HPV, os queratinócitos desempenham papel fundamental no início da infecção. Eles fazem parte do sistema imune inato e são considerados sentinelas, pois podem funcionar como células apresentadoras de antígenos não profissionais, através da expressão de MHC I e II e da produção de citocinas Th1 e Th2, quimiocinas e β -defensinas, quando estimulados por substâncias pró-inflamatórias (BLACK *et al.*, 2007). Entre nossos resultados, não se observou produção de IL-10 por queratinócitos em amostras NILM. No entanto, a partir de NIC I sua produção foi detectada, com

aumento progressivo conforme avanço das lesões neoplásicas, indicando a influência do HPV, principalmente dos tipos de alto risco oncogênico, na indução da síntese desta citocina por queratinócitos.

Outros estudos também relatam a produção de IL-10 por queratinócitos em lesões induzidas por HPV. Todos são unânimes em afirmarem que a expressão desta citocina aumenta simultaneamente com o grau da lesão epitelial (GIANNINI *et al.*, 1998; MOTTA *et al.*, 1999; SYRJÄNEN *et al.*, 2009). Um dos prováveis mecanismos para esta mudança no perfil de produção de citocinas dá-se pela ação das proteínas virais sobre estas células. A proteína E2 do HPV induz a produção de IL-10 a partir da ativação do seu promotor em queratinócitos do microambiente infectado (BERMÚDEZ-MORALES *et al.*, 2011).

As oncoproteínas produzidas pelo HPV também interferem na produção de fatores pró-inflamatórios pelos queratinócitos. Os interferons (IFN) são componentes do sistema imune inato produzidos, em geral, por células infectadas por vírus. Estas citocinas medeiam a proteção contra vírus através da ativação de mecanismos antivirais intracelulares, anti-proliferativos e imunoestimulantes, além de ativar células *Natural Killer*, que desempenham importante função na destruição dos reservatórios virais e de células tumorais (LE BON *et al.*, 2002). A oncoproteína E6 do HPV, no entanto, impede o fator de transcrição do IFN- β de se ligar ao promotor de IRF-3, diminuindo assim a produção desta citocina (NEES *et al.*, 2001). Por sua vez, a oncoproteína E7 inibe a expressão dos genes induzíveis de IFN- α (BARNARD, PAYNE, MCMILLAN, 2000). Além disso, as oncoproteínas E6 e E7 reduzem a expressão de TLR9 (HASAN *et al.*, 2007), receptor endossomal do tipo Toll que, quando ativado por produtos virais intracelulares, induz produção de IFN. Outras moléculas pró-inflamatórias cuja produção é inibida pela ação das oncoproteínas virais são MCP-1, MIP-3 α e IL-1 β (NADAIS *et al.*, 2006; MADELEINE *et al.*, 2002).

As amostras NILM foram todas negativas para a expressão de MHC II em queratinócitos, observando-se apenas algumas APC MHC II+ distribuídas pelo epitélio e estroma. Em contrapartida, o número de queratinócitos e de APC MHC II+ cresceu paralelamente ao aumento do grau das lesões neoplásicas. As oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV induzem redução do processamento e apresentação de antígenos através da inibição da expressão do transportador associado ao processamento de antígeno e das moléculas do MHC I (ASHRAFI *et*

al., 2005). Por outro lado, como observado neste estudo, outros também descrevem o aumento da expressão de MHC II por queratinócitos e APC de acordo com a gravidade do grau das lesões cervicais (CASSANDRI *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2004; MOTTA *et al.*, 1999).

Por provável ação da IL-10, moléculas co-estimulatórias necessárias para a adesão e ativação de linfócitos T, tais como CD80, CD86 e LFA-1, estão ausentes ou diminuídas em queratinócitos e APC presentes no microambiente infectado pelo HPV, impedindo a ativação de linfócitos T por estas células. A apresentação de antígenos via MHC II sem estímulo adicional de moléculas co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias, somada à ação imunossupressora da IL-10, leva os linfócitos T CD4+ a um estado de anergia com posterior apoptose e diferenciação destes em Treg, contribuindo ainda mais para a imunossupressão local (CHAPEROT *et al.*, 1999; EVANDER *et al.*, 1997; MOTTA *et al.*, 1999).

Neste estudo identificamos produção de IL-10 e ausência de dendritos por parte das células de Langerhans (LC), com aumento da frequência deste fenótipo imunossupressor em lesão de alto grau (NIC2/3) e CA. Outros estudos também descrevem a ausência de dendritos celulares em LC (JIMENEZ-FLORES *et al.*, 2006; LEONG *et al.*, 2010; MOTTA *et al.*, 1999), acompanhada da redução de importantes moléculas co-estimulatórias, o que indica a manutenção de um fenótipo imaturo, incapaz de capturar, processar e apresentar antígenos (JIMENEZ-FLORES *et al.*, 2006). A ativação das LC se dá pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos, por moléculas co-estimuladoras expressas por queratinócitos e por citocinas pró-inflamatórias presentes no meio. Estudos demonstram que células de Langerhans não são ativadas pelos antígenos do HPV (FAUSCH *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2007). Ademais, a ausência de moléculas co-estimuladoras ou de citocinas pró-inflamatórias expressas por queratinócitos, somada à presença da IL-10, contribuem para a continuidade deste fenótipo imaturo.

Como observado no presente estudo, alguns autores descrevem LC imaturas produtoras de IL-10 geradas provavelmente por ação da IL-10 sobre seus precursores, indicando uma nova classe de LC capazes de mediar potente imunossupressão no meio e de induzir anergia e apoptose nos linfócitos T (MUNN *et al.*, 2004; WAKKACH *et al.*, 2003).

Como LC são células sentinelas do sistema imunológico e são cruciais para o transporte de antígenos aos linfócitos T, sua função limitada pode representar um

importante mecanismo de evasão viral, dado que as funções de captura, processamento e apresentação de antígenos ficam comprometidas. A consequência deste fato pode ser um microambiente mais permissivo à persistência do HPV. Isso ajuda a explicar a redução ou ausência de linfócitos T reativos aos antígenos do HPV, mesmo após longos períodos (meses ou anos) de infecção (MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006). A infecção viral durante as fases iniciais da infecção (NICI) pode, portanto, interferir no estabelecimento de um microambiente apropriado para o subsequente desenvolvimento de respostas eficazes por linfócitos T, facilitando, desse modo, a progressão de lesões precoces a carcinoma.

Estudos indicam a importância das LC imaturas no desenvolvimento de linfócitos T reguladores (Treg). Têm-se descrito a presença de células Treg no mesmo ambiente onde LC estão presentes (LEONG *et al.*, 2010) e a indução de Treg por LC sem necessidade de estímulo adicional de citocinas (JONULEIT *et al.*, 2000). Contudo, há relatos sobre a indução deste fenótipo supressor por ação única da IL-10 (GROUX *et al.*, 1997). As Treg exercem sua função principalmente através da liberação das citocinas inibitórias IL-10 e TGF- β (JONULEIT, SCHMITT, 2003; SAKAGUCHI, 2006) e por ação citotóxica mediada por granzimas e perforinas sobre as células alvo (GROSSMAN *et al.*, 2004; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Como observado no presente estudo, outros autores descrevem o aumento de Treg em lesões de alto grau e CA (MOLLING *et al.*, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 2004, 2008; WOO *et al.*, 2008), indicando a relevância deste fenótipo celular na imunomodulação do microambiente cervical e demonstrando a capacidade do HPV em recrutá-las ou induzi-las.

Entre nossos achados não identificamos Treg produzindo IL-10. Tal fato provavelmente ocorra por *feedback* negativo da IL-10 presente no microambiente sobre essa população celular. Por ação do HPV, grande quantidade de IL-10 é produzida pelos queratinócitos e por outras populações celulares residentes no epitélio. Como componente da resposta imune tardia, os linfócitos T chegam posteriormente ao local da infecção. O microambiente rico em IL-10 é importante na diferenciação de linfócitos T CD-4+ em Treg (GROUX *et al.*, 1997). Entretanto, sua saturação no meio provavelmente iniba a produção de IL-10 pelas Treg. Isso não diminui a importância dessa população celular na contribuição da imunossupressão local, tendo em vista que as Treg produzem outras citocinas imunossupressoras, como TGF- β (JONULEIT, SCHMITT, 2003), e executam atividade citotóxica, através

da produção de perforinas e granzimas, sobre outras células do sistema imune (GROSSMAN *et al.*, 2004; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Outra importante população celular que participa da resposta imune contra o HPV são os macrófagos. A caracterização destas células é um desafio, tendo em vista a heterogeneidade de seus fenótipos. Descobertas recentes demonstram dois tipos de macrófagos: M1 e M2, divididos de acordo com suas funções (GINDERACHTER *et al.*, 2006). Os macrófagos M1, também denominados “classicamente ativados”, produzem altos níveis de IL-12, INF- γ e IL-23 e baixos níveis de IL-10, sendo conseqüentemente, fortes promotores da resposta imune Th1 (REZENDE *et al.*, 2007) além de exercerem atividade antiproliferativa e citotóxica, resultante da sua capacidade de produzir NO, peróxido de hidrogênio, superóxidos e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) (GINDERACHTER *et al.*, 2006).

Os macrófagos M2, por sua vez, também denominados “alternativamente ativados”, são caracterizados por secretarem citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras, tais como IL3, IL4, IL-10 e TGF β (REZENDE *et al.*, 2007; GINDERACHTER *et al.*, 2006), capazes de promoverem a angiogênese e o reparo tecidual (SICA *et al.*, 2006) e de inibirem as funções de M1 (GINDERACHTER *et al.*, 2006). Tem-se descrito ainda dois subconjuntos distintos de macrófagos M1, composto por células CD68 +, que demonstram atividade fagocítica, produção de peróxido de hidrogênio, superóxidos e atividade bactericidas, e células CD11b+, que parecem desenvolver um perfil produtor de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF (IKARASHI *et al.*, 2013; KINOSHITA *et al.*, 2010). Entretanto, no presente estudo observamos a presença de macrófagos CD11b+ e CD68+ produtores de IL-10, indicando se tratarem de macrófagos M2.

Outros estudos tem descrito correlação entre o grau das lesões, o número de macrófagos associados aos tumores (TAM) e expressão de IL-10 por estas células, em acordo com o observado no presente estudo (BOLPETTI *et al.*, 2010; MAZIBRADA *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008). Há relatos do aumento do número de macrófagos em vários tumores malignos humanos, incluindo câncer de mama, ovário, pulmão e linfoma de Hodgkin, relacionando-se com um mau prognóstico. TAM parecem desempenhar um papel importante no recrutamento de Treg para a massa tumoral, favorecendo assim a formação de microambiente imunossupressor que conduz à progressão neoplásica (LIU *et al.*, 2011). Estes macrófagos agem também suprimindo células T infiltrantes no tumor através da

indução de condições de hipóxia e pela própria produção de IL-10. A produção de indoleamina-2,3-dioxigenase e metalopeptidase de matriz 9 por estas células contribuem para a indução de um microambiente imunossuprimido, para a progressão e para invasão tumoral (DOEDENS *et al.*, 2010; BOLPETTI *et al.*, 2010).

Os dados aqui expostos ajudam na compreensão dos mecanismos de evasão da resposta imune induzida pelo HPV e do papel do microambiente na persistência da infecção e na indução de lesões malignas, com vistas a serem úteis no desenvolvimento de profilaxia, terapêutica e marcadores prognósticos que considerem a complexidade dos mecanismos imunossupressores induzidos por este vírus.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados indicam a existência de um microambiente imunossuprimido, principalmente nas lesões de alto grau e câncer cervical, desenvolvido por diferentes fenótipos celulares, que incluem células que compõem o sistema de vigilância imunológica, indicando que estas não só têm suas funções inibidas, como são recrutadas para contribuir à persistência da infecção do HPV e à progressão neoplásica.

Este microambiente imunossuprimido progride paralelamente ao aumento da gravidade das lesões cervicais, com maior propensão em infecções por tipos de alto risco oncogênico, alta carga viral e em mulheres acima de 30 anos.

O aumento da expressão de moléculas MHC II por APC e queratinócitos parece ser influenciado pela ação HPV sobre a célula infectada, como mecanismo de evasão da resposta imune adaptativa, tendo em vista que a apresentação de antígenos sem estímulos adicionais desenvolve estado de anergia e apoptose nos linfócitos T CD4+.

8 REFERÊNCIAS

ADURTHI, S.; KRISHNA, S.; MUKHERJEE, G.; BAFNA, U. D.; DEVI, U.; JAYSHREE, R. S.; Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 60, p. 55-65, 2008.

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I.; LORD, G. M.; The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 148, n. 1, p. 32-46, Apr. 2007.

ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; BERUMEN, J.; TAMÉZ-GUERRA, R.; BERMÚDEZ-MORALES, V.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; MORENO, J.; GARIGLIO, P.; MADRID-MARINA, V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunology**, v. 19, p. 481-491, 2006.

ARRESE, J.; PAQUET, P.; CLAESSENS, N.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PIÉRARD, G. Dermal dendritic cells in anogenital warty lesions unresponsive to an immune-response modifier. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 28, n. 3, p. 131-134, Mar. 2001.

ASHRAFI, G. H.; HAGHSHENAS, M. R.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P. M.; CAMPO, M. S. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 2, p. 276-283, Jan. 2005.

AULT, K. A. Epidemiology and natural history of human Papillomavirus infections in the female genital tract. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, p. 1-5, 2006.

BÄFVERSTEDT, B. : Condylomata acuminata - past and present. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 47, n. 5, p. 476-80, 1967.

BAIS, A. G.; BECKMANN, I.; EWING, P. C.; EIJKEMANS, M. J. C.; MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F.; HELMERHORST, T. J. M. Cytokine Release in HR-HPV(+) Women without and with Cervical Dysplasia (CIN II and III) or Carcinoma, Compared with HR-HPV(-) Controls. **Mediators of Inflammation**, v. 2, n. 2, p. 75-78, Fev. 2007.

BARNARD, P.; PAYNE, E.; MCMILLAN, N. A. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 411-419, Nov. 2000.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*, p. S16-24, Mar. 2005.

BOLPETTI, A.; SILVA, J. S.; VILLA, L. L.; LEPIQUE, A. P. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. ***BMC Immunology***, Jun. 2010.

NADAIS, R. D. A. F.; CAMPANER, A. B.; PIATO, S.; LONGO GALVÃO, M. A.; DOS SANTOS, R. E.; AOKI, T. Langerhans' cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. ***Gynecology Oncology***, v. 102, n. 2, p. 356-360, Aug. 2006.

BERMÚDEZ-MORALES, V. H.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; MORENO, J.; MADRID-MARINA, V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. ***Molecular Medicine Reports***, v. 4, n. 2, p. 369-375, Mar. 2011.

BHAIRAVABHOTLA, R. K.; VERM, V.; TONGAONKAR, H.; SHASTRI, S.; DINSHAW, K.; CHIPLUNKAR, S.; Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. ***Indian journal of biochemistry and biophysics***, v. 44, n. 5, p. 350-356, Oct. 2007.

BLACK, A. P.; ARDERN-JONES, M. R.; KASPROWICZ, V.; BOWNESS, P.; JONES, L.; BAILEY, A. S.; OGG, G. S. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T ***European Journal of Immunology***, v. 37, n. 6, p. 1485-1493, jun. 2007.

BOSHART, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; KLEINHEINZ, A.; SCHEURLLEN, W.; zur HAUSEN, H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. ***The EMBO Journal***, v. 3, n. 5, p. 1151–1157, may. 1984.

BRAFF, M. H.; ZAIYOU, M.; FIERER, J.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. ***Infection and Immunity***. v. 73, n. 10, p.6771-6781, Oct. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Falando sobre câncer do colo do útero** – Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011, p. 35-37.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2013, p. 42-45.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, jan. 2003.

CASSANDRI, F.; TOZETTI, I. A.; FERNANDES, C. E. S.; ALMEIDA, F. G.; FALCAO, G. R.; SCAPULATEMPO, I. D. L.; PRATA, T. T. M.; PADOVANI, C. T. J.; ALVES, D. B.; FERREIRA, A. M. T.; ABDO, M. A. G. S. S100, CD68, and MHC class II molecule expression in cervical high- and low-grade HPV-induced lesion. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 3-8, 2012.

CASTLE, P. E.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; RODRIGUEZ, A. C.; BRATTI, M. C.; SHERMAN, M. E.; WACHOLDER, S.; TARONE, R.; BURK, R. D. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 11, p. 1808-1816, jun. 2005.

CHAN, S. L.; MO, F. K.; WONG, C. S.; CHAN, C. M.; LEUNG, L. K.; HUI, E. P.; MA, B. B.; CHAN, A. T.; MOK, T. S.; YEO, W. A study of circulating interleukin 10 in prognostication of unresectable hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 118, n. 16, p. 3984-3992, aug. 2012.

CHAPEROT, L.; PLUMAS, J.; JACOB, M. C.; BOST, F.; MOLENS, J. P.; SOTTO, J. J.; BENZA, J. C. Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 3, p. 479-488, mar. 1999.

CIUFFO, G. Imnesto positivo con filtrato di verruca volgare. **Giorn Ital Mal Venereol**, v. 48, p. 12–17, 1907.

COLEMAN, N.; STANLEY, M. A. . Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 314-319, feb. 1994.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; WILSON, M. S.; HAFALLA, J. C.; BELKAID, Y.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; de SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. **PLOS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 279-290, feb. 2008.

DA SILVA, D. M.; FAUSCH, S. C.; VERBEEK, J. S.; KAST, W. M. Uptake of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells is mediated by Fcγ3

receptors and contributes to acquisition of T cell immunity. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7587-7597, jun. 2007.

deLEEuw, R. J.; KOST, S. E.; KAKAL, J. A.; NELSON, B. H. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. **Clinical Cancer Research**. v. 8, n. 11, p. 3022-3029, jun. 2012.

DOEDENS, A. L.; STOCKMANN, C.; RUBINSTEIN, M. P.; LIAO, D.; ZHANG, N.; DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M.; KARIN, M.; GOLDRATH, A. W.; JOHNSON, R. S. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. **Cancer Research**, v. 70, n. 19, p. 7465-7575, oct. 2010.

EVANDER, M.; FRAZER, I. H.; PAYNE, E.; QI, Y. M.; HENGST, K.; MCMILLAN, N. A. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2449-2456, Mar. 1997.

FAUSCH, S. C.; DA SILVA, D. M.; RUDOLF, M. P.; KAST, W. M. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 3242-3249, sep. 2002.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11[Internet]. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; 2013. Disponivel em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

FLORES, R.; PAPENFUSS, M.; KLIMECKI, W. T.; GIULIANO, A. R.. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 1187–1193, 2006.

FRANCO, E. L.; HARPER, D. M. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. **Vaccine**. v. 18, n. 23, p. 2388-2394, Mar. 2005.

FRANKLIN RD, KUTTEH WH. Characterization of immunoglobulins and cytokines in human cervical mucus: influence of exogenous and endogenous hormones. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 42, n. 2, p. 93-106, mar. 1999.

GARCÍA-CLOSAS, R; CASTELLSAGUÉ, X; BOSCH, X; GONZÁLEZ, A. C. The role diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 629-637, 2005.

GARFIELD, E. All sorts of warts – separating facts from fiction. Part 2. Treatment, spontaneous regression, and key publications, **Essays of an Information Scientist**, v. 11, n. 7, p. 68-74, mar. 1988.

GIANNINI, S. L.; AL-SALEH, W.; PIRON, H.; JACOBS, N.; DOYEN, J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, n. 2, p. 183-189, aug. 1998.

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**, v. 97, n. 5, p. 654-659, feb. 2002.

GINDERACHTER, J. A.; MOVAHEDI, K.; GHASSABEH, G. H.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIM, A.; RAES, G.; BAETSELIER, P. D. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, v. 211, p. 487-501. 2006.

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

GRAVITT, P. E.; KOVACIC, M. B.; HERRERO, R.; SCHIFFMAN M.; BRATTI C.; HILDESHEIM, A.; MORALES, J.; ALFARO, M.; SHERMAN, M. E.; WACHOLDER, S.; RODRIGUEZ, A. C.; BURK R. D. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. **The International Journal of Cancer**, v. 121, n. 12, p. 2787-2793, dec. 2007.

GROUX, H. O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 737-742, oct. 1997.

HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A.; ACCARDI, R.; BOUVARD, V.; MANSOUR, M.; VINCENT, I.; GISSMANN, L.; IFTNER, T.; SIDERI, M.; STUBENRAUCH, F.; TOMMASINO, M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3186-3197, mar. 2007.

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

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**, v. 338, n. 7, p. 423-427, feb. 1998.

HUETTNER, C.; PAULUS, W.; ROGGENDORF, W. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 2, p. 317-322, feb. 1995.

HUM, S. J.; RHYU, J. W.; KIM, E. J.; JEON, K. C.; HWANG, E. S.; PARQUE, J. S. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Letters**, v. 179, n. 2, p. 205-212, may. 2002.

IKARASHI, M.; NAKASHIMA, H.; KINOSHITA, M.; SATO, A.; NAKASHIMA, M.; MIYAZAKI, H.; NISHIYAMA, K.; YAMAMOTO, J.; SEKI, S. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 6, p. 1325-1336, Dec. 2013.

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

JACOBS, N.; RENARD, I.; AL-SALEH, W.; HUBERT, P.; DOYEN, J.; KEDZIA, W.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Distinct T cell subsets and cytokine production in cultures derived from transformation zone and squamous intraepithelial lesion biopsies of the uterine cervix. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 49, n. 1, p. 6-13, jan. 2003.

JIMENEZ-FLORES, R.; MENDEZ-CRUZ, R.; OJEDA-ORTIZ, J.; MUÑOZ-MOLINA, R.; BALDERAS-CARRILLO, O.; DE LA LUZ DIAZ-SOBERANES, M.; LEBECQUE, S.; SAELAND, S.; DANERI-NAVARRO, A.; GARCIA-CARRANCA, A.; ULLRICH, S. E.; FLORES-ROMO, L. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. **Immunology**, v. 117, n. 2, p. 220-228, feb. 2006.

JONULEIT, H.; KNOP, P.; ENK A. H. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research*, v. 289, p.1-8. 1996

KIM, J.; MODLIN, R. L.; MOY, R. L.; DUBINETT, S. M.; MCHUGH, T.; NICKOLOFF, B. J.; UYEMURA, K. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 4, p. 2240-2247, aug. 1995.

KINOSHITA, M.; UCHIDA, T.; SATO, A.; NAKASHIMA, M.; NAKASHIMA, H.; SHONO, S.; HABU, Y.; MIYAZAKI, H.; HIROI, S.; SEKI, S. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 903-910, Nov. 2010.

KOBAYASHI, A.; WEINBERG, V.; DARRAGH, T.; SMITH-MCCUNNE, K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 5, p. 412-20, sep. 2008.

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

KOBAYASHI, A.; WEINBERG, V.; DARRAGH, T.; SMITH-MCCUNE, K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 5, p. 412-420, sep. 2008.

KOLLISCH, G.; KALALI, B. N.; VOELCKER, V.; WALLICH, R.; BEHRENDT, H.; RING, J.; BAUER, S.; JAKOB, T.; MEMPEL, M.; OLLERT, M.; Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. **Immunology**, v. 114, n. 4, p. 531–541, apr. 2005.

KRÜGER-KRASAGAKES, S.; KRASAGAKIS, K.; GARBE, C.; SCHMITT, E.; HÜLS, C.; BLANKENSTEIN, T.; DIAMANTSTEIN, T. Expression of interleukin 10 in human melanoma. **The British Journal of Cancer**, v. 70, n. 6, p. 1182-1185, dec. 1994.

LE BON, A.; TOUGH, D. F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 4, p. 132-436, aug. 2002.

LEONG, C. M.; DOORBAR, J.; NINDL, I.; YOON, H. S.; HIBMA, M. H. Loss of epidermal Langerhans cells occurs in human papillomavirus alpha, gamma, and mu but not beta genus infections. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 472-480, feb. 2010.

LIU, J.; ZHANG, N.; LI, Q.; ZHANG, W.; KE, F.; LENG, Q.; WANG, H.; CHEN, J.; WANG, H. Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19495, apr. 2011.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2

mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, nov. 2002.

MADELEINE, M. M.; BRUMBACK, B.; CUSHING-HAUGEN, K. L.; SCHWARTZ, S. M.; DALING, J. R.; SMITH, A. G.; NELSON, J. L.; PORTER, P.; SHERA, K. A.; MCDOUGALL, J. K.; GALLOWAY, D. A. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 11, p. 1565-1574, dec. 2002.

MAZIBRADA, J.; RITTÀ, M.; MONDINI, M.; DE ANDREA, M.; AZZIMONTI, B.; BORGOGNA, C.; CIOTTI, M.; ORLANDO, A.; SURICO, N.; CHIUSA, L.; LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. **Gynecology Oncology**, v. 108, n. 1, p. 112-120, jan. 2008.

MEMAR, B. S.; STEPHEN, K.; TYRING, M. D. Antiviral agents in dermatology: current status and future prospects. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 9, p. 597-606, 1995.

MOBERG, M.; GUSTAVSSON, I.; PANELLI, M. C.; GYLLENSTEN, U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 854-859, 2004;

MOCELLIN, S.; PANELLI, M. C.; WANG, E.; NAGORSEN, D.; MARINCOLA, F. M. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 36-43, jan. 2003.

MOLLING, J. W.; DE GRUIJL, T. D.; GLIM, J.; MORENO, M.; ROZENDAAL, L.; MEIJER, C. J.; VAN DEN EERTWEGH, A. J.; SCHEPER, R. J.; VON BLOMBERG M. E.; BONTKES, H. J. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1749-1755, oct. 2007.

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

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, p. 683-765, 2001.

MOSCICKI, A.B. HPV infections in adolescents. **Diseases Markers**, v. 23, n. 4, p. 229-234, 2007.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 205-218, dec. 2008.

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 & Experimental Immunology**. v. 116, n.1, p. 33-40. Apr. 1999

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J. R.; ANTONIA, S. J.; MESSINA, J. L.; CHANDLER, P.; KONI, P. A.; MELLOR, A. L. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 280-290, jul. 2004.

NAKAGOMI, H.; PISA, P.; PISA, E. K.; YAMAMOTO, Y.; HALAPI, E.; BACKLIN, K.; JUHLIN, C.; KIESSLING, R. Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. **The International Journal of Cancer**, v. 63, n. 3, p. 366-371, Nov. 1995.

NAKAMURA, T.; SHIMA, T.; SAEKI, A.; HIDAKA, T.; NAKASHIMA, A.; TAKIKAWA, O.; SAITO, S. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3- expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. **Cancer Science**, v. 98, n. 6, p. 874–881, jun. 2007.

NARDELLI-HAEFLIGER, D.; WIRTHNER, D.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; HILDESHEIM, A.; PONCI, F.; GRANDI, P. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 15, p. 1128-1137, aug. 2003.

NEES, M.; GEOGHEGAN, J. M.; HYMAN, T.; FRANK, S.; MILLER, L.; WOODWORTH, C. D. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4283-4296, may. 2001.

ORIEL, J. D. Anal warts and anal coitus. **The British Journal of Venereal Diseases**, v. 47, n. 5, p. 373–376, out. 1971.

PAYAN, C.; DUCANCELLE, A.; ABOUBAKER, M. H.; CAER, J.; TAPIA, M.; CHAUVIN, A.; PEYRONNET, D.; HEN, E. L.; ARAB, Z.; LEGRAND, M. C.; TRAN, A.; POSTEC, E.; TOURMEN, F.; AVENEL, M.; MALBOIS, C.; BRUX, M. A. DE;

DESCAMPS, P.; LUNEL, V. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples using a general realtime PCR on Mx4000 and Lightcycler systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 897-901, 2007.

PAYNE, J. F. On the contagiousness of common warts. **British Journal of Dermatology**, v. 3, p. 185–188, 1891.

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

PISA, P.; HALAPI, E.; PISA, E. K.; GERDIN, E.; HISING, C.; BUCHT, A.; GERDIN, B.; KIESSLING, R. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7708-7712, aug. 1992.

REZENDE, T. M.; VIEIRA, L. Q.; CARDOSO, F. P.; OLIVEIRA, R. R.; de OLIVEIRA MENDES, S. T.; JORGE, M. L.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **International Endodontic Journal**. v. 40, n.8, p. 603-611, Aug. 2007.

RIGONI-STERM, D. Fatti statistici relativi alle malattie cancerose che sopravvivono di base alle poche cose dette dal dottore. **Giornale Servire Progresso Patologia i Terapia**, v. 2, p. 507–517, 1842.

ROHAN, T. E.; BURK, R. D.; FRANCO, E. L. Toward a reduction of the global burden of cervical cancer. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 189, n. 4, p. S37-9, oct. 2003.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M.; KUNIYASU, Y.; NOMURA, T.; TODA, M.; TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. **Immunology reviews**, v. 182, p. 18– 32, aug. 2001.

SAN JOSÉ, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 7, p. 453-459, July. 2007.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D.K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, n. 3, p. 231-240, may 2002.

SASLOW, D.; CASTLE, P. E.; COX, T. J. DAVEY, D. D.; EINSTEIN, M. H.; FERRIS, D. G.; GOLDIE, S. J.; HARPER, D. M.; KINNEY, W.; MOSCICKI, A. B.; NOLLER, K. L.; WHEELER, C. M.; ADES, T.; ANDREWS, K. S.; DOROSHENK, M. K.; KAHN, K.G.; SCHMIDT, C.; SHAFETY, O.; SMITH, R. A.; PARTRIDGE, E. E.; GARCIA, F. American cancer society guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. **A Cancer Journal for Clinicians**, v.57, n. 1, p. 7-28, jan./fev. 2007.

SCHLECHT, N. F.; PLATT, R. W.; DUARTE-FRANCO, E.; COSTA, M. C.; SOBRINHO, J. P.; PRADO, J. C.; FERENCZY, A.; ROHAN, T. E.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 17, p. 1336–1343, 2003.

SENESCHAL, J.; CLARK, R. A.; GEHAD, A.; BAECHER-ALLAN, C. M.; KUPPER, T. S.; Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. **Immunity**. v. 36, n. 5, p. 873-884, May. 2012.

SHIMADA, T.; MIYASHITA, S.; MIURA, S.; KAKAYAMA, D.; MIURA, K.; FUKUDA, M.; MASUZAKI, H. Genital human papillomavirus infection in mentally-institutionalized virgins. **Gynecologic Oncology**, v. 106, n. 3, p. 488-489, 2007.

STANILOV, N.; MITEVA, L.; STANKOVA, N.; JOVCHEV, J.; DELIYSKI, T.; STANILOVA, S. Role of IL-12P40 and IL-10 in progression of colorectal cancer. **Khirurgiia (Sofia)**, v. 4, n. 5, p. 26-29, 2010.

SURVILADZE, Z.; DZIDUSZKO, A.; OZBUN, M. A. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, feb. 2012.

SYRJÄNEN, S.; NAUD, P.; SARIAN, L.; DERCHAIN, S.; ROTELI-MARTINS, C.; LONGATTO-FILHO, A.; TATTI, S.; BRANCA, M.; ERZEN, M.; HAMMES, L. S.; COSTA, S.; SYRJÄNEN, K. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Archiv**, v. 455, n. 6, p. 505-515, dec. 2009.

TAUBE, J. M.; NICHOLS, A. D.; BORNMAN, L. S.; BORNMAN, D. M.; JACKSON, J. B. Langerhans cell density and high-grade vulvar intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus infection. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 34, n. 7, p. 565-570, jul. 2007.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24, p. S1-15, mar. 2006.

VAN DUIN, M.; SNIJDERS, P. J.; SCHRIJNEMAKERS, H. F.; VOORHORST, F. J.; ROZENDAAL, L.; NOBBENHUIS, M. A.; VAN DEN BRULE, A. J.; VERHEIJEN, R. H.; HELMERHORST, T. J.; MEIJER, C. J. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. **International Journal of Cancer**. v. 98, p. 590–595, 2002.

WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; BREITTMAYER, J. P.; COTTREZ, F.; GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. **Immunity**, v. 18, n. 5, p., 605-617, may. 2003.

WOO, Y. L.; STERLING, J.; DAMAY, I.; COLEMAN, N.; CRAWFORD, R.; VAN DER BURG, S H.; STANLEY, M. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 115, n. 13, p. 1616-1621, dec. 2008.

APÊNDICE A - AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DO BANCO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS



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



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que autorizo o pesquisador Thiago Theodoro Martins Prata a utilizar as amostras biológicas registradas no banco de amostras, sob minha responsabilidade, junto ao Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a execução do projeto de pesquisa “Avaliação do perfil imunorregulatório no epitélio e estroma de amostras cervicais positivas para DNA de HPV, com ou sem alteração histopatológica.”.

Campo Grande 26 de junho de 2013.

Prof. Dra. Inês Aparecida Tozetti
FAMED/UFMS
Lab. de Imuno 3345-7388 ou 7370

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS COM FUNÇÃO IMUNORREGULATÓRIA EM AMOSTRAS DE CÉRVIXE UTERINA

Pesquisador: Thiago Theodoro Martins Prata

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19359913.2.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: FUND. DE APOIO E DE DESENV. DO ENSINO, CIENCIA E TECN. DO ESTADO DO MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 355.019

Data da Relatoria: 08/08/2013

Apresentação do Projeto:

Esta pesquisa caracteriza-se como laboratorial tipo caso-controle, baseada na identificação dos diferentes fenótipos celulares com perfil

imunorregulatório e avaliação da expressão de MHC de classe II pelas células presente nos microambientes imunorregulados pela IL-10. A

pesquisa, por permissão da direção do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, dar-se-á no laboratório de Imunologia da Universidade Federal de

Mato Grosso do Sul, situado em Campo Grande, Mato grosso do Sul. Serão utilizadas 80 amostras de biopsia cervical emblocadas em parafina de

pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande, MS no período de maio de 2010 a março de 2011, pertencentes ao

banco de amostras biológicas da Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti. Tais amostras serão selecionadas de forma não probabilística por conveniência.

Dentre as 80 amostras, serão selecionadas 60 com positividade para HPV comprovada por PCR em Tempo Real (RQ-PCR) e em diferentes graus

de lesão histopatológica. As outras 20 serão de pacientes negativas para DNA de HPV comprovada por RT-PCR com ou sem Neoplasia Intraepitelial

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: ((67) 33)45-7-187 **Fax:** ((67) 33)45-7-187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br

UFMS



Continuação do Parecer: 355.019

cervica

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar os fenótipos celulares com função imunorregulatória em amostras de cérvix uterina.

Objetivo Secundário:

a) Identificar a presença da citocina imunorregulatória IL-10 e os fenótipos celulares responsáveis pela sua produção em amostras com e sem lesões

cervicais; b) Analisar a associação entre a presença e quantidade de células imunorregulatórias com o grau da lesão intra-epitelial observado; c)

Analisar a associação entre a presença e quantidade de células imunorregulatórias com a carga viral do HPV nas amostras estudadas; d) Associar a

expressão do MHC de classe II com a presença de células com função imunorregulatória.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo contribuirá para o melhor entendimento dos processos patológicos associados à persistência, regressão da infecção pelo HPV e progressão para a forma maligna de neoplasia cervical, permitindo que estratégias de diagnóstico e prevenção já estabelecidas sejam otimizadas e adequadas à região do Mato Grosso do Sul. Por se tratar de pesquisa retrospectiva sobre banco de material biológico regularizado junto a UFMS, acreditamos que os riscos já foram avaliados quando da coleta do material.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante em sua área técnica, conduzida por profissional competente e infraestrutura adequada para a consecução dos objetivos propostos. Há cronograma e orçamento compatíveis. Não foram detectados conflitos de interesse.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O autor solicita dispensa da utilização de TCLE o que é viável face ao fato de tratar-se de pesquisa sobre banco de material biológico, cuja detentora é a própria orientadora da pesquisa. A folha de rosto encontra-se assinada pela professora orientadora que acumula nesta pesquisa a condição de

Recomendações:

O material biológico deve estar vinculado a doadora de modo que qualquer resultado que possa ser interessar à saúde desta, DEVERÁ ser prontamente notificado, como forma de benefício pela participação no processo de doação do material.

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: ((67) 33)45-7-187 **Fax:** ((67) 33)45-7-187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br

UFMS



Continuação do Parecer: 355.019

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada consta

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPO GRANDE, 09 de Agosto de 2013

Assinador por:
Edilson dos Reis
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: ((67) 33)45-7-187 **Fax:** ((67) 33)45-7-187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br