



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**WANÚZIA KEYLA MIRANDA**

**IMPACTO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO SOBRE  
A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HLA-DRB1 NAS  
CÉLULAS DE LANGERHANS DO COLO UTERINO**

**Recife  
2011**

**WANÚZIA KEYLA MIRANDA**

**IMPACTO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO SOBRE  
A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HLA-DRB1 NAS  
CÉLULAS DE LANGERHANS DO COLO UTERINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloisa Ramos Lacerda de Melo

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Teresinha Tenório Silva

**Recife  
2011**

## Miranda, Wanúzia Keyla

Impacto do papilomavírus humano sobre a expressão da proteína HLA-DRB1 nas células de Langerhans do colo uterino / Wanúzia Keyla Miranda. – Recife: O Autor, 2011.

144 folhas: il., fig., quadros: 30 cm.

Orientador: Heloisa Ramos Lacerda de Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

**1. Ginecologia. 2. Neoplasia do colo do útero. 3.**

**Papilomavírus. I. Melo, Heloisa Ramos Lacerda de. II. Título.**

UFPE

618.142

CDD (20.ed.)

CS2012-046



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMÉDTROP)

## RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

### WANÚZIA KEYLA MIRANDA

No dia 15 de dezembro de 2011, às 08h00, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Presidente da Banca - UFPE), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Magalhães da Silveira (UFPE), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Regina Piuvezam (UFPB) e a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vilma Guimarães de Mendonça (IMIP), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda WANÚZIA KEYLA MIRANDA sobre a sua Tese intitulada “IMPACTO DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEINA HLA-DR NAS CÉLULAS DE LANGERHANS DO COLO UTERINO”, a qual foi orientada pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (UFPE) e co-orientada pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Terezinha Tenório da Silva (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, às seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho	APROVADA
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Vera Magalhães da Silveira	APROVADA
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Maria Amélia Vieira Maciel	APROVADA
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Márcia Regina Piuvezam	APROVADA
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Vilma Guimarães de Mendonça	APROVADA

---

*Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho*

---

*Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Magalhães da Silveira*

---

*Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Amélia Vieira Maciel*

---

*Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Regina Piuvezam*

---

*Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vilma Guimarães de Mendonça*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Souza Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

José Thadeu Pinheiro

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**CORPO DOCENTE**

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Cláudia Maria Assis Costa

### ***Dedico***

*A Deus, ministrador de milagres, esperança e força, dedico este trabalho, fruto da Sua poderosa mão sobre mim.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, amigo perene, socorro bem presente na hora da angústia

Meu pai, **Pedro Paulo Miranda** (*in memoriam*), pela sua simplicidade e capacidade de igualar com sua alegria, tempos de adversidade e bonança.

Minha mãe, **Maria Ivete Silva Miranda**, fonte inesgotável de força e de incansável estímulo

Aos meus filhos **Roberto** e **Renata Miranda**, primícias de Deus para minha vida, pela aceitação silenciosa das minhas ausências, os amo incondicionalmente.

Ao amado **Fernando Antônio Cavalcanti Viana**, pelo companheirismo junto às minhas dificuldades.

Dra. **Heloísa Ramos**, minha orientadora, pela visão crítica e construtiva, pelo incentivo e crédito ao meu trabalho.

Dra. **Terezinha Tenório**, pelos acréscimos e avanços que trouxe a este trabalho, pela estudiosa e pesquisadora, pela ética exemplar.

Dr. **Ricardo Ximenes**, pelas orientações ponderadas, estatística e cientificamente embasadas com inabalável calma.

Dr. **Luciano Montenegro**, sempre receptivo, pelo quanto me favoreceu na execução da morfometria aplicada neste estudo.

Dr. **Paulo Souza**, pesquisador em biologia molecular, pela disponibilidade que demonstrou.

**Maria de Lourdes**, incansável e sorridente ajuda nos desafios contra o tempo, em todo o desenvolver desta pesquisa, nunca desanimando.

**Gisélia Barreto** pelo nunca negar-se a, por várias vezes, levar meus materiais de estudo à Recife, mesmo diante das dificuldades da sua própria vida.

**Regina Lúcia Vieira**, sempre disposta a levantar o material do arquivo de histopatologia.

**Anaberg Maciel**, pelo interesse em me ajudar na busca das pacientes que precisei para compor este trabalho.

**Anderson Henrique Nascimento**, pelas diversas vezes em que estendeu suas mãos ao teclado para atender meus pedidos dentro do mínimo de tempo que dispunha.

À **Universidade Federal de Pernambuco**. Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, pela oportunidade em realizar este curso.

À todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Elevo os meus olhos para os montes,  
De onde virá o meu socorro?  
Meu socorro vem do Senhor que fez os  
céus e a terra...”*

*Salm. 121: 1, 2.*

MIRANDA, Wanúzia Keyla. **Impacto do Papilomavírus Humano sobre a ação das Células de Langerhans**. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

---

## RESUMO

As lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino induzidas pelo Papilomavírus humano (HPV) estão relacionadas a falhas nos mecanismos imunes de apresentação antigênica. Ciente que alterações na expressão das proteínas do sistema HLA constituem um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão da proteína HLA-DRB1 nas células de Langerhans em portadoras de lesões intraepiteliais cervicais, relacionando-a aos tipos de HPV. Este estudo foi realizado no Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer do estado da Paraíba, no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2010 e aprovado pelo comitê de ética. Nele foram incluídas 123 portadoras de lesão de baixo grau e 105 de lesão de alto grau, confirmadas histologicamente depois de submetidas à colposcopia com biópsia e coleta de amostra para PCR. Obtiveram-se três secções histológicas: uma para diagnóstico histopatológico e duas para imuno-histoquímica usando-se o S100 e HLA-DRB1. A imunoexpressão foi quantificada por morfometria através de *software* específico e relacionadas ao tipo de HPV usando-se o teste U de Mann-Whitney. Para relacionar as atipias epiteliais ao tipo de HPV usou-se o teste qui-quadrado. Neste trabalho, apenas tipos virais de alto risco foram identificados predominando o 16 (48,1%), 18 (24,6%) e 31 (19,3%), inclusive em lesões intraepiteliais de baixo grau. Constatou-se menor imunoexpressão da HLA-DR que da S100. As portadoras do HPV 31 mostraram redução estatisticamente significativa da expressão de HLA-DRB1, contudo, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de HLA-DRB1 entre lesões intraepiteliais de baixo e alto grau. As portadoras de lesão intraepitelial com PCR negativas igualmente apresentaram expressão de HLA-DRB1. O presente estudo possibilitou observar que a expressão da proteína HLA-DRB1 nas células de Langerhans se mostrou reduzida nas lesões intraepiteliais induzidas pelo HPV 31.

**Palavras-chave:** Papilomavírus humano, lesão intraepitelial cervical, proteína HLA-DR, proteína S100, apresentação antigênica.

MIRANDA, Wanúzia Keyla. **Impact of human papilloma virus on the action of Langerhans cells.** 2011. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

---

## ABSTRACT

Cervical intraepithelial lesions induced by Human papillomavírus are related to failure in antigen presentation mechanisms. Aware that changes in HLA protein expression is a risk factor for the development of cervical cancer, the aim of this study is to evaluate the HLA-DRB1 expression on Langerhans cells in women with intraepithelial lesions and oncogenic HPV types. This study was conducted at Specialized Center for Cancer Diagnosis of Paraíba, during January 2009 still January 2010 and approved by the ethics committee. Were included 123 patients with low grade SIL and 105 with high-grade SIL, histopathologically confirmed after undergoing colposcopy with biopsy and PCR collects. Three histological sections were obtained: one for histopathologic diagnostic and two for immunohistochemistry using S100 and HLA-DRB1. The immunostaining was quantified by morphometry using specific software and related to HPV type by U Mann-Whitney test. To relate HPV type with epithelial atypia was used qui-square test. In this work, only high-risk HPV were identified, predominantly 16(48,1%), 18(24,6%) e 31(19,3%), even in low grade intraepithelial lesions. The immunoexpression of S100 was higher than HLA-DRB1. There was no difference on HLA-DRB1 expression between low and high grade intraepithelial lesions. The bearers of intraepithelial lesions with negative PCR also demonstrated HLA-DRB1 expression. Patients with 31 HPV showed a significantly lower expression of HLA-DRB1. Thus, this study allowed observing that the expression of HLA-DRB1 showed to be reduced in cervical lesions induced by 31 HPV.

**Key-words:** Human papillomavírus, cervical intraepithelial lesions, HLA-DR protein, S100 protein, antigen presentation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Diagrama e modelo esquemático da estrutura da molécula de HLA classe II.	23
<b>Figura 2</b> - Papilomavírus humano constituído por capsídeo formado por 72 capsômeros, exibindo simetria icosaédrica	27
<b>Figura 3</b> - Capsídeo envolvendo dupla hélice de DNA circular	29
<b>Figura 4</b> - Esquema da organização genômica do HPV16	30
<b>Figura 5</b> - Estágios da ativação dos linfócitos T	34
<b>Figura 6</b> - Mecanismos moleculares da carcinogênese induzida pelo HPV	39
<b>Figura 7</b> - Amostra citopatológica cervico-vaginal exibindo características de lesão intraepitelial de baixo grau (NICI – HPV).	41
<b>Figura 8</b> - Secção histológica da cérvix uterina exibindo neoplasia intraepitelial grau I	41
<b>Figura 9</b> - Amostra citopatológica cervico-vaginal exibindo características de lesão intraepitelial de alto grau. Microscopia óptica.	42
<b>Figura 10</b> - Secção histológica da cérvix uterina exibindo características de neoplasia intraepitelial cervical grau III.	42
<b>Figura 11</b> - Corte histológico de linfonodo normal. Controle de qualidade para imunomarcador S100.	58
<b>Figura 12</b> - Imunomarcagem das células de Langerhans usando-se S100.	60
<b>Figura 13</b> – Determinação da área histológica para cálculo morfométrico	64
<b>Figura 14</b> - Seleção da área tecidual à mão livre para realização da morfometria	64
<b>Quadro 1</b> - Relação entre os tipos de papilomavírus humano e lesões epiteliais benignas	31
<b>Quadro 2</b> - Relação entre os tipos de papilomavírus humano e lesões epiteliais pré malignas e malignas	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPV	Papiloma vírus humano
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano, locus DR.
HLA-DRB1	Antígeno leucocitário humano, lócusR D e antígeno B1.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
RNA	Ácido ribonucléico.
E6	<i>Early 6 protein</i>
E7	<i>Early 7 protein</i>
CD34	Célula derivada da medula óssea, classe diferencial 34.
APC	Célula apresentadora de antígeno profissional.
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade.
MIP-3 $\alpha$	Proteína Inibidora da Migração
TGF $\alpha$	Fator de crescimento tumoral- alfa
IL	Interleucina
CD1A	Proteína de superfície presente em células precursoras das células de Langerhans
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
CEDC	Centro Especializado de diagnostico do Câncer da Paraíba
SUS	Sistema único de saúde

NIC Neoplasia intraepitelial cervical

Nested PCR Ampliação de seqüência gênica mais específica na PCR.

S 100 Proteína expressa na superfície de algumas células, dentre as quais a célula de Langerhans.

MY09 Primer consensus externo aplicado à PCR.

MY11 Primer consensus externo aplicado à PCR.

GP05+ Primer específico aplicado ao Nested PCR.

GP06+ Primer específico aplicado ao Nested PCR.

PAP Peroxidase-antiperoxidase.

PBS Solução tampão salina.

UCM Meio coletor universal

ASC-US Atipia escamosa de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1 Células de Langerhans	19
2.2 Papilomavírus Humano e resposta imune celular	28
2.3 Carcinogênese Cervical e Sistema Imune	37
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos	46
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>48</b>
4.1 Tipo de Estudo	48
4.2 Local da Pesquisa	48
4.3 População de Estudo	49
4.4 Critérios de Inclusão	49
4.5 Critérios de Exclusão	49
4.6 Tamanho Amostral	49
4.7 Definição das Variáveis	52
4.7.1 Definição das variáveis	52
4.7.2 Categorização das variáveis	53
4.8 Métodos de Coleta e Processamento de Dados	53
4.9 Qualidades dos Instrumentos de Medidas	56
4.9.1 Técnicas utilizadas	57
4.10 Análises Estatísticas	65
4.11 Aspectos Éticos	65
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>

<b>5.1 Artigo 1:</b> Expressão da HLA-DR nas células de Langerhans em portadoras de lesões intraepiteliais cervicais induzidas pelo HPV	69
<b>5.2 Artigo 2:</b> Associação da tipagem do HPV ao exame citopatológico no rastreio do câncer e manejo das lesões cervicais de baixo grau	82
<b>6 CONCLUSÕES</b>	96
<b>7 RECOMENDAÇÕES</b>	98
<b>REFERÊNCIAS</b>	100
<b>APÊNDICES</b>	
<b>APÊNDICE 1:</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	107
<b>APÊNDICE 2:</b> Formulário de colposcopia	110
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO 1:</b> Certidão do Comitê de Ética	
<b>ANEXO 2:</b> Laudo de avaliação histopatológica (SUS)	
<b>ANEXO 3:</b> Laudo de avaliação citopatológica (SUS)	
<b>ANEXO 4:</b> Normas da Revista	
<b>ANEXO 5:</b> Anexo da submissão	

# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da alta prevalência da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico nos diferentes estágios das lesões pré-cancerosas do colo uterino e vagina, a ocorrência freqüente de regressão espontânea destas lesões reflete o caráter transitório desta infecção (IARC, 2007), sugerindo que os tipos virais de alto risco, embora desempenhem importante papel na etiologia do câncer genital, não são suficientes para instalação da carcinogênese (ITO et al., 2010).

A resposta imune do hospedeiro face à presença do HPV mostra-se como um fator determinante do curso da infecção, confrontando com a capacidade viral de evadir-se desta resposta imune promovendo a infecção persistente e favorecendo a progressão ao câncer cervical (MONSONEGO, 2010).

As células de Langerhans, encarregadas de capturar e apresentar antígenos mostram-se essenciais na iniciação da resposta imune celular específica por meio dos linfócitos T (VALLADEAU, 2010).

Proteínas produzidas pelo sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA) classes I e II, expressas na superfície das células de Langerhans, executam papel crucial no modo em que peptídeos do HPV são apresentados aos linfócitos T. A intensa afinidade entre receptores das células T (TCR) com peptídeos antigênicos virais expressos na superfície das células de Langerhans é condição necessária para iniciar uma resposta imune (MADELEINE et al., 2008).

A identificação dos tipos virais aponta para mulheres que terão maior risco para o desenvolvimento de câncer do colo uterino e que deverão submeter-se a seguimento mais rigoroso. A prevalência dos tipos virais em diferentes regiões é também um dado importante considerando-se a proposta da vacinação como método de prevenção contra lesões HPV induzidas (BRISMAR-WENDEL et al., 2009).

Diferentes tipos de HPV promovem a circulação de linfócitos T específicos, os quais, apropriadamente estimulados, constituem-se em células efetoras e importantes co-fatores na etiologia do câncer HPV-induzido (DE VOS VAN STEENWIJK et al., 2010).

A proteína HLA-DRB1\*0301, produzida pelos genes que compõem o sistema HLA, liga-se aos peptídeos antigênicos do HPV expondo-os na superfície das células apresentadoras de antígenos. Sem a participação desta proteína, não há reconhecimento antigênico e estimulação dos linfócitos capazes de suscitar uma resposta imune efetora T- dependente, ainda que as proteínas virais precoces E6 e

E7 representem um potente antígeno, expresso na maioria dos cânceres cervicais e lesões precursoras (WU et al., 2010).

A integração do DNA do HPV ao DNA do hospedeiro próxima ao gene *c-myc*, pode modificar a expressão dos genes que constituem o sistema HLA e reduzir a expressão da proteína HLA-DR, promovendo uma deficiente resposta imune celular (CROMME et al., 1993). A ação do HPV sobre a expressão desta molécula de superfície constitui-se num mecanismo de evasão viral à resposta imune do hospedeiro. A interferência da infecção por diferentes tipos de HPV sobre a expressão da molécula HLA-DR, alvo para terapia imunomodulatória e atual fator imunogenético de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, tornou-se a motivação maior deste estudo voltado ao complexo intromento vírus-hospedeiro, refletido nas diferentes evoluções apresentadas pelas lesões HPV induzidas.

# REVISÃO DA LITERATURA

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Células de Langerhans

O organismo dispõe de mecanismos inespecíficos e específicos que visam impedir a entrada de microorganismos agressores. Dentre os inespecíficos, temos as barreiras físicas, químicas e estruturais dos tecidos que influenciam a permanência do antígeno em determinados sítios (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2010).

Uma linhagem especial de células de defesa denominada dendrítica compõe as principais vias de entrada de patógenos: a superfície mucosa, pele, trato gastrointestinal, respiratório, sendo também encontradas no sangue, linfa, órgãos não linfóides e linfóides. A denominação dendrítica é conseqüente a apresentação morfológica de longas protuberâncias citoplasmáticas: os dendritos. A célula mielóide CD34, derivada da medula óssea é a precursora das células dendríticas, de distribuição epitelial (células de Langerhans) e as de distribuição intersticial (VAN DE LAAR et al., 2011).

Especializadas em capturar células apoptóticas, proteínas, lipídeos, carboidratos e oligonucleotídeos presentes em micro-organismos, as células de Langerhans, em meio ao epitélio de revestimento, são responsáveis por iniciar a resposta imune adaptativa via apresentação de antígenos as células T naíve, nos linfonodos periféricos (STANLEY, 2009).

As células de Langerhans foram assim designadas em homenagem a Paul Langerhans que as descreveu em 1868 pensando tratar-se de uma célula nervosa receptora. Foram descritas como medindo de 15  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , no maior diâmetro; apresentando cromatina nuclear frouxa, núcleo lobulado ou indentado, ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias proeminentes, complexo de Golgi bem desenvolvido, lisossomos e grânulos de Birbeck, específicos destas células. Não possuem tonofilamentos ou desmossomos que as interliguem à outras células (LINS et al., 2003). As características morfológicas e ultra-estruturais das células de Langerhans foram observadas, respectivamente, ao microscópico óptico e eletrônico.

Conhecidas como células apresentadoras de antígenos profissionais ou “sentinelas imunes”, representam 3% a 8% das células da epiderme em condições de normalidade (LINS et al., 2003).

As células de Langernhans desempenham sua função dependentes da

expressão na superfície de moléculas que se ligam aos peptídeos derivados do processamento dos antígenos capturados. Estas moléculas são heterodímeros polimórficos pertencentes ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC), cuja expressão em humanos consiste no sistema antígeno leucocitário humano (HLA), cuja função é de apresentar peptídeos imunogênicos às células T (KAPLAN, 2010).

A migração dos precursores das células de Langerhans da derme para a epiderme se faz em resposta à proteína inibidora da migração-3 alfa ( $MIP-3\alpha$ ), fator de crescimento tumoral alfa ( $TGF-\alpha$ ), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), além de citocinas liberadas por macrófagos e células epiteliais nos tecidos em resposta à presença de antígenos (SANTOS, 2010).

Imaturas, as células de Langerhans expressam marcadores de superfície como a proteína Langerin- CD207 responsável por interagir com açúcares que compõem a superfície dos antígenos, facilitando a captura destes. Está envolvida na formação dos grânulos de Birbeck, sendo encontrada, predominantemente, no compartimento endossomal destas células. Os grânulos de Birbeck estão assim, estreitamente relacionados à esta proteína de superfície. São morfologicamente semelhantes à raquetes e provavelmente derivados de invaginações da membrana celular. São característicos das células de Langerhans e apresentam-se como estruturas tubulares rígidas, de tamanhos variáveis, contendo em seu interior um material eletrodense. As extremidades apresentam-se rombas e possuem estriações transversais. Constituem-se num compartimento de reciclagem, envolvido na endocitose de partículas estranhas e no processamento de antígenos (THEPAUT et al., 2009).

Após a captura e internalização, inicia-se o processamento dos antígenos os quais são degradados em peptídeos por enzimas hidrolíticas (CHEONG et al., 2007). Os peptídeos antigênicos degradados encontrarão as moléculas HLA-DR produzidas no retículo endoplasmático rugoso e apenas ligados a estas serão expressos na superfície das células de Langerhans, prosseguindo-se à apresentação antigênica aos linfócitos TCD4 naives. Portanto, a proteína Langerin constitui-se num receptor endocítico de antígenos (JENNY et al., 2007). Na maturidade, reduzem a expressão desta proteína e expressam intensamente as moléculas de superfície HLA-DR (KAPLAN, 2010).

A expressão da proteína de superfície HLA-DR demonstra uma reação das células de Langerhans à presença do antígeno invasor e uma intensa ação local de citocinas (RODRIGUES; ZERIBINI; BARBIERI, 2008).

O HLA representa um conjunto de genes localizados no cromossomo 6p21.

33 e conhecidos como complexo maior de histocompatibilidade (MHC), encontrado na maioria dos vertebrados, com importantes funções imunológicas. Descoberto em 1937 por Peter Gorer, o HLA está presente em todos os tecidos do organismo, expressando duas classes de proteínas: HLA: I e II. A classe I está representada por um grupo de proteínas expressas na superfície de todas as células nucleadas. Dentre as moléculas da classe I, temos as denominadas HLA-A, HLA-B, HLA-C as quais se associam a antígenos formados no interior das células para posteriormente serem apresentados aos linfócitos T CD8. Exercem importante papel na identificação de células genótipo e fenotipicamente modificadas e por isto consideradas estranhas. A classe II tem sua expressão confinada à células imunes competentes: macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, incluindo as células de Langerhans. São responsáveis pela apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4 através do contato célula-célula (JORGENSEN; BUUS; NIELSEN, 2010).

Dentre as moléculas da classe II temos as denominadas HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DM e HLA-DO. Destas, a mais importante é a HLA-DR, descoberta em 1970, cuja principal função é induzir e regular a resposta imune. A nomenclatura destas proteínas é baseada primeiramente no grupo de genes HLA. A segunda denominação tem por base o locus: DR, DP, DQ e a terceira parte da nomenclatura refere-se ao antígeno no locus: B1 03 01. A HLA-DR é denominado como: HLA-DRB1\*0301. O asterisco indica que a evidência desta proteína se fez através de métodos de biologia molecular (SANKARKUMAR et al., 2003b).

O polimorfismo das moléculas HLA é extremo e está relacionado com os diferentes peptídeos antigênicos que possam vir a encontrar. A estrutura das moléculas de classe II é composta por duas cadeias polipeptídicas de tamanhos diferentes, denominadas cadeias alfa e beta. Cada uma destas cadeias contém as seguintes regiões:

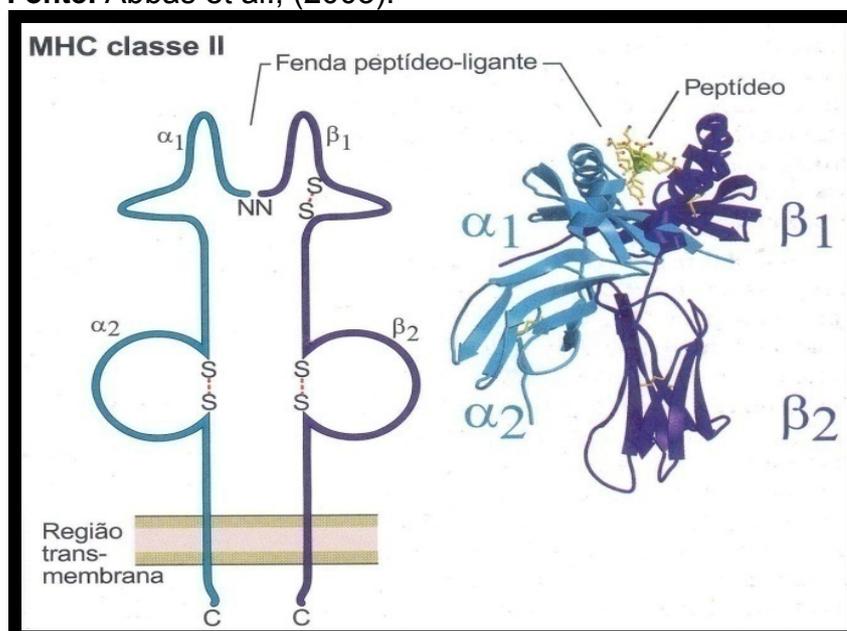
- Região citoplasmática- contém elementos que se ligam ao citoesqueleto da célula.
- Região transmembrana – contém aminoácidos hidrofóbicos através dos quais a molécula é ancorada na membrana celular.
- Domínio alfa-2 – Região altamente preservada, invariável nesta cadeia protéica.
- Domínio beta-2 – Igualmente se constitui numa região bem preservada, invariável a qual contém o sítio de ligação para o co-receptor CD4 dos linfócitos T.

- Domínio alfa-1 – Região amino-terminal da cadeia alfa que compõe parte da fenda de ligação a peptídeos. É uma região variável.
- Domínio beta-1- Região amino-terminal da cadeia beta, variável, a qual também compõe parte da fenda de ligação aos peptídeos. Ambos os domínios alfa 1 e beta 1 constituem a fenda ou encaixe peptídeo-ligante, grande o suficiente para acomodar peptídeos antigênicos contendo de 10 a 30 resíduos. Estas regiões variáveis determinam a especificidade dos antígenos (Figura 1).

Os peptídeos antigênicos entram na fenda peptídeo-ligante e mantêm contato com as folhas das cadeias alfa 1 e beta 1. Por ser aberta em uma das extremidades, a fenda pode albergar peptídeos antigênicos mais longos. Estas moléculas influenciam o repertório da resposta imune celular através dos linfócitos T *helper*. (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Recém formada, a proteína HLA-DR possui sua fenda peptídeo ligante bloqueada por uma cadeia peptídica invariável ou gama, cujo transporte é feito em vesículas exocíticas que se fundirão com vesículas endossomais contendo os peptídeos antigênicos onde a HLA-DM removerá a CLIP (parte da cadeia invariável gama) da molécula de HLA-DR, liberando-a para associar-se ao antígeno.

**Figura 1** - Estrutura da molécula de HLA classe II.

Fonte: Abbas et al., (2003).



Após ligar-se ao peptídeo antigênico, a molécula HLA-DR forma com ele um complexo estável, sendo levada à superfície da célula de Langerhans. Caso não se associe ao peptídeo antigênico, a molécula HLA-DR vazia, apresenta-se instável e será degradada por proteases endossomais (ANDERS et al., 2011).

A ligação dos linfócitos T CD4 com a proteína HLA-DR compõe a sinapse imunológica: local de comunicação entre células apresentadoras de antígenos e os linfócitos T durante o reconhecimento do antígeno (MITTELBRUNN et al., 2011).

Para que a resposta imune ocorra, níveis de controle são obedecidos:

- Nível 1 – o peptídeo antigênico tem que estar associado à molécula de HLA-DR para que seja reconhecido pelos linfócitos.
- Nível 2 – As células T precisam apresentar receptor de superfície (TCR) que reconheça a associação peptídeo antigênico-HLA-DR a qual mediante passa a ser intensamente expressa na superfície das células de Langerhans por ação estimuladora do interferon gama.

A ativação e sensibilização dos linfócitos T pelas células de Langerhans estão assim ordenadas:

- 1- A célula de Langerhans captura o antígeno, internaliza-o, processa-o, degradando-o em peptídeos
- 2- Os peptídeos antigênicos associam-se à molécula HLA-DR em vesículas endossomais no interior do citoplasma das células de Langerhans para que sejam levados até a superfície celular.
- 3- Os peptídeos antigênicos são apresentados aos linfócitos TCD4.
- 4- Os linfócitos TCD4 reconhecem os peptídeos antigênicos ancorados na molécula HLA-DR e são co-estimulados através das moléculas CD80 e CD86 também expressas na superfície das células de Langerhans.
- 5- Moléculas acessórias (ICAM-1) estabilizam o contato das células de Langerhans aos Linfócitos T.
- 6- Sinais da superfície celular são transmitidos ao núcleo dos linfócitos T para expansão clonal destas células.
- 7- Citocinas como a interleucina-2 (IL-2) ajudam a expansão clonal dos Linfócitos T (MITTELBRUNN et al., 2011).

Diferenças morfológicas e estruturais relatam dois subtipos de células de Langerhans: tipo 1- distribuídas nas camadas suprabasais do epitélio, cuja morfologia mostra proeminentes dendritos, citoplasma eletrólucido além de numerosos grânulos de Birbeck e as tipo 2 – distribuídas ao longo da camada basal do epitélio, exibem prolongamentos citoplasmáticos pouco proeminentes, citoplasma eletrodense e escassos grânulos de Birbeck. Estas diferenças são conseqüentes à função e dinâmica imunes destas células (ROMANI; CLAUSEN; STOITZER, 2010).

Apenas em 1970 as funções das células de Langerhans tornaram-se conhecidas, delineando o modo distinto com que elas reagem aos vários estímulos antigênicos. Estão amplamente distribuídas nos tecidos epiteliais e mucosas. O número de células de Langerhans resulta não de um processo de divisão celular, mas da migração de novas células oriundas da medula óssea (LINS et al., 2003).

A expressão das moléculas HLA classes I e II, ICAM I e III, denota capacidade das células de Langerhans para apresentar antígenos e induzir uma resposta imune T dependente. Uma vez ativadas, as células de Langerhans respondem apenas às quimiocinas constitutivas, tais como: MIP3- alfa (CCL-20), leucotactin-1 (CCL15), dentre outras, cuja função é direcionar a migração destas células para os linfonodos, por meio da extensão e retração dos prolongamentos citoplasmáticos, redução na superfície das células de Langerhans de receptores para e-caderina, proteína responsável por manter as células de Langerhans em meio às células epiteliais e expressão da proteína vimentina a qual realiza a interação entre estas células e a matriz extra celular, favorecendo o seu deslocamento (GERNER, M.Y.; MESCHER, M.F. 2009).

A visualização das células de Langerhans não se faz por métodos usuais aplicados ao estudo histopatológico. A identificação de proteínas expressas na superfície destas células constitui-se em um recurso utilizado para observação das células de Langerhans e marcadores de superfície evidenciados por reação antígeno-anticorpo a qual destaca estas células das demais constituintes do epitélio. Dentre as proteínas de superfície, as relacionadas ao sistema HLA mostram-se como um marcador citoplasmático das células de Langerhans e compõem o primeiro nível de controle da resposta imune. A ausência destas proteínas demonstra inviabilidade das células apresentadoras de antígeno em mediar uma resposta imune pela sensibilização dos linfócitos T. A cadeia alfa 2 da molécula HLA-DR, por ser altamente preservada, possibilita fácil identificação pelo uso de marcadores de superfície, servindo como identificadores de risco para o desenvolvimento de algumas doenças (CASHION et al., 2010). Alterações na expressão dos alelos do

sistema HLA, interfere de modo significativo na apresentação de peptídeos antigênicos às células T, cuja ativação sofre modificações à depender do tipo de proteína HLA expressa (MADELEINE et al., 2008).

O marcador S-100 é uma proteína de superfície vinculada ao cálcio e relacionada à progressão, diferenciação e citotoxicidade do ciclo celular. Também expressa na superfície das células de Langerhans, reage bem com imunomarcadores de superfície na identificação destas células nos tecidos, ainda que congelados ou fixados em parafina. Células melanocíticas presentes na pele e células interdigitantes presentes em órgãos linfóides também expressam a proteína S100 em sua superfície (SANTOS; MELLO; SANTOS, I.B.; SANTOS, R.A., 2010).

A molécula CD-14 é um marcador de superfície expresso na maioria dos monócitos e células de Langerhans, conferindo nestas células um fenótipo de imaturidade (ROMANI et al., 2010). Os marcadores CD-80 e CD-86 são moléculas co-estimulatórias que contribuem para a ativação dos linfócitos. A ausência de expressão destas moléculas pode resultar em anergia ou, a depender do receptor ao qual se liguem nos linfócitos, levam a uma regulação negativa da resposta imune (HUSSAIN; DELOVITCH, 2005).

A molécula glicoprotéica de superfície CD1a são expressas em células precursoras das células de Langerhans. Compõe um grupo de marcadores capazes de apresentar várias formas de lipídios antigênicos aos linfócitos T. O grupo II destas proteínas: CD1d (presentes em ratos e humanos) que apresentam antígenos para células Natural Killer (DE JONG et al., 2010). As proteínas de superfície CD83 e CD40 são expressas em células de Langerhans maduras (FUTALAN et al., 2011).

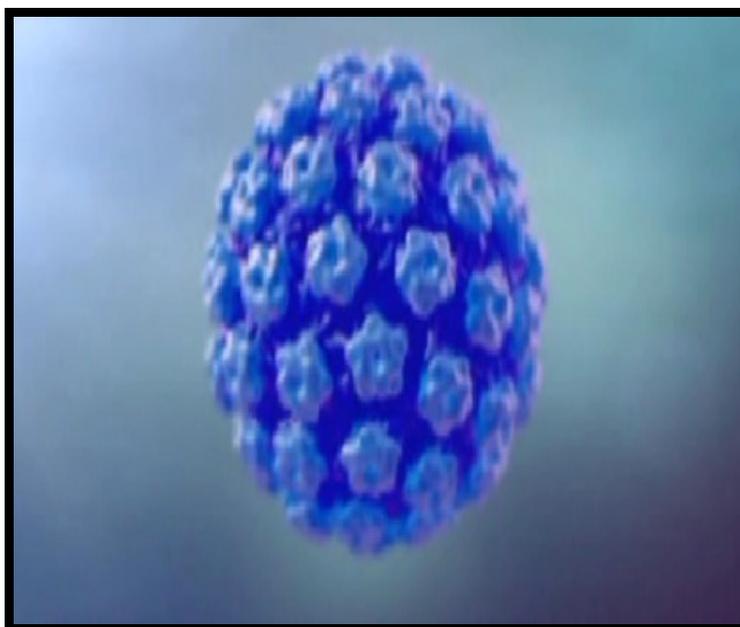
## **2.2 Papilomavírus Humano e resposta imune celular**

O HPV pertence à família Papillomaviridae (VILLIERS et al., 2004; SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008). A filogenia deste vírus é inferida com a análise comparativa dos 290 pares de base da região L1. São identificados os gêneros alfa, beta, gama e ômega, estando o gênero alfa envolvido em praticamente todos os casos de carcinoma genital. Deste, cinco espécies distintas de papilomavírus estão envolvidos na carcinogênese genital: a5, a6, a7, a9 e a11e dentro de cada espécie, comportamentos tipo-específicos de persistência e carcinogênese são observados.( GOTTSCHLING, 2009). Não possuem envelope, mostrando-se muito resistentes às condições do meio e pouco sensível ao calor. São pequenos com 52 a 55 nanômetros de diâmetro, sendo o primeiro vírus tumogênico transmitido

experimentalmente de um hospedeiro para o outro (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008). Possui uma cápsula protéica denominada capsídeo, constituída de 72 capsômeros, os quais são protuberâncias vistas na superfície dos vírus não envelopados, cuja interação entre si se faz de modo ordenado, seguindo um eixo de simetria (Figura 2). O capsídeo tem a função de proteger o genoma viral, constituído por um DNA circular de dupla hélice (Figura 3), contendo em média 8.000 pares de base, estando dividido em três regiões: uma região longa de controle (LCR - *Long Control Region*), compreendendo cerca de 10% do genoma e as regiões precoces (E-*Early*) e tardias (L-*Late*). O alinhamento destas seqüências de DNA HPV revela uma organização genética em regiões denominadas *open reading frames* – ORF, as quais codificam proteínas virais. Nesta organização genômica, as ORF estão localizadas apenas em uma das fitas do DNA viral, demonstrando que somente uma fita serve de molde para a transcrição (MONSONEGO, 2010).

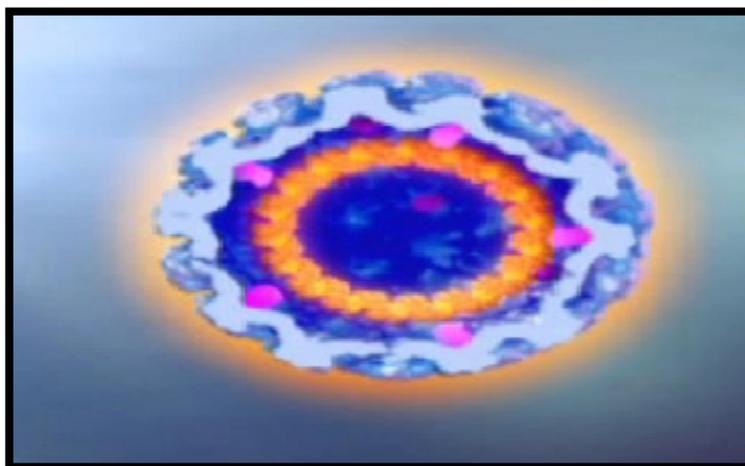
**Figura 2** - HPV constituído por capsídeo contendo 72 capsômeros

**Fonte:** Merck Sharp and Dohme – CD Interativo.  
<[www.msdonline.com.br](http://www.msdonline.com.br)>.



**Figura 3** - Capsídeo envolvendo dupla hélice de DNA circular

**Fonte:** Merck Sharp and Dohme- CD Interativo.  
<[www.msdonline.com.br](http://www.msdonline.com.br)>



Com base na homologia da sequência do DNA viral, são considerados da mesma espécie aqueles com 60-70% de identidade e do mesmo tipo, dentro de uma espécie, aqueles com 71 a 89% de identidade em sua seqüência genômica (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

Estes vírus são classificados de acordo com a espécie de hospedeiro, tropismo epitelial e doença associada. Conforme o tropismo epitelial, os HPV são classificados em tipos mucosos, cutâneos e cutâneo-mucosos. De acordo com a doença associada, são classificados em alto, médio e baixo risco oncogênico (BARRASSO; GROSS, 1999).

Baseado na homologia da seqüência de leitura aberta (ORF - *Open reading frame*) os genes virais são classificados em genes de expressão tardia e genes de expressão precoce, conforme relacionados:

Genes de expressão tardia: L 1 e L 2.

L1: proteína maior do capsídeo viral e a principal proteína estrutural do vírus. É a região mais conservada do genoma viral, daí ser considerada o antígeno grupo-específico para detecção viral através da biologia molecular. Corresponde a 80 % do conteúdo protéico viral.

L2: proteína menor do capsídeo responsável pela saída e transporte do DNA viral para o núcleo da célula. Estas proteínas estão correlacionadas mutuamente, de modo que a alteração estrutural de uma reflete em igual modificação na outra (CHEN et al., 2011).

Genes de expressão precoce: E1, E2, E4, E5, E6 e E7.

E1 – Ativa a replicação viral. Possui alta afinidade pelo DNA e em conjunto com a proteína E2 formam um complexo de extrema importância no mecanismo de replicação viral.

E2 – Além de controlar a transcrição de outros genes virais, possui atividade supressora da transcrição dos genes E6 e E7. Juntamente com o gene E1, ativa a replicação viral. E1 e E2 constituem o ponto no qual ocorre a ruptura para linearização do genoma viral o que antecede a integração deste ao genoma do hospedeiro. Parte do E2 e genes virais adjacentes: E4 e E5, são comumente deletados após esta integração (BELLANGER et al., 2010).

E4 – A sua produção está ligada a diferenciação terminal dos queratinócitos. É responsável pela maturação das partículas virais para formação dos vírions (ácido nucléico e capa protéica viral). A intrínseca relação entre a proteína E4 e as citoqueratinas, sugere que esta proteína está também relacionada com a formação da cavitação intracitoplasmática perinuclear, denominada coilócito (GAO et al., 2008).

E5 – Induz à proliferação celular e inibe a expressão de HLA classe-I na superfície da célula infectada. Tem-se atribuído o seu papel à transformação maligna celular e sua atuação se faz na fase inicial da infecção viral. O estímulo à multiplicação celular se faz pela formação de um complexo com o receptor celular para o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator estimulador de colônia (CSF). Também está envolvido com o impedimento à apoptose das células infectadas. Mediante a linearização do genoma viral e integração deste ao DNA do hospedeiro, a proteína E5 é deletada, não participando dos eventos tardios da carcinogênese HPV-induzida (MUTO et al., 2011).

E6 – Desempenha importante papel nos processos que culminam com a transformação celular neoplásica. Liga-se ao oncogene P53 reprimindo a sua atividade transcricional e promovendo a sua degradação por proteossomas. Esta degradação ocorre de modo proporcional ao poder oncogênico viral e promove impedimento ao processo de apoptose da célula hospedeira, o que garante a progênie viral. Também ativa a enzima telomerase, o que leva à imortalização celular e aumento da expressão de receptores ao fator de crescimento epidérmico nas células infectadas (LIU et al., 2009). Atualmente está implicada na inibição da resposta imune contra o HPV (HEBNER; LAIMINS, 2006).

A função da proteína p53 é promover a parada do ciclo celular mediante a presença de um dano genético, objetivando reparar este dano para posterior

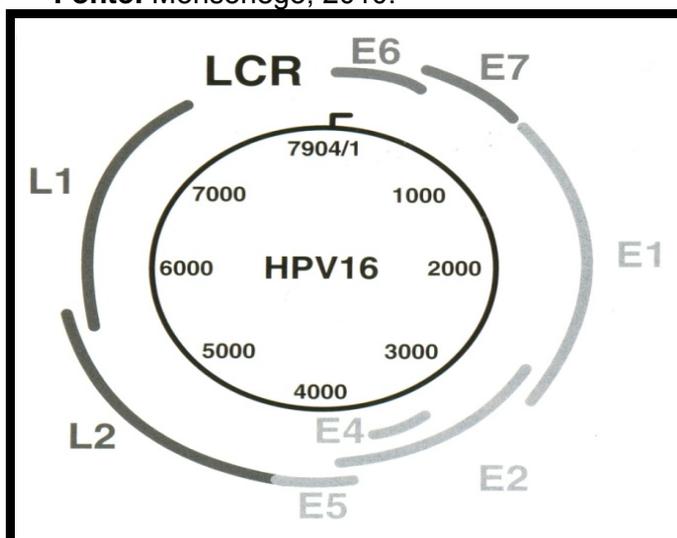
seguimento das etapas de divisão celular. Exerce um papel central na prevenção de tumores. Uma vez degradada, danos genéticos ocorridos passarão da célula mãe para as células filhas, gerando um clone de células geneticamente alteradas. A proteína p53 age sobre a trombospondina à medida que a sua função é comprometida, deflagrando o processo de neoformação vascular que dará suporte à tumorigênese (HU et al., 2010).

E7 – Interage com a proteína pRb – A proteína pRb estimula a célula para o processo de divisão. A ligação da proteína E7 à proteína pRb, supressora de tumores, promove a degradação desta através da enzima proteassomo, igualmente envolvida na degradação da p53. Quanto maior o poder oncogênico viral, maior a afinidade do gene E7 pela proteína pRB. Está relacionada com a imortalização da célula e regulação das etapas tardias de diferenciação celular, produção de vírions e pela inibição da resposta imune contra o HPV (HEBNER; LAIMINS, 2006). A perda do gene pRB é indispensável para atividade das proteínas precoces do HPV. Pode agir isoladamente e ainda assim, é capaz de imortalizar vários tipos de células humanas, contudo a maior eficiência na transformação maligna celular se faz quando as oncoproteínas E6 e E7 agem conjuntamente (BODILY et al., 2011).

Finalmente, a *Long Control Region* – região implicada no controle da replicação e transcrição dos genes virais (Figura 4).

**Figura 4** - Esquema da organização genômica do HPV16.

**Fonte:** Monsonego, 2010.



A diversificação dos tipos virais se constitui num mecanismo para evasão destes vírus à resposta imune do hospedeiro (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

Rompendo a integridade da pele e vencendo a barreira epitelial o HPV alcança a camada profunda do epitélio escamoso estratificado e liga-se ao queratinócito basal (adsorção viral) através de receptor de superfície presente nesta célula denominado integrina alfa-6, o qual reconhece proteínas da superfície viral, o que determina o tropismo deste vírus sobre o epitélio escamoso estratificado e células basais que o compõem. Este receptor de superfície encontrado no queratinócito basal, também é encontrado em células não escamosas, as quais podem igualmente ser alvo da infecção pelo HPV. Constituintes celulares essenciais para a síntese de partículas virais conferem permissividade à célula, o que também dita o tropismo viral (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

O HPV adentra na célula hospedeira através de endocitose mediada pelo provável receptor de superfície denominado integrina alfa-6 (FERRARO et al., 2011), dependente de clatrina, proteína presente no meio intracelular que participa na formação da vesícula endossomal. O desnudamento do capsídeo e a exposição do genoma viral se dão dentro do endossomo. A proteína de expressão tardia L2 é responsável pela saída e transporte do DNA viral para o núcleo da célula hospedeira. A transcrição viral é altamente regulada pelo estado de diferenciação das células do epitélio escamoso. A geração de novos vírions depende da maquinaria de replicação do DNA da célula hospedeira, motivo pelo qual genes virais induzem à mitose com proliferação das células infectadas (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

Segundo a capacidade para transformação maligna das células, o HPV é classificado como de baixo risco oncogênico e de alto risco oncogênico. Dentre os de baixo risco oncogênico, são citados como mais freqüentes: 6, 11, 42, 44, 70 e 73. Dentre os de alto risco oncogênico, são citados como mais freqüentes: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, câncer genital, observando-se envolvimento de 56, 58, 59, 66 e 68. Um grupo intermediário de HPV, ainda não tem definido o seu potencial oncogênico, são os tipos: 26, 54 e 70 (MONSONEGO, 2010).

A importância clínica da identificação dos tipos virais está num seguimento mais rigoroso dedicado às portadoras de HPV de alto risco oncogênico e por isto mais propensas ao desenvolvimento do câncer genital. Também é importante a observação da prevalência de determinados tipos virais em diferentes regiões quando se objetiva a prevenção através da administração de vacina (BRISMAR-

WENDEL, 2009). Diferentes tipos de HPV promovem diferentes efeitos citopáticos que podem culminar em lesões igualmente diferentes em seus aspectos e comportamentos (Quadros 1 e 2).

**Quadro 1** - Relação entre os tipos de papilomavirus humano e lesões epiteliais benignas

HPV 1	Verrugas plantares
HPV 2	Verrugas vulgares, verrugas filiformes, verrugas palatais
HPV 3	Verrugas planas, verrugas juvenis, formas leves de EV
HPV 4	Verrugas palmares, e plantares do tipo hiperkeratótico
HPV7	Verrugas vulgares da mão de açougueiros
HPV 9, 12, 15, 19, 23, 24, 25,47, 50	Lesões verrucosas maculares e planas da EV
HPV 10	Verrugas planas
HPV 13	Hiperplasia focal epitelial na mucosa oral
HPV 21	Lesões verrucosas planas da EV
HPV 22	Lesões maculares da EV
HPV 26, 27	Verrugas cutâneas (pacientes imunodeprimidos)
HPV 28, 49	Lesões verrucosas planas cutâneas
HPV 29, 60	Verrugas cutâneas
HPV 32	Hiperplasia epitelial focal em mucosa oral, papiloma oral
HPV 36	Ceratose actínica, lesões benignas da EV
HPV 37	Ceratoacantoma (tumor benigno de pele)
HPV 46	Lesões benignas da EV
HPV 54	Condiloma acuminado
HPV 60	Verrugas cutâneas
HPV 63	Verrugas <i>Myrmecia</i>
HPV 65	Verrugas pigmentadas
HPV 70	Papiloma vulvar
HPV 72, 73	Papilomas orais (em pacientes HIV - positivos)
HPV 75, 76,77	Verrugas genitais de pacientes com transplante renal
HPV 78	Verrugas cutâneas

**Fonte:** Adaptado pela autora.

**Quadro 2** - Relação entre os tipos de papilomavirus humano e lesões epiteliais pré malignas e malignas

HPV 5 , HPV 8	Lesões maculares da EV, carcinoma de células escamosas
HPV 6	Condiloma acuminado, NIC I – III, papilomas de laringe
HPV 11	Condilomas, NIC I – III, papilomas de laringe, conjuntivais
HPV 14 e 17, 20	Lesões verrucosas da EV, carcinoma escamoso
HPV 16	Condiloma acuminado, NIC I – III, Ca. Cervice, pênis
HPV 18	Condiloma acuminado, NIC I – III, Ca. Cérvix, pênis
HPV 30	Carcinoma escamoso de laringe, NIC I, II
HPV 31,35,45, 51, 52, 56	NIC I – III, carcinoma da cérvix
HPV 33	NIC I – III, carcinoma da cérvix
HPV 34	Doença de Bowen, NIC
HPV 38	Melanoma maligno
HPV 39	Carcinoma da cérvix, NIC I, II, papulose bowenóide
HPV 40	Neoplasia intraepitelial peniana e NIC
HPV 41	Verrugas múltiplas planas da pele, câncer escamoso
HPV 42	Papilomas genitais, condilomas planos, NIC
HPV 43,44, 53,58, 59	NIC
HPV 48	Carcinoma de células escamosas da pele
HPV 55	Papulose bowenóide
HPV 57	NIC, verrugas da pele, papilomas invertidos nasais
HPV 58 ,59	NIC
HPV 61, 62, 64,66, 67, 68, 69,71, 74	Displasias, anogenitais e neoplasmas

**Fonte:** Adaptado pela autora.

A replicação viral é estritamente dependente do ciclo celular. Estando o genoma viral não integrado ao DNA do hospedeiro sob forma episomal os genes oncogênicos E6 e E7 permanecem sob a ação supressora do gene E2 de modo que estes genes precoces apenas estimulam a proliferação das células basais levando a lesões de caráter benigno como: hiperplasia, acantose e papilomas (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

O genoma viral pode, contudo, assumir forma linear, integrando-se ao DNA do hospedeiro, o que frequentemente ocorre nas infecções por tipos virais de alto risco oncogênico. Para linearizar-se e posteriormente integrar-se ao DNA do hospedeiro, o DNA viral rompe na altura das proteínas E1 e E2 do genoma. Uma vez ocorrida a ruptura, a proteína E2 encerra sua ação supressora sobre as proteínas E6 e E7, promovendo a imortalização celular (KADAJA et al., 2009). A integração do genoma viral ao do hospedeiro se faz de modo aleatório, o que permite que ocorra próxima a genes importantes, favorecendo a rápida transformação maligna celular. Alterado o código genético, há modificações não só no fenótipo, mas também nos antígenos de superfície da célula infectada (ABBAS;

LICHTMAN; POBER, 2010). A integração ocorrida próxima ao gene c-myc, responsável por regular a expressão de, em média, 15% de todos os genes, potencializa sua ação reguladora, reduzindo a expressão das moléculas do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) na superfície das células infectadas, o que dificulta que sejam identificadas pelo sistema imune do hospedeiro (GONÇALVES; DONADI, 2004).

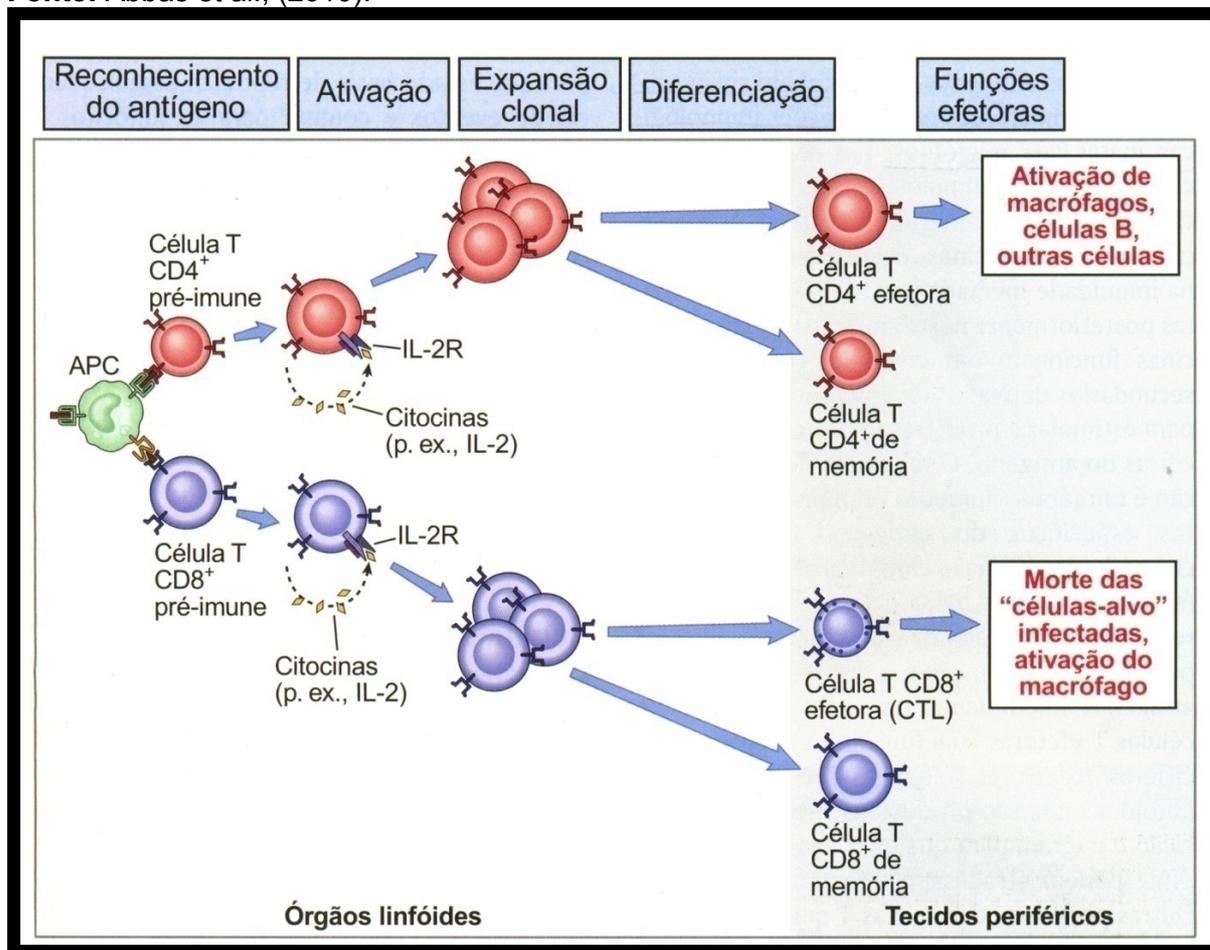
O HPV parece capaz de infectar outros tipos de célula além de queratinócitos, contudo, não há evidência de expressão do genoma viral e síntese protéica em outras células tal como ocorre em queratinócitos. As células de Langerhans, embora englobem partículas do HPV em seu interior, não mostram evidências de síntese protéica viral (STANLEY, 2009). Há controvérsias sobre o modo como as células de Langerhans são afetadas pelo HPV. Estudos mostram que os tipos virais de alto risco oncogênico inibem sinais para migração até os linfonodos e maturação das células de Langerhans, regulando negativamente a resposta imune (HEBNER; LAIMINS, 2006).

Interferência sobre a expressão das moléculas de superfície HLA-DR das células de Langerhans foram relatadas quando observado aumento desta proteína na superfície das células de Langerhans presentes em lesões condilomatosas e intraepiteliais cervicais de alto e baixo grau (GONÇALVES; DONADI, 2004).

A resposta imune adaptativa contra a presença do HPV inicia-se com a captura e processamento dos antígenos virais pelas células de Langerhans, as quais, posteriormente, migram até os órgãos linfóides próximos ao local da infecção para efetuarem a apresentação dos antígenos virais aos linfócitos TCD4 e CD8. Sensibilizados e ativados, os linfócitos migram sob influência de uma cascata de quimiocinas em direção aos queratinócitos infectados com a finalidade de destruí-los (STANLEY, 2009) - Figura 5.

**Figura 5** - Estágios da ativação dos linfócitos T.

Fonte: Abbas et al., (2010).



A ativação completa das células T incitando-as à resposta imune, ocorre por meio da ligação dos receptores TCR às moléculas HLA-DR expressas nas células de Langerhans e são sensibilizados pela expressão de moléculas co-estimulatórias denominadas CD80 e CD86. Estas moléculas devem ligar-se aos receptores das células T ao mesmo tempo em que a molécula HLA-DR liga-se ao TCR. Caso alguma destas ligações ocorra separadamente será incapaz de ativar as células T em resposta à presença do antígeno, fato imprescindível para a eficaz resposta imune celular (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Monócitos e macrófagos podem albergar vírus dentro de si. A capacidade dos vírus de penetrar nas células do sistema imune constitui-se em meio adicional de evasão à resposta imune do hospedeiro contra a infecção, objetivando perpetuar sua progênie. Os mais frequentes mecanismos utilizados pelos vírus para escape da resposta imune do hospedeiro são:

### **1-Interferência na expressão de genes da célula hospedeira:**

#### **Interação viral com moléculas do sistema HLA:**

- Redução da expressão das moléculas HLA classe I, tornando as células infectadas imperceptíveis ao sistema de vigilância imune do hospedeiro.
- Degradação das moléculas HLA classe I ainda no proteassomo.
- Remoção da molécula HLA-DM das vesículas endocíticas, impedindo que a fenda da molécula HLA-DRB1 seja liberada para ligar-se aos peptídeos antigênicos (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

#### **2- Interação com células do sistema imune:**

Albergando peptídeos virais degradados em seu interior, as células de Langerhans podem ter comprometido o seu papel na resposta imune. A proteína menor do capsídeo viral, L2 exerce papel na indução do escape à resposta imune do hospedeiro, agindo sobre as células de Langerhans de modo a impedir sua maturação funcional e fenotípica (FAHEY et al., 2009). Funções peculiares das células de Langerhans em induzir uma resposta imune específica das células T são inibidas por ação de tipos virais oncogênicos, principalmente o 16, o qual é responsável sozinho por 50% dos cânceres de colo do útero do mundo inteiro (FAHEY et al., 2009b; BOCCARDO, 2011).

#### **3- Efetuando variações antigênicas:**

A plasticidade estrutural é a capacidade do vírus em tolerar diversas substituições de aminoácidos nas suas proteínas estruturais em resposta ao ataque do hospedeiro, permanecendo, contudo, ainda infecciosos. Vírus que sofrem mutações não são neutralizados pelos anticorpos desenvolvidos como resposta à infecção, a qual poderá apresentar recidiva. Estas alterações nas proteínas virais são denominadas variações antigênicas e podem ser discretas quando ocorrem durante a replicação viral num indivíduo imunologicamente competente, ou drástica, quando resultante da co-infecção em um hospedeiro de dois tipos virais, resultando num vírus híbrido que pode, temporariamente, escapar das defesas imunológicas (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

#### **4- Mutações entre vírus - Quasispecies:**

Denomina-se quasispécies um grupo de variantes virais geneticamente diversificados, que surgem de mutações decorrentes da quebra da cadeia genética pela enzima polimerase durante a replicação viral, tanto em vírus RNA quanto em vírus DNA, o que pode produzir erros, gerando mutantes durante a infecção. Tal fato é mais freqüente em vírus RNA que DNA. Contudo, as mutações têm um papel importante na patogênese de qualquer vírus, pois originam geração viral mais capacitada ao escape da resposta imune do hospedeiro, resistindo à degradação por proteases nos proteossomas das células fagocíticas. O potencial patogênico do vírus mutado é um determinante importante na doença por eles induzida (SANTOS; VILLELA; WIGG, 2008).

As alterações nos mecanismos usados pelas células de Langerhans para apresentação antigênica resultam na não ativação e inibição da ação dos linfócitos T CD4 e CD8, redução de citocinas imuno-moduladoras por eles liberadas e na ausência de memória imune. A via citotóxica mostra-se como importante mecanismo para o controle e clearance viral, inviabilizando a progressão das lesões intraepiteliais (STANLEY, 2009).

Os mecanismos de escape do vírus ao reconhecimento imune levam à infecções persistentes, acompanhadas freqüentemente por elevada carga viral, o que promove a exaustão e déficit da função efetora das células TCD8 e liberação de IL-10 (interleucina 10), citocina pelas células T regulatórias, deflagrando uma falência imune (BOLPETTI et al., 2010).

A ausência de viremia, de lise celular com liberação de conteúdo da célula capaz de provocar a exposição do vírus ao sistema imune, somados aos demais mecanismos de evasão do HPV à resposta imune são fatores que favorecem uma infecção viral imunologicamente ignorada (BOCCARDO, 2011).

O diagnóstico da infecção pelo HPV é feito clinicamente, por meio da visualizações de lesões de aspecto papilar, únicas ou múltiplas, comumente descritas como lesões tipo couve-flor ou verrugas (PASSOS, 2002). Laboratorialmente, o diagnóstico das lesões clínicas e subclínicas é feito através do exame citopatológico e histopatológico, onde alterações características da infecção viral são observadas nos queratinócitos os quais apresentam cavitação citoplasmática perinuclear denominada coilócito, juntamente com núcleo hipercromático, aumentado de volume e levemente irregular em seu contorno,

resultantes do efeito citopático do vírus (DEMAY, 2005). As técnicas de biologia molecular identificam a presença de determinada sequência genômica do HPV na célula hospedeira ainda que não haja expressão da infecção em forma de lesão clínica ou subclínica, quando é chamada latente. Dentre as mais utilizadas estão a captura híbrida, a PCR e RNA-mensageiro. A captura híbrida (CH) possibilita a identificação do grupo viral (alto ou baixo risco oncogênico) e da carga viral (número de cópias virais por célula). O papel dos vírus de alto risco levou ao aprimoramento da técnica (CH-2) voltada unicamente para identificação de treze vírus pertencentes ao grupo de alto risco oncogênico (DUFRESNE et al., 2011). A captura híbrida, contudo, não identifica o genótipo viral. A PCR permite a identificação de, em média, 36 tipos de HPV. A PCR em tempo real identifica não só o genótipo viral, mas a carga viral. A alta sensibilidade possibilita a contaminação com nucleotídeos não virais, o que requer testes de controle de qualidade que atestam a quantidade suficiente de nucleotídeos e a presença de nucleotídeos oriundos de DNA humano (BARTLETT; STIRLING; 2003).

O RNA-mensageiro é aplicado como diagnóstico e relaciona-se ao prognóstico das lesões HPV induzidas, visto que a produção de RNA mensageiro acontece quando o genoma viral está inserido ao genoma do hospedeiro e esta ocorrência é freqüente nas infecções que levam a lesões intraepiteliais de alto grau onde a progressão ao câncer é maior (RATMAM, 2011).

### **2.3 Carcinogênese Cervical e Sistema Imune**

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres com aproximadamente 500 casos novos por ano em todo mundo. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos e é responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano (BRASIL, 2009).

A história natural da doença é um longo processo que revela a tolerância imunológica ao HPV em um dado número de indivíduos. O câncer cervical tem origem infecciosa e leva, em média, 15 anos entre a infecção pelo HPV e as diferentes lesões intraepiteliais precursoras, curáveis em quase toda totalidade dos casos (BRASIL, 2011).

O papel do HPV no processo da carcinogênese cervical relaciona-se à capacidade de alguns destes vírus, em imortalizar queratinócitos, bloquear a transcrição de genes supressores de tumor e interferir no ciclo celular. Moléculas

envolvidas na preparação do DNA para a divisão celular sofrem influência da infecção pelo HPV, que promove mutações e falhas no genoma do hospedeiro, cujo acúmulo levará à progressão da carcinogênese (MONSONEGO, 2010).

Além dos tipos virais envolvidos nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix, destaca-se o aspecto relevante do perfil imune do hospedeiro intrinsecamente relacionado à co-fatores como: status hormonal, outras infecções sexualmente transmissíveis associadas, idade, constituição genética, estado nutricional e fatores bio-comportamentais do hospedeiro<sup>43</sup>. Dentre os fatores biocomportamentais, o hábito de fumar, em especial, altera a função das células do sistema imune. A nicotina promove a liberação de citocinas por macrófagos como: fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas 1 e 8 (IL1e IL8) que levam a um aumento do número de leucócitos através da estimulação da medula óssea. Embora quantitativamente haja um incremento nas células do sistema imune, qualitativamente os leucócitos mostram-se deficientes, exibindo reduzida capacidade migratória e baixa reação à quimiotaxia. A nicotina inibe a expressão das proteínas de superfície pertencentes ao sistema de antígenos de histocompatibilidade humana (HLA) classes I e II, impossibilitando o reconhecimento de antígenos pelo sistema imune e impossibilitando que células tumorais sejam detectadas pela vigilância imune (GIUSTI, 2007).

A idade faz variar a prevalência da infecção pelo HPV, passando de 30% entre 15-25 anos, para 10% após os 30 anos. A diferente prevalência está relacionada ao status hormonal e este ao status imune (KWAK; YEMELYANOVA; RODEN, 2011).

Esteróides sexuais agem sobre receptores nucleares presentes nas células do sistema imune, promovendo variações no desempenho destas células conforme a idade do indivíduo. A senescência imune somada ao déficit hormonal pós-menopausa, estabelece um estado de imunodeficiência nestas mulheres (BUTTS et al., 2011).

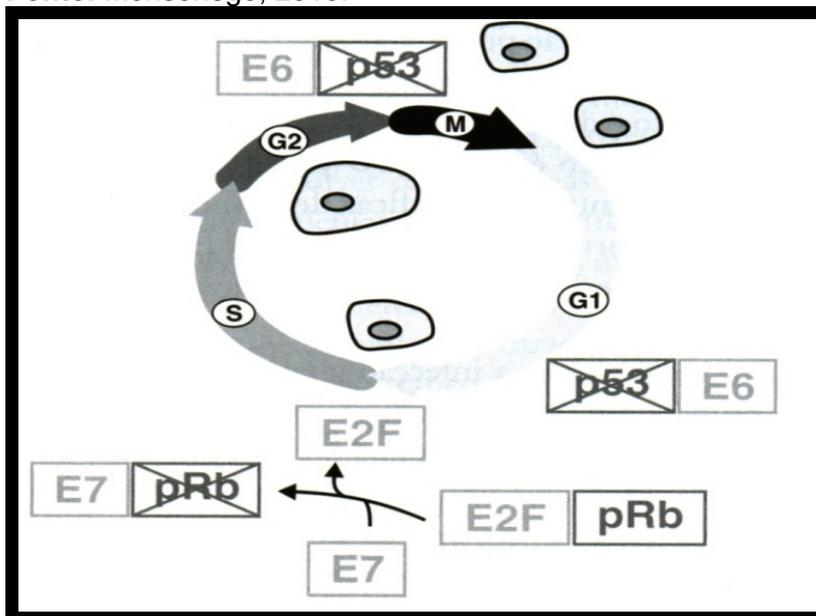
As proteínas E6 e E7 dos vírus de alto risco oncogênico, superexpressas após ruptura do genoma do HPV nas proteínas reguladoras desta expressão, E1 e E2, ligam-se, respectivamente, às proteínas celulares p53 e pRb formando complexos de alta afinidade (Figura 6). A ligação da proteína E7 com o oncogene pRb, induz à transcrição de genes importantes no controle da divisão celular, atuando nas fases G1 e S, promovendo a progressão do ciclo celular. Ambas as proteínas virais E6 e E7 modulam a ação de citocinas que inibem a ação de células imunes na resposta contra o HPV, favorecendo a progressão da carcinogênese cervical (HEBNER;

LAIMINS, 2006).

A proteína viral E5 está relacionada a interferências na produção de citocinas ativamente participantes da resposta imune adaptativa e inata. O beta-interferon é produzido em resposta à infecção por HPV. Promove aumento na expressão das proteínas de superfície do sistema HLA classes I e II para atuação específica dos linfócitos T em resposta à presença viral (MUTO et al., 2011).

**Figura 6** - Carcinogênese induzida pelo HPV.

Fonte: Monsonego, 2010.



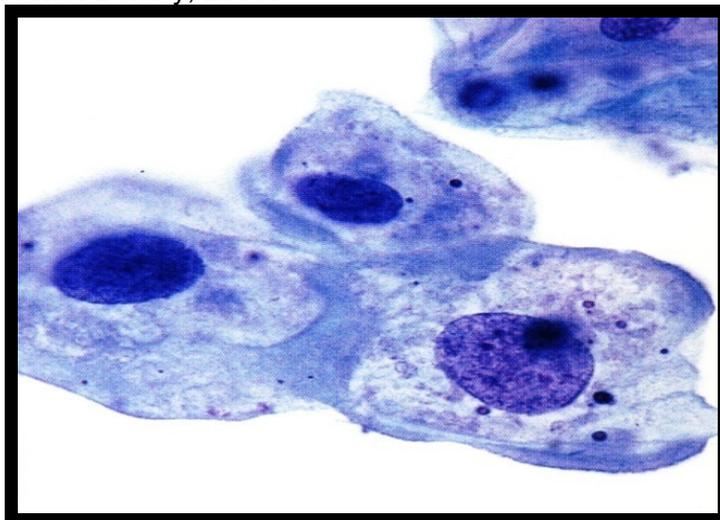
As células que sofem transformação maligna passam a expressar na superfície, antígenos que as identificam pelo sistema imune como estranhas. Estes antígenos tumorais são geralmente resultantes de mutações de proteínas celulares normais ou ainda genes supressores tumorais envolvidos na transformação maligna celular (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2010).

As alterações fenotípicas das células caracterizam as lesões precursoras do câncer de colo uterino, classificadas em baixo grau e alto grau, segundo preconiza a Sociedade Brasileira de Citopatologia e diretrizes brasileiras para o rasreamento do câncer do colo do útero (BRASIL, 2011). Histopatologicamente, as lesões intraepiteliais de baixo grau correspondem às denominadas neoplasias intraepiteliais grau I, efeito citopático pelo HPV e as lesões intraepiteliais de alto grau correspondem às neoplasias intraepiteliais graus II e III. A maioria destas lesões precursoras é eliminada pelo sistema imunológico. O desenvolvimento de lesões pré-cancerosas do colo uterino reflete um déficit imunológico frente à presença do HPV (MONSONEGO, 2010).

As lesões de baixo grau são caracterizadas por serem estritamente intraepiteliais, expressando atipias celulares e desorganização estrutural do epitélio restritas a porção inferior do mesmo. Nas camadas mais superficiais do epitélio de revestimento cervical, podem ser encontradas células exibindo cavitação intracitoplasmática perinuclear denominada coilócito, obrigatoriamente acompanhada de atipias nucleares em células escamosas maduras (Figuras 7 e 8). Estas lesões apresentam em torno de 60% de regressão espontânea, 30% de persistência e 10% de progressão para lesões mais graves (DEMAY, 2005).

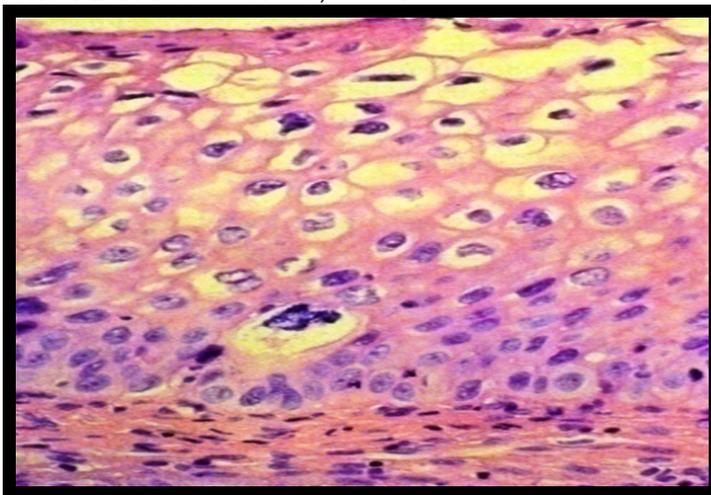
**Figura 7** - Amostra citopatológica contendo células escamosas características de lesão intraepitelial de baixo grau (NICI – HPV). Amostra cervico-vaginal. Microscopia óptica. Aumento de 400x

**Fonte:** Demay, 2005.



**Figura 8** - Secção histológica da cérvix uterina, contendo neoplasia intraepitelial grau I: desorganização estrutural e atipias nucleares na camada inferior do epitélio. Nas células da superfície, cavitações citoplasmáticas perinucleares (coilocitos) e atipias nucleares compatíveis para HPV. Avaliação histopatológica. Microscopia óptica. Aumento de 100x

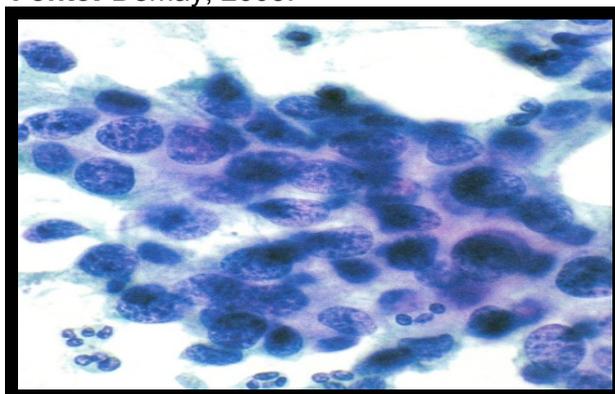
**Fonte:** Barrasso e Gross, 1999.



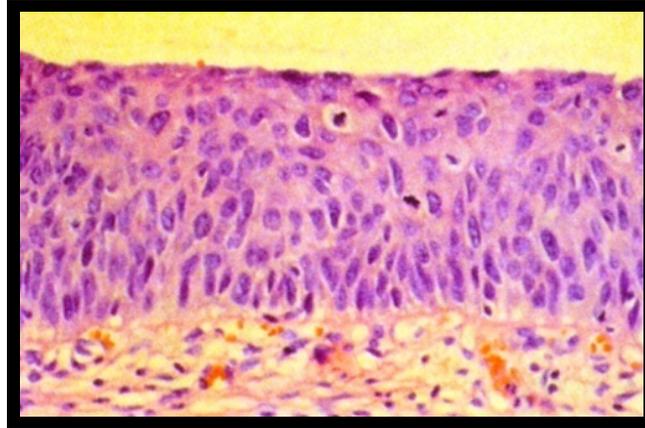
As lesões de alto grau são igualmente intraepiteliais, contudo exibem atipias celulares mais pronunciadas e a desorganização estrutural do epitélio abrange desde a metade até a total espessura do mesmo (Figuras 9 e 10). Há perda progressiva da diferenciação e polaridade celular (DEMAY, 2005). A ocorrência de regressão espontânea destas lesões restringe-se a 12% (MONSONEGO, 2010)

**Figura 9** - Amostra citopatológica cervico-vaginal contendo células escamosas imaturas com alterações nucleares e citoplasmáticas marcantes, dispostas em pseudo-sincício e classificadas como oriundas de uma lesão intraepitelial de alto grau. Microscopia óptica. Aumento de 400x

**Fonte:** Demay, 2005.



**Figura 10** - Secção histológica da cérvix uterina, mostrando desorganização estrutural e atipias celulares em toda espessura do epitélio, mantendo-se íntegra a membrana basal o que corresponde à neoplasia intraepitelial cervical grau III. Microscopia óptica. Aumento de 100x  
**Fonte:** Barrasso e Gross, 1999.



O sistema imune adaptativo provê a defesa contra tumores reagindo contra a presença de células não infecciosas, percebidas como estranhas pela expressão de proteínas em sua superfície identificadas como antígenos tumorais. Em casos de tumores causados por vírus oncogênicos, os antígenos tumorais são constituídos de peptídeos antigênicos virais (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

A frequência de tumores em imunodeprimidos ressaltando-se os infectados pelo HIV e transplantados, evidencia a importância do papel do sistema imune na carcinogênese (SERRAINO; PISELLI, 2009).

As células de Langerhans capturam antígenos tumorais expressos na superfície das células atípicas, apresentando-os aos linfócitos T, através das moléculas do sistema HLA classe II. O principal mecanismo aplicado pelo sistema imune para erradicação tumoral é a eliminação das células tumorais através de linfócitos T citotóxicos específicos para os antígenos tumorais, os quais são capazes de matar células tumorais, que expressam antígenos em sua superfície, resultantes de mutações. Este tem sido um meio estratégico para estimular a imunidade anti-tumor, um recurso promissor por não comprometer células normais dos tecidos como ocorre com a radioterapia e quimioterapia aplicadas ao câncer avançado (OHTANI et al., 2009).

A superação do crescimento tumoral em relação à resposta imune pode ocorrer em decorrência aos antígenos tumorais serem fracamente imunogênicos,

pois diferem pouco dos antígenos próprios da célula normal. As células tumorais desviam a ação do sistema imune através das células dendríticas mielóides as quais secretam citocinas supressoras da inflamação e estimulam linfócitos T regulatórios a inibir a geração de linfócitos T efetores (PALUCKA et al., 2011). A habilidade de formar células de Langerhans se mantém na presença das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, graças à produção pelos queratinócitos e citocinas que exercem ação sobre seus precursores da medula óssea. A citocina GM-CSF (fator estimulador de granulócitos e mastócitos), igualmente produzidas pelos queratinócitos, age como estímulo quimioatrativo favorecendo a migração das células de Langerhans, prolongando sua sobrevivência e aumentando a sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos através das proteínas de superfície HLA II (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2010).

Infecção persistente por HPV com carga viral elevada estão relacionados à secreção de citocina da família da interleucina-10 (IL-10) pelos queratinócitos transformados, por linfócitos T regulatórios e pelas próprias células de Langerhans. Estas citocinas suprimem a resposta imune, interferindo sobre a opsonização de antígenos, captação antigênica pelas células de Langerhans, objetivando limitar os danos teciduais causados pelo HPV (OUYANG et al., 2011).

Entretanto toda eficiente resposta imune contra vírus deriva da expressão das moléculas HLA nas células de Langerhans. A interação entre antígeno e proteínas HLA e destas com os linfócitos T, incita uma resposta contra as células transformadas pela infecção viral. Contudo, a forte expressão das proteínas E6 e E7 do HPV promove deficiente apresentação dos epitópos virais pela molécula HLA, durante o longo período até o aparecimento do câncer. O papel destas moléculas em determinar uma resposta imune adaptativa, sugere-nos que as lesões pré-cancerosas e cancerosas resultam de uma apresentação de antígeno deficiente por interferência do vírus na expressão das moléculas HLA classes I e II (GONÇALVES; DONADI, 2004).

As diferentes evoluções observadas nas lesões induzidas pelo HPV, sugerem-nos a existência de fatores inerentes ao portador que bloqueiam ou dificultam a ação transformante deste vírus. Sendo a resposta imune um relevante fator regulador da infecção por HPV, a observação dos mecanismos de combate à presença deste vírus em confronto com a capacidade deste em evadir-se da resposta imune hospedeira, mostra-nos os possíveis alvos da falha imune contra as lesões HPV induzidas.

Estando a proteína de superfície HLA-DRB1 apontada como fator

imunogenético de risco ao desenvolvimento do câncer cervical, a observação da possível interferência dos tipos de HPV sobre a expressão desta proteína durante a apresentação antigênica tornou-se a motivação maior deste estudo.

# OBJETIVOS

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

**Determinar a expressão da proteína HLA-DRB1 em células de Langerhans nas portadoras de lesões intraepiteliais cervicais e tipos de HPV identificados.**

#### 3.2 Objetivos Específicos

Comparar a expressão da proteína HLA-DRB1 em células de Langerhans:

- Entre portadoras de lesão intraepitelial de alto grau e portadoras de lesão intraepitelial de baixo grau;
- Entre pacientes portadoras de HPV de alto risco oncogênico e aquelas portadoras de HPV de baixo risco oncogênico;

# METODOLOGIA

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de Estudo

Estudo observacional tipo caso-controle, onde o grupo caso está representado por secções teciduais obtidas de portadoras de lesão intraepitelial de alto grau (neoplasia intraepitelial graus II e III) e o grupo controle representado por secções teciduais obtidas de portadoras de lesão intraepitelial de baixo grau (neoplasia intraepitelial grau I e ou efeito citopático pelo HPV).

### 4.2 Local da Pesquisa

- **Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer da Paraíba (CEDC):** Neste local realizou-se a seleção de pacientes, coleta de sangue para pesquisa para HIV, exames de colposcopia, biópsia, cirurgia de alta frequência bem como a avaliação histopatológica e análise morfométrica.
- **Laboratório de Dermatologia Tropical - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP:** onde foi realizada a imunohistoquímica.
- **Setor de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal Rural de Pernambuco:** onde foi realizada a PCR para HPV.

O Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer (CEDC) é uma instituição pública estadual de referência no diagnóstico do câncer de mama e colo uterino na Paraíba. Vinculado à secretaria de saúde do estado, é composto dos setores de citopatologia, histopatologia, patologia cervical e colposcopia, ultrassonografia, realizando consultas em mastologia, oncologia e procedimentos de conização com alça diatérmica, punção mamária e de tireóide e citologia endometrial. Através dos municípios e unidades de saúde da família, para ele são triados materiais para análise e pacientes dos 223 municípios do estado. O setor de citopatologia avalia uma média de 8.000 exames citopatológicos por mês. As portadoras de resultados anormais em que há indicação da colposcopia, são convocadas, por meio de carta, a retornar ao serviço e dar prosseguimento as investigações diagnósticas.

### **4.3 População de Estudo**

Pacientes apresentando lesões intraepiteliais cervicais em exame citopatológico, com achados anormais na colposcopia e histopatologia, cujas secções histológicas obtidas da cérvix foram preservadas em parafina e utilizadas neste estudo.

### **4.4 Critérios de Inclusão**

- I. Ter procurado o Centro Diagnóstico do Câncer do Estado da Paraíba para realização de exames preventivos;
- II. Apresentar achados anormais correlatos nos exames citopatológico, colposcópico e histopatológico;
- III. Submeter-se a coleta de material cervico-vaginal para PCR – HPV;
- IV. Apresentar sorologia anti-HIV não reagente.

### **4.5 Critérios de Exclusão**

- I. Apresentar doenças auto-imunes;
- II. Ser infectada pelo HIV;
- III. Estar grávida;
- IV. Fazer uso de supressores ou estimuladores imunológicos;
- V. Apresentar achados colposcópicos sugestivos de neoplasia cervical invasiva.
- VI. Pacientes cujos fragmentos teciduais incluídos em parafina foram insuficientes para a efetuação de três cortes histológicos: um destinado ao diagnóstico histopatológico e os dois destinados à imuno-histoquímica.

## 4.6 Tamanho Amostral

Desenho de estudo: CASO-CONTROLE

Condições impostas para o cálculo do tamanho de amostra:

Condições a priori: Proporção de um caso por um controle	Valor
Testa valor do Odds Ratio sob a hipótese nula	$H_0: OR_0 = 1$
Dois dos seguintes parâmetros devem ser conhecidos:	
Proporção de expostos entre os casos:	$P_1^* = 46,15\%$
Proporção de expostos entre os controles:	$P_2^* = 30\%$
Antecipado odds ratio (razão de chances)	$OR = 2$
Nível de significância ( $100\alpha\%$ )	$\alpha = 5\%$ ou $1\%$
Poder do teste ( $1 - \beta$ )	$80\%$ ,
Hipótese alternativa (para teste bicaudal)	$H_a: OR_a \neq OR_0$

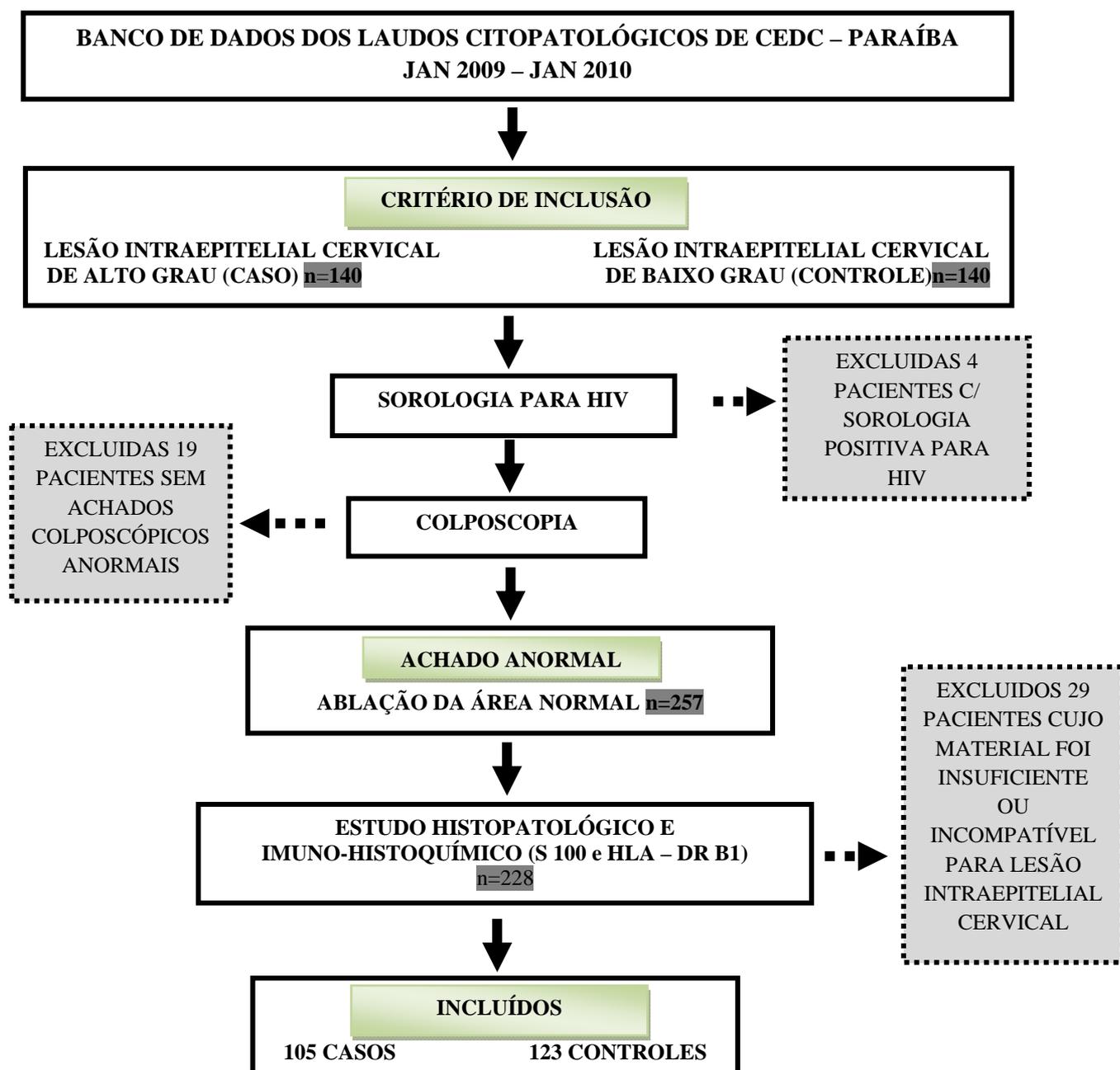
Fonte: Huley, 2003.

Fórmula para o cálculo do tamanho de amostra mínimo:

$$n = \left\{ z_{1-\alpha/2} \sqrt{2P_2^*(1-P_2^*)} + z_{1-\beta} \sqrt{P_1^*(1-P_1^*) + P_2^*(1-P_2^*)} \right\}^2 / (P_1^* - P_2^*)^2$$

O tamanho amostral foi estimado em 280 fragmentos teciduais obtidos da cérvix uterina, sendo 131 pertencentes ao grupo caso (confirmados histopatologicamente como contendo uma lesão intraepitelial de alto grau) e 149 pertencentes ao grupo controle (confirmados histopatologicamente como contendo uma lesão intraepitelial de baixo grau).

## DIAGRAMA DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS



O tamanho amostral analisado igualou-se a 228 espécimes, sendo 105 pertencentes ao grupo caso e 123 ao grupo controle.

## 4.7 Definição das Variáveis

### 4.7.1 Definição das variáveis

Numa primeira etapa, obteve-se:

#### Variável dependente:

- Lesões intraepiteliais cervicais, categorizadas como de alto grau (neoplasia intraepitelial cervical grau II ou III- Carcinoma *in situ*).
- Lesões intraepiteliais cervicais categorizadas como de baixo grau (HPV – neoplasia intraepitelial cervical, grau I).

#### Variáveis independentes:

- Expressão da proteína HLA-DRB1 nas células de Langerhans.
- Hábito de fumar
- Faixa etária
- Tipo de HPV

Numa segunda etapa, obteve-se:

#### Variável dependente:

- Expressão da proteína HLA-DRB1 pelas células de Langerhans.

#### Variável independente:

- Tipo de HPV.

## 4.7.2 Categorização das Variáveis

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Lesão intraepitelial de baixo grau	Alterações em células maduras exibindo núcleos atípicos com presença ou não de cavitação citoplasmática perinuclear: coilócito	NIC I / HPV
Lesão intraepitelial de alto grau	Alterações em células imaturas exibindo núcleos marcadamente atípicos com escasso citoplasma	NICII / NICIII
IDADE	Anos de vida completos	
TABAGISMO		Não-fumante Fumante
Expressão da proteína S100	Presença das células de Langerhans por mm <sup>2</sup> de área tecidual.	Presente Ausente
Expressão da proteína HLA-DRB1	Ativação das células de Langerhans em resposta ao antígeno por mm <sup>2</sup> de área tecidual.	Presente Ausente
Genótipo do HPV	HPV implicado em um maior risco para transformação maligna celular	Alto risco Baixo risco

## 4.8 Métodos de Coleta e Processamento de Dados



- Recebido para colposcopia pacientes com exame citopatológico constando lesão intraepitelial cervical de alto ou baixo grau;

- Seleccionadas as pacientes conforme critérios de inclusão e exclusão submeteram-se à entrevista em que procedeu-se a leitura de um questionário padrão, compondo a parte inicial do laudo colposcópico, bem como a apresentação e detalhamento de termo de consentimento o qual mediante aprovação, foi assinado pela paciente;
- Coletou-se sangue para sorologia anti- HIV;
- Procedeu-se ao exame colposcópico e diante dos achados anormais efetuou-se a coleta de material para PCR aplicada à pesquisa de HPV, por meio de escovação da ectocérvice, endocérvice e paredes vaginais com posterior inserção da escova utilizada em tubo tipo *Eppendorf* contendo meio fixador (UCM- *Universal collection médium*) com substância desnaturante, a qual facilita a desnaturação do DNA celular.

#### Exame colposcópico

- Utilizou-se colposcópio binocular DF Vasconcelos. A técnica do exame obedeceu a sequência preconizada pela Associação Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (MARTINS; RIBALTA, 2005). Foram aplicados ao epitélio da cérvice e vagina: ácido acético a 3%, sucedido da solução de lugol para teste de Schiller. Mediante a evidência de achado colposcópico anormal, procedeu-se à coleta de material para PCR e retirada de fragmento tecidual correspondente ao achado anormal observado.

#### Biópsia da lesão cervical

- Para achado colposcópico anormal totalmente estudado, com laudo citopatológico prévio de lesão de baixo grau, utilizou-se para biópsia a pinça de Gaylor-Medina, de 3 a 5mm de diâmetro. Os achados anormais não estudados em sua total extensão por adentrarem à endocérvice e/ou que estavam respaldados por exame citopatológico prévio constando lesão de alto grau, foram retirados com alça diatérmica, abrangendo canal endocervical. Os fragmentos teciduais foram imersos em formol a 10% tamponado e

encaminhados para exame histopatológico.

Embora as diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero (2011) estabeleça conduta expectante para portadoras de lesão de baixo grau, o não seguimento desta conduta nesta pesquisa, se deu pelo favorecimento da paciente com a realização da biópsia, estimulando a imunidade local, reduzindo a carga viral (BARRASSO, 1999), não trazendo danos a sua saúde atual e futura, nem sobrecarga ao serviço.

### Conização

- Realizada usando-se eletrodos em alça, de numeração diversa, escolhido após estudo topográfico do achado colposcópico anormal ou laudo citopatológico prévio de lesão de alto grau. Diante de achados anormais não estudados em sua total extensão por adentrarem ao canal endocervical, ainda que respaldados por exame citopatológico constando lesão de baixo grau, foi realizada conização com alça diatérmica para retirada da área epitelial anormal. Achados colposcópicos sugestivos da presença de neoplasia cervical invasora contra-indicaram a realização da ablação com alça diatérmica (MARTINS; RIBALTA, 2005), motivo que excluía a paciente da pesquisa. A conização é um procedimento ambulatorial onde se efetua a anestesia local nos quatro quadrantes do colo uterino utilizando-se tubo de xilocaína acoplado à carpule.
- Fez-se uso de espéculo específico onde se acopla o aspirador de vapores surgidos durante o procedimento.
- 

### Processamento tecidual e Avaliação histopatológica

- Os fragmentos teciduais retirados da cérvix foram fixados em formol a 10%, tamponado, e encaminhados para avaliação histopatológica.
- Os cortes histológicos foram efetuados em micrótomo, medindo de 4-5 micrômetros. De cada paciente foram obtidos três cortes: um

destinado ao diagnóstico histopatológico e os outros reservados para exame imuno-histoquímico.

- As secções teciduais destinadas ao exame histopatológico foram postas em lâminas de vidro identificadas e submetidas à coloração com hematoxilina-eosina (HE), com posterior montagem em lamínula.
- As secções histológicas destinadas à imuno-histoquímica foram postas em lâminas de vidro silanizadas, identificadas e submetidas a aplicação dos marcadores S100 e HLA-DRB1.

#### Imunomarcadores

- Os imunomarcadores foram submetidos a controle de qualidade prévio à aplicação nos cortes teciduais destinados ao estudo. O controle para o imunomarcador S100 foi realizado com a aplicação deste sobre corte histológico oriundo de nevus. Para o imunomarcador HLA-DRB1, o controle foi realizado aplicado-o sobre cortes histológicos oriundos de tonsila.

#### Morfometria

- A expressão das proteínas de superfície S100 e HLA-DRB1 nas células de Langerhans foi quantificada por método morfométrico utilizando programa de software: Image J para mensuração da área do corte histológico, a qual foi relacionada ao número de células de Langerhans imunomarcadas, presentes na área tecidual.

### 4.9 Qualidades dos Instrumentos de Medidas

Os critérios para a classificação das anormalidades citopatológicas seguiram a nomenclatura preconizada pela Sociedade Brasileira de Citopatologia e diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero (BRASIL, 2011).

Os achados colposcópicos foram classificados segundo nomenclatura internacional preconizada pela Associação Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (MARTINS; RIBALTA, 2005).

O método utilizado para retirada das lesões, conforme o grau de

comprometimento epitelial seguiu as normas estabelecidas pelas diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero (BRASIL, 2011).

A identificação do HPV foi realizada pela técnica de PCR, seguindo protocolo estabelecido por Bartlett e Stirling (BARTLETT; STIRLING, 2003). Os tipos de HPV identificados foram categorizados em: baixo risco oncogênico e alto risco oncogênico. Foram usados em ambos os grupos pesquisados, os *primers* consensus MY09 e MY11 bem como GP05+ e GP06+.

As técnicas de imunomarcção seguem o procedimento padrão de histotecnologia, estabelecidas pelo manual de imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999).

A fundamentação teórica para a utilização da morfometria foi obtida do textos de Baak e Oort, 1993.

#### 4.9.1 Técnicas utilizadas

##### I – Método Histopatológico:

Os fragmentos teciduais oriundos da cérvix foram fixados em formalina a 10% tamponada e encaminhados ao setor de histopatologia do Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer da Paraíba. De acordo com a técnica padronizada pelo serviço, o material foi desidratado em álcool etílico, feito o seu clareamento pelo xilol e impregnação em parafina. Os blocos de parafina contendo as secções teciduais foram submetidos a um primeiro corte em micrótomo rotativo manual, cuja espessura foi de 4µm, colocados em lâmina e corados com hematoxilina de Harris e eosina. As lâminas assim preparadas e identificadas foram, a seguir, analisadas em microscópio óptico binocular por médico patologista para emissão diagnóstica e classificação das alterações epiteliais observadas.

Foram triados para a pesquisa as secções teciduais classificadas como lesão de baixo grau (neoplasia intraepitelial grau I e, ou efeito citopático pelo HPV) e lesão de alto grau (neoplasia intraepitelial grau II ou III- carcinoma in situ da cérvix).

Conceitua-se como lesão de baixo grau a presença de células escamosas maduras exibindo núcleos atípicos, discarióticos, confinados ao terço inferior do epitélio de revestimento cervical. Também estão incluídas nesta categoria as atipias celulares resultantes do efeito citopático pelo HPV, quais sejam a presença de células maduras do epitélio de revestimento cervical, exibindo núcleos discarióticos, aliados a cavitação intracitoplasmática perinuclear, denominada coilócito. Esta

entidade mostra alta probabilidade de regressão espontânea, sendo freqüentemente eliminadas pelo sistema imune podendo ser acompanhadas sem a necessária opção pelo tratamento (DEMAY, 2005).

Conceitua-se como lesão intraepitelial de alto grau a presença, em dois terços ou mais da espessura do epitélio de revestimento cervical, de células escamosas imaturas, exibindo núcleos atípicos, discarióticos, distribuídas desordenadamente, desestruturando a arquitetura epitelial e polaridade celular, mantendo, contudo, a integridade da membrana basal, não sendo, portanto infiltrantes mais apresentando grande probabilidade de progressão ao câncer invasivo justificando a necessidade de tratamento (DEMAY, 2005).

#### II- Imuno-histoquímica:

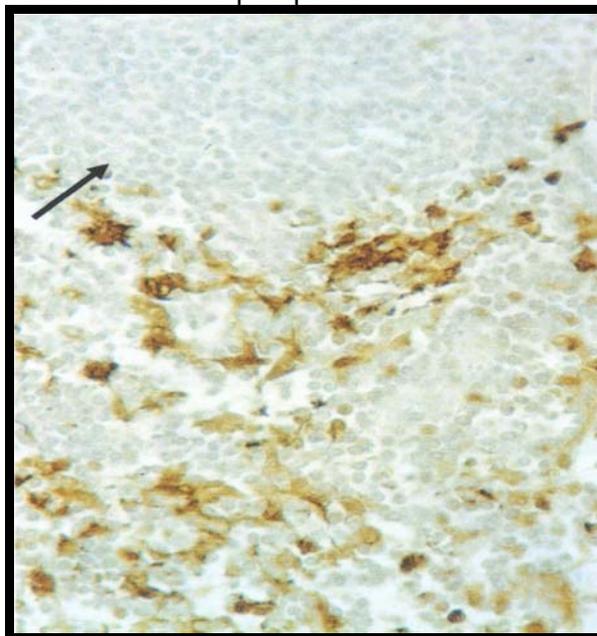
O restante do material em bloco de parafina foi encaminhado para processamentos aplicados à imuno-histoquímica.

Cada bloco foi submetido a dois cortes, um destinado à aplicação do marcador de superfície S100 e outro à aplicação do marcador HLA-DRB1. Cada corte obtido foi posto em banho-maria histológico e posteriormente depositado sobre lâmina silanizada, devidamente identificada e posteriormente levado à estufa a 60°C por 24h.

A utilização do imunomarcador S100, veio da necessária comprovação da presença das células de Langerhans em meio à lesão intraepitelial, uma vez que na ausência da expressão do marcador subsequente HLA-DRB1, teríamos a indicação apenas de que as células de Langerhans estariam inativadas diante da presença dos antígenos virais e não ausentes dos cortes teciduais.

**Figura 11** - Corte histológico de linfonodo normal. Controle de qualidade para imunomarcador S100. Concentração de células de Langerhans em zona paracortical (seta). Microscopia óptica 400X

**Fonte:** Autora da pesquisa.



Realizou-se o controle de qualidade dos imunomarcadores previamente à aplicação destes nos cortes teciduais destinados ao estudo. O S100 foi aplicado sobre corte histológico oriundo de nevus normal por ser proteína também presente em células melanocíticas. O HLA-DRB1 foi previamente aplicado sobre cortes histológicos oriundos de tonsila por ser este um órgão linfóide, rico em células de Langerhans que chegam ao local expressando antígenos por meio da proteína HLA-DRB1 (Figura 11).

As secções histológicas obtidas a partir dos blocos de parafina contendo os fragmentos teciduais da cérvix foram submetidas à desparafinização em xilol a 60° C, por 15 minutos, seguindo-se novamente ao xilol à temperatura ambiente, por 15 minutos. Prosseguiu-se à desidratação com etanol a 95%, a 80% e 70%, com posterior lavagem em água corrente e destilada, de acordo com o procedimento padrão em histotecnologia (ALVES; BACCHI; VASSALO, 1999).

Procedeu-se daí à recuperação antigênica onde as lâminas foram imersas em banho de solução de citrato de sódio a 10mM, em pH de 6.0 e colocadas em microondas, na potência máxima, por duas sessões de 10 minutos cada uma e resfriadas por 20 minutos, seguindo-se em água corrente e destilada.

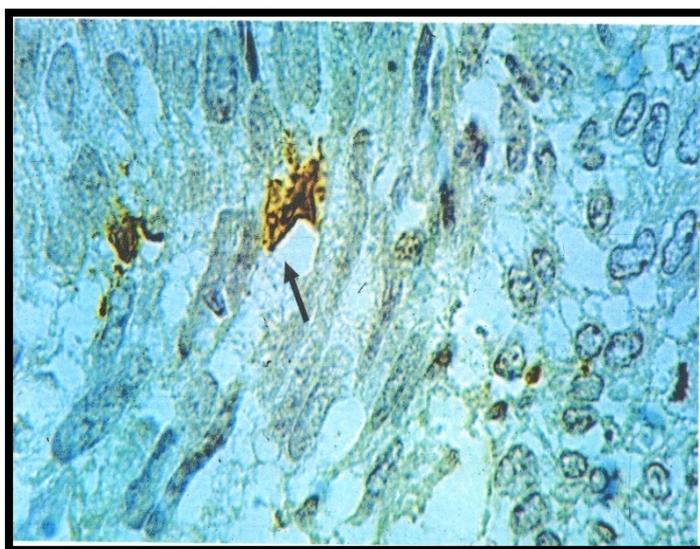
Para bloqueio da peroxidase endógena, fez-se uso da solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% (solução comercial equivalente a 10 volumes), seguindo-

se a lavagem com água corrente e destilada em dois banhos de 10 minutos cada. Ambos os anticorpos foram diluídos em 1:1000 em tampão salina fosfato e incubados em câmara úmida a 4°C, por 16 hs e após lavados em tampão salina fosfato-PBS com três trocas a cada 3 ou 5 minutos cada. Após esta etapa, o anticorpo secundário foi incubado, diluído em PBS por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida e mais uma vez lavado com PBS efetuando-se três trocas a cada 3 ou 5 minutos cada. Em seguida o complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP) da mesma espécie animal do anticorpo utilizado, foi incubado, diluído em PBS (Solução tampão salina fosfato) por 30 minutos em 37°C em câmara úmida, seguindo-se, novamente a lavagem em PBS com três trocas a cada 3 ou 5 minutos cada.

Para visualização da imunomarcação foi empregado o *kit* de revelação Liquid DAB-LSAB2 – Plus e a 3'3 – diaminobenzidina 4 HCL como cromógeno onde as lâminas foram incubadas por 3 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida, observou-se ao microscópio nas lâminas controle-positivo o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado como produto final da reação. Foram em seguida lavadas em água corrente e destilada por 3 minutos.

As preparações histológicas correspondentes a imunomarcação foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 1 minuto e depois lavadas com água corrente e destilada. Posteriormente foram imersas em solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5% por quatro vezes, rapidamente, lavando em seguida com água corrente e depois com água destilada. À seguir, as lâminas foram desidratadas em etanol a 50%, 80% e 95% com posterior uso do xilol, em três vezes e montadas em meio de montagem sintética, o entellan, contra lamínula para leitura em microscopia óptica comum (Figura 12).

**Figura 12** – Imunomarcação: células de Langerhans (seta) usando-se S100. Microscopia óptica 1000X.  
**Fonte:** Autora da pesquisa.



### III- PCR

#### 1. Amostras

As amostras foram coletadas a partir de raspagem da região cervical, com o auxílio de escova do tipo “*cytobrush*” em mulheres portadoras de lesão intraepitelial cervical em exame citopatológico prévio, segundo critérios de inclusão desta pesquisa. Após raspado cervical, as escovas foram imediatamente colocadas em tubete contendo 3,0 mL de solução fixadora *Universal Collection Medium* (UCM). As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por período máximo de quatro dias (BURGER, 1999).

#### 2. Extração do DNA

A extração de DNA procedeu-se a partir de 500µl do conteúdo do tubete. Para esta etapa utilizou-se o *kit* de extração comercial “Wizard Genomic DNA Purification kit” (PROMEGA), seguindo as instruções do fabricante.

#### 3. Controle de qualidade da amostra

Para certificação de que existia DNA viável nas amostras e não havia presença de contaminantes, recorreu-se à PCR usando o conjunto de *primers* específicos para Beta-Globina humana (seqüência gênica presente em células humanas) sobre 10µl das amostras. A Beta-Globina é um controle de qualidade que avalia celularidade, ou seja, número de nucleotídeos presentes na amostra, confirmando a qualidade destas. Para essa reação foi utilizado o *kit* “GoTaq® Hot Start Polymerase” (PROMEGA). O seguinte protocolo de amplificação foi utilizado: 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão adicional à 72°C por 8 minutos. O amplicon obtido foi de aproximadamente 250bp (BARTLETT, 2003).

#### 4. Reação em cadeia da polimerase – PCR

A presença do DNA do HPV nas amostras foi observada através do uso de *primers consensus*. Para cada paciente foram utilizados os *primers* MY09/MY11, obtidos a partir de nucleotídeos degenerados e, portanto, considerados *primers* externos e os *primers* GP05+ e GP06+

Para os primeiros *primers* foi utilizado o *kit* “GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polymerase” (PROMEGA). O seguinte protocolo de amplificação foi utilizado: 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão adicional à 72°C por 8 minutos. O tamanho do fragmento obtido para essa reação foi de 450pb.

Para a aplicação dos *primers* GP05+ e GP06+ também foi utilizado o *kit* “GoTaq Hot Start Polymerase”(PROMEGA), seguindo o protocolo de amplificação: 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 40°C por 2 minutos e extensão à 72°C por 1,5 minutos, seguidos de uma extensão adicional à 72°C por 4 minutos (BARTLETT, 2003).

### **5. Nested PCR**

Para amostras em que há baixa quantidade de nucleotídeos virais, o Nested PCR é bem aplicado, pois amplia o que já foi ampliado, utilizando-se dos híbridos (amplicons) obtidos da MY09/MY11 e sobre estes a PCR com o sistema GP05+06+.

Para realização da Nested-PCR utilizou-se 1µL do amplicon obtido através da PCR realizada com o conjunto de *primers* MY09/MY11. A amplificação foi realizada com os *primers* GP05+ e GP06+, realizada para um volume final de 15µl contendo 1x de tampão da PCR, 200µM de cada dNTP, 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1pmol/µl de cada *primer* específico (GP05+ e GP06+), 1 U de TaqDNA polimerase e 200ng de DNA. Para essa reação também foi utilizado o *kit* “GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polymerase” (PROMEGA). Foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 40°C por 2 minutos e extensão à 72°C por 1,5 minutos, seguidos de uma extensão adicional à 72°C por 4 minutos.

### **6. Eletroforese dos amplicons**

A separação do produto da amplificação (híbridos) foi realizada pela eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com *Blue Green Loading Dye (LGC)* e visualizado em luz ultravioleta. Os amplicons obtidos da PCR utilizando-se o conjunto MY09/MY11 foram de aproximadamente 450 pb. Já os amplicons obtidos através do conjunto GP05/GP06+ apresentaram aproximadamente 150pb. Ambos os amplicons foram comparados com o marcador de peso molecular *ladder* 100bp (Promega).

## 7. Seqüenciamento dos amplicons

Após a confirmação da positividade das amostras para HPV, os amplicons foram submetidos à reações de seqüenciamento utilizando-se o *kit* “DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit” (GE HEALTHCARE) Para tal, foi usado 8µl do reagente Dye Terminator, 0,5pmol do *primer* MY11 ou GP05+ (escolhidos de acordo com o sistema com o qual o amplicon foi sintetizado) e 200nm do amplicon para um volume final de 20µl. Para a aplicação da PCR de seqüenciamento, o protocolo de amplificação de 30 ciclos de: 94°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Logo após, realizou-se a reação de purificação das amostras de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida as amostras foram levadas ao seqüenciador automático de DNA “MegaBACE 1000 DNA Sequencer”.

Ao final do processo os resultados encontrados foram comparados com os diversos genótipos virais listados na plataforma on-line BLASTn do National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afim de determinar o tipo do HPV encontrado na pesquisa.

## IV- Quantificação da imunexpressão da proteína HLA-DR: Análise Morfométrica:

A expressão da proteína HLA-DR nas células de Langerhans foi quantificada através da técnica de morfometria com auxílio de microscópio óptico com câmera cuja finalidade é capturar a imagem da área tecidual sob magnificação de 400x e conectá-la a *software*, tendo por base os princípios teóricos de Oort e Baak, 1993.

Cada lâmina contendo cortes teciduais submetidos à imunomarcção com S100 e com o HLA-DR foi avaliada à microscopia óptica para identificação das áreas de maior expressão destas proteínas. Estes campos foram localizados em primeira instância, com aumento de 50X, para posteriormente serem fotografados em aumento de 400x. De cada lâmina foram selecionados oito campos de maior imunexpressão, os quais foram fotografados A imagem de cada campo fotografado foi passada ao *software* para cálculo da área ocupada pelo corte tecidual, obtida após delimitação, à mão livre, da extensão tecidual na lâmina. O cálculo da área em mm<sup>2</sup> foi baseado na extensão tecidual previamente selecionada. Na sequência abaixo:

- 1- Determinação da área ocupada pelo epitélio escamoso em mm<sup>2</sup> (Figura13).
- 2- Seleção da área tecidual à mão livre (Figura 14).
- 3- Contagem das células imunomarcadas.

Fórmula utilizada para cálculo da densidade das células de Langerhans por mm<sup>2</sup>:

$$Dcl = \frac{Ncl}{Aesc}$$

Onde: Dcl é a densidade das células de Langerhans por mm<sup>2</sup>

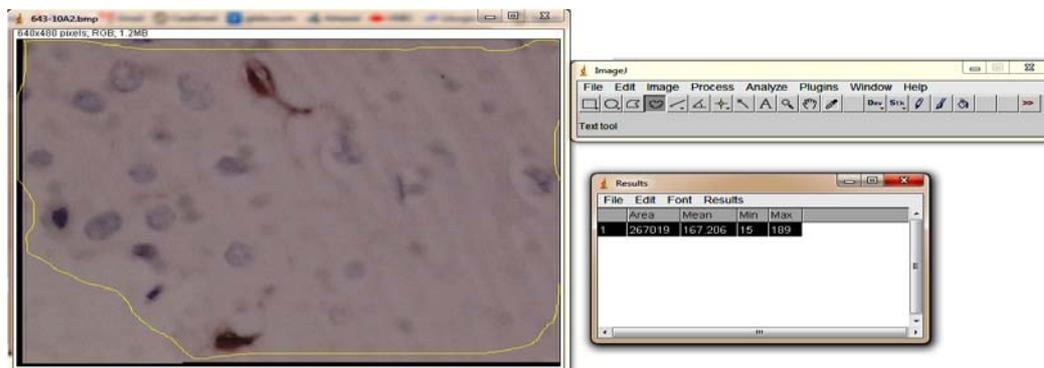
Ncl é o número de células de Langerhans em oito campos examinados

Aesc é a área ocupada pelo epitélio escamoso calculada conforme delimitação tecidual prévia pelo programa Image J.

**Figura 13** - Determinação da área histológica.

**Fonte:** Autora da pesquisa.



**Figura 14** - Seleção da área tecidual à mão livre**Fonte:** Autora da pesquisa.

4 – Cálculo da imunoposição das proteínas S100 e HLA-DRB1 em planilha Excel (Office da Microsoft) onde o número de células marcadas é dividido pela área tecidual quantificada através do Image J.

#### 4.10 Análises Estatísticas

Foi utilizado o programa SPSS versão 13.

Para obtenção dos resultados foram aplicados testes de significância para correlação de Pearson, o teste de associação de qui-quadrado, teste do coeficiente Kappa, teste paramétrico t, teste U de Mann Whitney.

#### 4.11 Aspectos Éticos

A pesquisa desenvolvida, por envolver contato com pacientes, está respaldada por consentimento livre e esclarecido, devidamente assinado, seguindo aos termos da Resolução CNS nº 196, de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde sendo aprovada pelo comitê de ética e pesquisa da Secretaria Estadual de Saúde em 30 de setembro de 2008.

Em todas as etapas foi mantida a confidencialidade das fontes e dados, sem identificação direta das participantes.

Os resultados foram fornecidos às respectivas pacientes acompanhados de explicação do seu significado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão do presente trabalho encontram-se no formato de artigos.

# ARTIGO 1

---

## 5.1 Artigo 1

### **Expressão da HLA-DR nas células de Langerhans em portadoras de lesões intraepiteliais cervicais induzidas pelo HPV**

---

**Wanúzia Keyla Miranda<sup>1,2</sup>**  
**Heloísa Ramos Lacerda<sup>2,3</sup>**  
**Terezinha Tenório Silva<sup>4</sup>**  
**Paulo Roberto Eleutério de Souza<sup>5</sup>**

- 1- Laboratório SECICOL - Serviços Diagnósticos em Patologia Genital- Paraíba, João Pessoa-PB-Brasil
- 2- Pós graduação em Medicina Tropical- Centro de Ciências da Saúde- Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE- Brasil
- 3- Departamento de Medicina Clínica – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE- Brasil
- 4- Departamento Materno Infantil - Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE-Brasil
- 5- Departamento de Biologia- área de Genética - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE-Brasil

Agradecimento: à Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

#### **Correspondência: Wanúzia Keyla Miranda**

Avenida: Umbuzeiro, 581 – Apto. 302. Residencial Neápolis, Manaíra, JoãoPessoa-Paraíba,Brasil. CEP.: 58000000

**Telefones:** (83) 9129.1202, 3244.7226, 3512.2946

**e-mail :** [wk13miranda@hotmail.com](mailto:wk13miranda@hotmail.com)

## 5.1 Artigo 1

### **Expressão da HLA-DR nas células de Langerhans em portadoras de lesões intraepiteliais cervicais induzidas pelo HPV**

Expressão da HLA-DR em lesões HPV-induzidas cervicais

[wk13miranda@hotmail.com](mailto:wk13miranda@hotmail.com)

Av. Umbuzeiro, 581- Apto. 302, Resid. Neápolis- Manaíra. João Pessoa-Paraíba,  
Brasil.

Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer do Estado da Paraíba

[helramos@terra.com.br](mailto:helramos@terra.com.br)

## RESUMO

As lesões intraepiteliais cervicais HPV-induzidas estão relacionadas à falhas na apresentação antigênica através do sistema HLA. Avaliamos a expressão da HLA-DRB1 em 123 portadoras de lesão de baixo grau e 105 de lesão de alto grau, relacionando-a ao tipo de HPV. As pacientes submeteram-se à colposcopia com biópsia e coleta para PCR. Obtiveram-se três secções histológicas destinadas ao diagnóstico e duas para imuno-histoquímica usando S100 e HLA-DRB1. A imunoexpressão foi quantificada por morfometria através de software específico e correlacionadas ao tipo de HPV pelo teste U de Mann-Whitney. Para relacionar as atipias epiteliais ao tipo de HPV usou-se o teste qui-quadrado. Apenas tipos de alto risco foram identificados, predominando o 16(39,5%), 18(20,2%) e 31(16,2%). A imunoexpressão de HLA-DRB1 foi menor que S100. O tipo 31 promoveu redução estatisticamente significativa da expressão de HLA-DRB1. Tais resultados sugerem que a expressão de HLA-DRB1 pode ser inibida por ação de alguns tipos de HPV.

**Palavras-chave:** HPV. Lesão ntraepitelial cervical. Proteína HLA-DR.

## INTRODUÇÃO

Embora os tipos de HPV de alto risco oncogênico desempenhem um papel importante na gênese das lesões intraepiteliais, não são suficientes para desencadear a carcinogênese.<sup>1</sup> Observa-se que a maioria das lesões por HPV, ainda que induzidas pelos tipos de alto risco oncogênico, regredem espontaneamente, refletindo o caráter transitório destas lesões<sup>2</sup>, de maneira que menos de cinco por cento das infectadas por estes tipos virais, desenvolverão câncer de colo uterino.<sup>3</sup>

A progressão das lesões intraepiteliais ao câncer invasor, freqüentemente relacionado à persistência e alta carga de DNA HPV, demonstra falha na resposta imune do hospedeiro em controlar a infecção<sup>4</sup>, sugerindo que antígenos virais não são adequadamente apresentados ao sistema imune, devido não só a mecanismos de evasão imune utilizados pelo HPV, mas à alterações funcionais e quantitativas das células de Langerhans<sup>5</sup>.

A maioria dos cânceres cervicais e lesões precursoras expressam nas células tumorais peptídeos que compõem as proteínas precoces E6 e E7 do HPV as quais se mostram como antígenos potentes, capazes de suscitar uma eficaz resposta imune<sup>6</sup> bem como alterar a expressão de genes envolvidos na resistência do hospedeiro à infecções<sup>4</sup>. A apresentação dos peptídeos antigênicos do HPV é feita por proteínas na superfície das células de Langerhans denominadas HLA-DRB1. São produzidas por genes que compõem o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. Apenas associado a esta proteína, o antígeno é reconhecido pelos linfócitos T, levando a sucessivos eventos que objetivam destruir células infectadas pelo vírus<sup>7</sup>. Variações ocorridas nos genes que compõem o sistema antígeno leucocitário humano (HLA) aumentam o risco para câncer de colo uterino e alteram a resposta imune mediada por células contra o HPV<sup>8</sup>. A integração do DNA do HPV ao DNA do hospedeiro ocorre em sítios aleatórios. Ao ocorrer próxima ao gene regulador *c-myc*, pode modificar a expressão dos genes MHC e reduzir a expressão dos genes HLA, promovendo uma deficiente resposta imune celular<sup>9</sup>.

A infecção pelo HPV parece desapercibida devido a meios utilizados pelo vírus para livra-se da resposta imune e garantir a geração de novos vírions<sup>10</sup>, agindo sobre a produção de interferon pelos queratinócitos infectados, sobre a ativação das células de Langerhans e produção de sinais necessários para ativação dos linfócitos T<sup>11</sup>. Observar a interferência deste vírus sobre a expressão das moléculas HLA-

DRB1 em lesões intraepiteliais da cérvix uterina e relacioná-la ao genótipo viral é o objetivo deste trabalho.

## MÉTODOS

A amostra consta de 228 pacientes com idade média de  $36 \pm 10,4$  anos, portando laudo citopatológico de lesão intraepitelial, 123 classificadas como de baixo grau e 105 como de alto grau. Todas as pacientes concordaram em participar da pesquisa, assinando termo de consentimento informado. Submeteram-se à avaliação colposcópica usando-se ácido acético 3%, seguido do teste de Schiller para identificar áreas epiteliais atípicas, segundo técnica preconizada pela Associação Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia<sup>12</sup>. As portadoras de atipias colposcópicas realizaram coleta de material cervico-vaginal para PCR seguido de biópsia dirigida, utilizando-se pinça de Gaylor-Medina. Para PCR, utilizou-se primer consensus MY09/MY11 e GP5+/GP6+ em material colhido com citobrush e acondicionado em tubo tipo *ependorff*, contendo líquido que permite manter a integridade dos ácidos nucleicos virais. Cada amostra foi submetida a controle negativo para constatar ausência de contaminação e controle positivo com a  $\beta$ -globina, para atestar a suficiente celularidade<sup>13</sup>. Foram excluídas do estudo, pacientes sem achados colposcópicos anormais em cérvix ou vagina com colposcopia satisfatória, bem como aquelas sem evidência histopatológica de lesão intraepitelial ou cujo material foi insuficiente para obtenção dos cortes histológicos necessários. O laudo histopatológico foi considerado “padrão ouro” para o diagnóstico definitivo das lesões intraepiteliais. Utilizou-se nos laudos citopatológicos a nomenclatura preconizada pela Sociedade Brasileira de Citopatologia e diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero-2011<sup>14</sup>. Os fragmentos teciduais preservados em parafina foram seccionados três vezes: uma para diagnóstico e as restantes para imunomarcção. Utilizou-se o imunomarcador S100 para identificação das células de Langerhans e HLA-DRB1 para evidenciar ativação destas células. A quantificação da imunoexpressão foi realizada por análise morfométrica, obtida com uso de *software* específico. Para comparação entre a imunoexpressão dos marcadores HLA-DR e S100 fez-se uso do teste paramétrico t. Para correlacionar a imunoexpressão HLA-DR ao tipo do HPV identificado, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

Identificou-se apenas um tipo viral de baixo risco oncogênico (HPV 42), associado a lesão intraepitelial de baixo grau e maior presença de tipos de HPV de alto risco: 16, 18, 31, 33, 53, 73, 45, 56 e 51, inclusive em lesões de baixo grau, com prevalência dos tipos 16(47,6%), 18(24,3%) e 31(19,6%) **Tabela 1**. Constatou-se reduzida expressão da proteína HLA-DRB1 em relação à S100, contudo igual diferença não se observou na expressão de HLA-DRB1 entre lesões intraepiteliais de baixo e alto graus. **Tabelas 2 e 3**. Evidenciou-se que o tipo 31 causou redução estatisticamente significativa da expressão da proteína HLA-DRB1 nas células de Langerhans. **Tabela 4**.

## DISCUSSÃO

Os tipos virais 16 e 18, segundo Pitta *et al.*(2010), são prevalentes em lesões intraepiteliais cervicais na maioria das populações humanas em todo o planeta. Este relato foi constatado no presente estudo em que, independente do grau de atipia histológica identificado, houve predomínio de tipos virais de alto risco oncogênico como 16, 18 e 31, conforme demonstrado na tabela 2.

A ligação estável entre os receptores das células T e as moléculas de superfície HLA-DRB1 expressas na superfície das células de Langerhans é condição indispensável para uma efetiva resposta imune<sup>6</sup>. No presente estudo, observou-se menor expressão das moléculas HLA-DRB1 em relação à S100, sugerindo que algumas células de Langerhans presentes no sítio da lesão não expressaram estas proteínas. Tal evidência corrobora com Finlay & McFadden (2006). Estes autores relatam que o HPV promove ação regulatória sobre as moléculas HLA-DRB1, com alterações na apresentação antigênica, ativação e sensibilização dos linfócitos T CD<sub>4</sub>, como meio de evadir-se da resposta imune do hospedeiro.

Embora a literatura não atribua maiores referências para o HPV 31 além de tratar-se de um tipo viral de alto risco oncogênico, nesta pesquisa, este tipo foi o terceiro mais prevalente entre os evidenciados, com a particularidade de ter relação estatisticamente significativa com a redução da imunoexpressão da HLA-DR. Semelhante prevalência foi observada em trabalho de Baldez da Silva *et al* (2009), considerada relevante quando relacionada à políticas públicas de vacinação que não deve negligenciar os diferentes tipos virais prevalentes por região e seus diferentes efeitos citopáticos.

A imunexpressão da proteína HLA-DRB1 nas lesões intraepiteliais cuja PCR foi negativa para DNA-HPV, reporta-nos à possível participação deste vírus na indução à carcinogênese, não permanecendo, contudo, responsável pelas demais etapas deste processo as quais manteriam o fenótipo maligno das células infectadas: efeito hit and run<sup>18</sup>. Embasado nesta possibilidade, a expressão da proteína HLA-DRB1 seria em resposta a peptídeos antigênicos do HPV ainda encontrados nas células componentes da lesão, assim como a presença de antígenos tumorais derivados das alterações estruturais nas células que sofreram transformação maligna<sup>19</sup>.

Concluimos que alguns tipos de HPV são capazes de interferir na expressão da proteína HLA-DRB1 inibindo-a. Tal fato repercutirá na apresentação de antígenos, estimulação dos linfócitos T e efetividade da resposta imune celular, podendo este ser um dos meios pelo qual as lesões intraepiteliais cervicais conseguem evoluir, vencendo a vigilância imune.

## **AGRADECIMENTOS**

À pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, pelo auxílio financeiro prestado.

## REFERÊNCIAS

1-Ito MM, Vargas SM, Suzuki LE, Merlin IC. 2010. Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do cancer cervico-vaginal. *Rev Bras de Análises Clínicas*; vol 42:127-129.

2-International Agency of Research on Cancer IARC. 2007. Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*. 90:1-636

3- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissman L. 2006. *HPV in the etiology of human cancer*. *Vaccine*. 24: S1-S10

4- Stanlay MA. Immune responses to human papilloma viruses. 2009. *Indian J Med Res* 130: 266-276

5- Herfs M, Herman L, Hubert P, Minner F, Arafa M, Roncarati P, Henrotin Y, Boniver J, Delvene P. 2009. *High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre) neoplastic lesions and functional consequences for antigen presenting cells*. *Cancer Immunol. Immunother*. 58: 603-14.

6- Wu C-Y, Monie A, Pang X, Hung CF, Wu T-C. 2010. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4+ T help and dendritic cell activation. *Journal of Biomedical Science* 17:88

7- Mayer G. 2009. *Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e receptores de células T- Papel nas Respostas Imunes*. University of South Caroline - School Medicine.

8- Madeleine M M, Johnson LG, Smith AG, Hansen JA, Nisperos BB, Li S, Zhao L-P, Daling JR, Schwartz SM, Galloway DA. 2008. *Comprehensive Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 Loci and Squamous Cell Cervical Cancer Risk*. *Cancer Res*. 68: 3532-3539.

- 9- Gonçalves MAG, Donadi EA. 2004. Immune Cellular Response to HPV: Current Concepts. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 8(1): 1-9.
- 10-Boccardo H. 2011. *Os mecanismos de ação do vírus e da vacina contra o HPV*. HPV news 2:18-25
- 11- Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. 2000. *Viral subversion of the immune system*. Annual Review of Immunology.18:861-926.
- 12- Martins NV, Ribalta JCL. 2005. *Patologia do Trato Genital Inferior: Diagnóstico e Tratamento*, 1ª Ed. São Paulo: Rocca.
- 13- Bartlett JMS, Stirling D.2003 *Methods in Molecular Biology*. PCR Protocols, 2<sup>nd</sup> Ed. Gasglow, UK
- 14- Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. 2011. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo uterino. Rio de Janeiro: INCA.
- 15-Pitta DR, Campos EA, Sarian LO, Rovella MS, Derchain SFM. 2010. Prevalência do HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. *Rev Bras. Ginecol e Obstet*. 3: 315-20.
- 16- Finlay B & McFadden G. 2006. *Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and virus pathogens*. Cells. 124:767-782.
- 17- Baldez da Silva MFPT, Chagas BS, Guimarães V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL, Stocco AC, Crovella S, Freitas AC, Beçak W. 2009. *HPV 31 and 33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil*. Genetics and Molecular Research. 8: 1437-1443.
- 18- Barrasso R, Gross GE. 1999. *Infecção por Papilomavírus Humano: Atlas clínico de HPV*.1ª Ed.Porto Alegre- Brasil.
- 19- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2003. *Imunologia básica*. Funções e distúrbios do sistema imune. 3ª Ed. São Paulo.

## RESULTADOS E ANÁLISE DOS DADOS

**Tabela 1** - Associação do grau de alteração histopatológica e tipo de HPV

TIPO VIRAL <sup>♦</sup>	Exame Histológico						Teste de X <sup>2</sup> Significância <b>p-valor</b>
	Baixo grau		Alto grau		Total		
	n	%	n	%	n	%	
16	30	33.3	60	66.7	90	47.6	0,387
18	22	47.8	24	52.2	46	24.3	0,067
31	11	29.7	26	70.3	37	19.6	0,340
33	1	9.1	10	90.9	11	5.8	0,058
53	4	36.4	7	63.6	11	5.8	1,000
73	5	55.6	4	44.4	9	4.8	0,291
45 <sup>++</sup>	-	-	2	100.0	2	1.1	-
56 <sup>++</sup>	-	-	1	100.0	1	0.5	-
42 <sup>++</sup>	1	100.0	-	-	1	0.5	-
51 <sup>++</sup>	-	-	1	100.0	1	0.5	-
<b>Total</b>	70	39.0	119	61.0	189	-	-

<sup>♦</sup> Nível de significância do teste qui-quadrado:  $\alpha = 0,05$  ou 5%

<sup>(++)</sup> Ausência de dados, não pode ser aplicado o teste de qui-quadrado.

**Tabela 2** - Comparação da expressão dos marcadores HLA-DRB1 e S100.(n = 228)

Teste-t (dados emparelhados)	Imunomarcador	Imunoexpressão
Média por marcador	HLA-DR (n=228)	1,75
	S100 (n=228)	1,95
Estatística t (g.l = 227)	-	t = 2,612
p-valor (bicaudal)	-	<b>p=0,010*</b>

\* Resultado significativo, p-valor < 0,05;

**Tabela 3** - Comparação da expressão dos marcadores HLA-DR e S100 em relação às alterações histopatológicas nas pacientes (n = 228)

Imunoexpressão (Valores médios)	Exame Histológico		Estatística U	Aprox. Z	Sig. p-valor (bicaudal)
	Baixo	Alto grau			
HLA-DRB1	1,67	1,80	5552,0	-1,304	p=0,192
S100 – células	1,96	1,95	5960,0	-0,466	p=0,641

n.s. = resultado não-significativo, p > 0,05

**Tabela 4** - Comparação da expressão dos marcadores HLA-DRB1 e S100 em relação aos tipos virais prevalentes (n = 228)

TIPO VIRAL	Expressão	Resposta (valores médios)		Estatísticas		Sig. p-valor (bicaudal)
		Ausente	Presente	U	Aprox. Z	
16	HLA-DRB1	0,0099	0,0064	5533,0	-1,391	p=0,164
	S100	0,0072	0,0194	5981,0	-0,470	p=0,638
18	HLA-DRB1	0,0072	0,0194	5981,0	-0,470	p=0,638
	S100	0,0130	0,0079	4125,0	-0,153	p=0,879
31	HLA-DRB1	<b>0,0087</b>	<b>0,0077</b>	<b>2754,5</b>	<b>-2,121</b>	<b>p=0,034*</b>
	S100	0,0130	0,0067	3261,0	-0,742	p=0,458

\* resultado significativo, p-valor < 0,05

## ARTIGO 2

## 5.2 Artigo 2

### **Associação da tipagem do HPV ao exame citopatológico no rastreamento do câncer e manejo das lesões cervicais de baixo grau**

**Wanúzia Keyla Miradanda<sup>1,2</sup>**  
**Heloísa Ramos Lacerda<sup>2,3</sup>**  
**Terezinha Tenório Silva<sup>4</sup>**  
**Paulo Roberto Eleutério de Souza<sup>4</sup>**

- 1- Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer, Secretaria de Estado da Saúde, CEP: 58013-522 João Pessoa, PB, Brasil.
- 2- Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.
- 3- Departamento de Medicina Clínica - Universidade Federal de Pernambuco, CEP: 50670-901, Recife, PE. Brasil.
- 4- Departamento Materno Infantil - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.
- 5- Departamento de Biologia- área de Genética - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE-Brasil

#### **Correspondência: Wanúzia Keyla Miranda**

Avenida: João Machado, 109 -1<sup>o</sup> andar- Centro.

CEP: 58.013.520

**Telefones:** (83) 3218.5369, 3244.7226, 3512.2946

**e-mail:** [wk13miranda@hotmail.com](mailto:wk13miranda@hotmail.com)

**Runninghead:**

DNA-HPV e citologia no câncer cervical

**Artigo original, ainda não apresentado parcial ou totalmente**

## RESUMO

A busca em aprimorar o rastreamento do câncer cervical propõe associar testes de DNA-HPV ao exame citopatológico, restringindo a colposcopia para portadoras de HPV de alto risco. **Objetivo:** Avaliar a associação de testes DNA-HPV à citopatologia no rastreamento do câncer e manejo das lesões de baixo grau. **Método:** submeteram-se à colposcopia com biópsia e coleta de material para PCR, 123 portadoras de laudo citopatológico anormal, sendo 123 de baixo grau e 105 de alto grau, confirmadas histopatologicamente. A concordância entre os exames citopatológico e histopatológico foi obtida pelo teste KAPPA. Para relacionar o tipo de lesão intraepitelial ao tipo de HPV, usou-se o teste qui-quadrado. **Resultados:** Apenas um tipo viral de baixo risco foi identificado (HPV 42), associado a lesão de baixo grau. Houve predomínio de HPV de alto risco, inclusive nas lesões de baixo grau com prevalência dos tipos 18(60,9%), 16(47,8) e 31(45,9%). Das lesões intraepiteliais de baixo grau, 26 (21,1%) foram negativas para DNA-HPV. Co-infecção foi observada em 9% das pacientes com igual prevalência do HPV 16. O exame citopatológico mostrou razoável correlação com o histopatológico (Kappa 0,44) e isolado mostrou maior sensibilidade na identificação das lesões de baixo grau (83,1%), observando-se 49(35,3%) subdiagnósticos e 15(16,9%) sobrediagnósticos. **Conclusão:** Constatada a importante prevalência de HPV de alto risco em lesões de baixo grau, a introdução do teste de DNA-HPV ao rastreamento, promove sobre tratamentos em lesões com freqüente regressão espontânea.

**Palavras-chave:** Rastreamento. Câncer cervical. HPV. Exame citopatológico. DNA-HPV. Tipagem viral. Lesão intraepitelial de baixo grau.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, o rastreamento do câncer de colo uterino se faz pelo exame citopatológico voluntário, realizado em intervalo trienal após dois exames anuais sem anormalidades. Prioriza-se as idades entre 25 a 64 anos.<sup>1</sup> Constatou-se, no entanto, que a cobertura na realização deste exame preventivo permanece baixa, principalmente nas camadas sociais desfavorecidas, em mulheres com mais de 50 anos e pós-menopausadas.<sup>2</sup> O exame citopatológico mostra considerável incidência de resultados falso-negativos principalmente ao tratar-se de lesões de alto grau.<sup>3</sup> Admitindo-se que o Papilomavírus humano (HPV) é o agente etiológico do câncer cervical, a identificação deste vírus, por meio de exames de biologia molecular, teria sua importância como etapa inicial, para o rastreamento desta neoplasia.<sup>4</sup> Tal procedimento apresenta um valor preditivo negativo de 99%, com sensibilidade de 95%. Contudo, ainda que tipos de HPV de alto risco oncogênico desempenhem um importante papel na gênese das lesões intraepiteliais, não são suficientes em si, para desencadear a carcinogênese<sup>5</sup>, portanto, não demonstram a presença de lesões intraepiteliais.

A proposta derivada de estudos em outros países é a realização da citopatologia somente quando o teste de DNA-HPV for positivo para tipos de alto risco oncogênico<sup>6</sup>, ressaltando-se que os custos com este exame seriam minimizados pela possibilidade de aumentar o intervalo do rastreamento<sup>7</sup>. Esta opção confronta com a realidade dos países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil, onde não existe um rastreamento organizado e as divergências sócioeconômicas dificultam a aplicação dos testes moleculares, de alto custo, contrapondo-se à avaliação morfológica por meio da citopatologia sucedida ou não da colposcopia, uma prática de baixo custo e que identifica a presença das lesões cervicais.<sup>1</sup> A tipagem viral tem sido opção para portadoras de resultados citopatológicos ambíguos, bem como no seguimento das lesões de baixo grau não tratadas<sup>8</sup>. A possibilidade de auto-coleta tem difundido este método como meio pelo qual aumentar-se-ia a cobertura populacional no rastreamento do câncer.<sup>9</sup>

No Brasil, as lesões de baixo grau correspondem ao segundo diagnóstico citopatológico mais freqüente, precedido pela categoria ASC-US (Atipias escamosas

de significado indeterminado, provavelmente não neoplásica).<sup>1</sup> Não há recomendação oficial para o uso do teste DNA-HPV como primeira etapa no rastreamento das neoplasias cervicais ou associado ao exame citopatológico ou diante de resultados ambíguos. No Brasil, a recomendação para portadoras de lesão de baixo grau, acima de 20 anos, é repetir o exame citopatológico seis meses após o primeiro. Persistindo a anormalidade, a colposcopia é indicada, procedendo-se à realização da biópsia quando evidenciado um achado colposcópico anormal. Confirmando-se uma lesão de baixo grau, esta poderá ser acompanhada semestralmente por citopatologia e colposcopia. Esta conduta está embasada na freqüente regressão espontânea destas lesões cujo risco de agravamento em dezoito meses não se mostrou diferente entre mulheres tratadas ou apenas seguidas pelos exames citopatológico e colposcópico<sup>10</sup>. Avaliar a contribuição da identificação do genótipo do HPV associado ao exame citopatológico na prevenção do câncer cervical e manejo das lesões de baixo grau é o objetivo deste trabalho.

## MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2010, no Centro Especializado para o Diagnóstico do Câncer do Estado da Paraíba, região nordeste do Brasil, local de referência para os exames citopatológicos, colposcópicos e histopatológicos daquele estado. Foram incluídos 228 pacientes com laudos citopatológicos constando lesão intraepitelial cervical, entre as quais 123 classificadas como de baixo grau e 105 como de alto grau. Todas as pacientes concordaram em participar da pesquisa, assinando termo de consentimento informado. A seguir, foram submetidas à avaliação colposcópica usando-se ácido acético 3%, seguido de teste de Schiller para evidência das áreas epiteliais alteradas, conforme técnica preconizada pela Associação Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia.<sup>11</sup> As pacientes com achados colposcópicos anormais, foram submetidas a coleta de material cervico-vaginal para PCR, seguido de biópsia dirigida, utilizando-se pinça de Gaylor-Medina. Para PCR, utilizou-se *primer* consensus MY09/MY11e GP5+/GP6+ em material colhido com *citobrush*, posteriormente acondicionada em tubo tipo *ependorff*, contendo líquido fixador para manter a integridade dos ácidos nucleicos virais. Durante a realização da técnica, as amostras foram submetidas à controle negativo para constatar ausência de contaminação, controle positivo com a  $\beta$ -globina, para atestar a celularidade suficiente das amostras e ao nested PCR, uma segunda ampliação mais específica

da sequência genômica desejada, objetivando a correção de possíveis erros na primeira ampliação do DNA.<sup>12</sup> Foram excluídas do estudo, as pacientes que não apresentaram achados colposcópicos anormais em cérvix ou vagina, apesar da colposcopia satisfatória. Os resultados da histopatologia, considerada “padrão ouro” para o diagnóstico definitivo das lesões intraepiteliais, foram comparados aos achados citopatológicos, utilizando-se o coeficiente de concordância KAPPA. Foram demonstrados ainda, a sensibilidade e especificidade dos testes morfológicos para constatação de lesões de baixo grau. Para avaliar a relação entre os tipos de HPV e as alterações citopatológicas, utilizou-se o qui-quadrado com níveis de significância de 0,05. A nomenclatura utilizada nos laudos citopatológicos é preconizada pela Sociedade Brasileira de Citopatologia e divulgada nas novas diretrizes brasileiras para o rastreamento do colo do útero.<sup>1</sup>

## RESULTADOS

A idade média das pacientes foi  $36 \pm 10,4$  anos. Apenas 13,6% das pacientes da pesquisa eram fumantes. Foram identificados os tipos virais de alto risco 16, 18, 31, 33, 53, 73, 45, 56, 51, com prevalência dos tipos 18 (60.9%), 16 (47.8%) e 31 (45.9%), inclusive nas lesões de baixo grau. Apenas um tipo viral considerado de baixo risco oncogênico foi identificado (HPV 42), associado a lesão de baixo grau.

### **Tabela 1 e 2.**

Co-infecção foi identificada em 17 (9%) das pacientes, mostrando igual prevalência do HPV 16 e 18, cuja combinação esteve presente em 10 das 17 co-infecções. **Tabela 3.**

Das 228 lesões intraepiteliais identificadas, 39 não apresentaram DNA-HPV. Destas, 26 (21.1%) corresponderam a lesão intraepitelial de baixo grau e 13 (12,3%) a lesão de alto grau. **Tabela 4.**

O exame citopatológico isolado demonstrou maior sensibilidade na identificação das lesões de baixo grau (83,1%), 49 (35,3%) de subdiagnósticos - lesões de alto grau identificadas como baixo grau e 15(16,9%) de sobrediagnósticos - lesões de baixo grau, identificadas como de alto grau. A concordância entre os exames citopatológico e histopatológico mostrou-se razoável pelo teste Kappa (0,44). **Tabela 5.**

## DISCUSSÃO

Contrariando as afirmativas de que lesões de baixo grau associam-se à HPV de baixo risco, a maioria das lesões de baixo grau contém HPV de alto risco oncogênico<sup>1</sup>, em concordância com o demonstrado nesse estudo, cuja prevalência foi de 78% de HPV de alto risco nas lesões de baixo grau classificadas pelo exame citopatológico. A alta prevalência da infecção por HPV de alto risco oncogênico foi também constatada nos estudos de Oliveira, 2010 e relatada por Monsonogo, 2010, como sendo os tipos presentes em 83% dos casos de lesão intraepitelial de baixo grau.

Os tipos virais 16 e 18 são os mais prevalentes em lesões intraepiteliais cervicais na maioria das populações humanas em todo o planeta<sup>14</sup> o que foi evidenciado neste estudo, nas infecções por um único tipo de HPV bem como nos casos de co-infecção por até três tipos virais oncogênicos. Igual prevalência também foi constatada nos casos de co-infecção nos estudos de Rousseau, 2003. A co-infecção com outros tipos de HPV de alto risco oncogênico ocorreu em 9% dos casos incluídos nesta pesquisa. A prevalência dos tipos oncogênicos, mostra-se relevante, considerando-se a tendência da prevenção primária através das vacinas contra o HPV<sup>16</sup> além do fato da resposta imune do hospedeiro apresentar variações tipo-específicas<sup>17</sup>.

A classificação citopatológica das lesões é estabelecida pela evidência de alterações morfológicas celulares, o que torna o exame subjetivo, gerando significativa incidência de resultado falso-negativo<sup>3</sup>. Os testes para detecção do HPV, embora reprodutíveis e sensíveis, demonstram que os tipos de HPV não são suficientes para consumir a carcinogênese<sup>5</sup>. Apesar da subjetividade, o exame citopatológico permanece como estratégia mais adotada para rastreamento do câncer de cervical, compondo o diagrama que orienta as etapas do rastreio iniciado por teste viral<sup>8</sup>.

Com a constatação da prevalência de tipos virais de alto risco oncogênico em lesões de baixo grau, a real consequência dos testes para tipagem viral seriam os sobretratamentos designados a lesões com freqüente regressão espontânea, resultando em vários efeitos adversos de ordem psíquica, física e possíveis danos ao futuro obstétrico de pacientes jovens<sup>15</sup>.

Constatou-se neste estudo que das lesões intraepiteliais confirmadas pela histopatologia, 26(21,1%) lesões de baixo grau e 13 (12,3%) lesões de alto grau, mostraram ausência de DNA HPV com PCR negativa. Para Woodman, 2001, esta ocorrência é muito rara, principalmente em se tratando de lesões de alto grau. Higgins et al., (1991), atribui pior prognóstico para lesões intraepiteliais em que a participação do HPV não é evidenciada e Barrasso, 1999, atribui ação de iniciação à carcinogênese pelo HPV, sem que permaneça responsável pelas etapas posteriores de manutenção do fenótipo maligno (hit and run). A utilização de primers consensus possibilitou a detecção de diferentes tipos de HPV em uma única reação, com controle positivo e negativo em todas as amostras, além do nested PCR, corrigindo erros na amplificação do DNA, de amostragem ou técnica<sup>12</sup>.

A concordância entre os achados citopatológicos e histopatológicos evidenciada pelo teste de Kappa, mostrou-se razoável (kappa 0,44), demonstrando a difícil reprodutibilidade interobservadores no diagnóstico citopatológico de lesão de baixo grau<sup>1</sup>. A associação do teste DNA-HPV ao exame citopatológico não aprimora esta discordância e conforme a prevalência e os tipos virais oncogênicos identificados no presente estudo, levaria a indicação de colposcopia nas portadoras de lesão de baixo grau e não a expectativa.

O aumento no intervalo de rastreio para compensação dos custos com o uso do teste viral, não ocorreria, considerando-se o cauteloso seguimento designado às portadoras de HPV de alto risco. A presença de vírus oncogênicos, acarretaria indicações freqüentes à colposcopia e sobretratamentos por superestimação dos achados colposcópicos, aumentando a morbidade em pacientes jovens. Tais fatos levam-nos a concluir que a utilização dos testes de DNA-HPV no rastreio do câncer cervical não aprimora a detecção ou manejo das lesões intraepiteliais cervicais.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Não há conflitos de interesse por parte de nenhum dos autores.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à coordenação do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal da Paraíba pelo apoio a esta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- 1- Instituto Nacional de Câncer, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes Brasileiras para rastreamento do câncer de colo do útero- 2011; Rio de Janeiro- Brasil.
- 2- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. 2009; Rio de Janeiro- Brasil.
- 3- Moysés N, Balthazar DS, Afonso LA, Oliveira LHS, Cavalcanti SMB. Evaluation of the Combined use of Papanicolaou Screen Test and The Polimerase Chain Reaction for the identification of Patients at Risk of Cervical Cancer . DST- J bras Doenças Sex Transm 2008; 20: 99-103.
- 4- ArbynM, SasieniP, Meijer CJ et al. Clinical applications of HPV testing: A summary of a meta-analyses. Vaccine 2006; 21:578-89.
- 5- Ito MM, Vargas SM, Suzuki LE, Merlin IC. Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do câncer cervico-vaginal. Rev Bras de Analises Clínicas. 2010; vol. 42: 127-129.
- 6- Schiffman M, Wacholder S. From India to the Wolrd- A Better Way to Prevent Cervical Cancer. N Engl J Med. 2009; 360:1453-5.
- 7- Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in management of abnormal cervical screening results. J ClinVirol. 2009; 45: 3-12.
- 8- Monsonego J. Infecções e Doenças Genitais Causadas por HPV- Diagnóstico e Tratamento 2010; Rio de Janeiro; Ed. Revinter Ltda; 2010.

- 9- Gök M. HPV testing on self collected cervico vaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening: cohort study J Bras Med 2010; 340:1040.
- 10-Elit et al. Expectant management versus immediate treatment for low grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized trial in Canada and Brazil. Cancer 2011; 117: 1438-45.
- 11-Martins NV, Ribalta JCL. Patologia do Trato Genital Inferior: Diagnóstico e Tratamento. 1ª Ed. Rocca; São Paulo, 2005
- 12-Bartlett MS, Stirling D. Methods in Molecular Biology.PCR Protocols, 2<sup>nd</sup> Ed. V 226, Glasgow- UK, 2003.
- 13-Oliveira LHS, Ferreira MDPL, Augusto EF, Melgaço FG, Santos LS, Cavalcanti SMB, Rosa MLG. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. 2010, Rev. Soc. Bras Med Trop 2010; 43: 4-8.
- 14-Pitta DR, Campos EA, Sarian LO, Rovella MS, Derchain SFM. Prevalência do HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. Rev Bras. Ginecol e Obstet. 2010. 31: 315-320.
- 15-Rosseau MC, Villa LL, M Abrahamovick, Rohan TE, Franco E. Ocorrência de infecção cervical com vários tipos de papilomavírus humano é associado a idade e anormalidades citológicas. Sex Transm Dis 2003, 30: 581-7
- 16-Baldez da Silva MFPT, Chagas BS, Guimarães V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL, Stocco RC, Crovella S, Freitas AC, Beçak W. HPV 31 and 33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. Genetics and Molecular Research 2009; 8: 1437-1443
- 17-Arbyn M, Kirgiou M, Simoens C, Raifu AO, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Prendinville W, Paraskevidis E. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. J Bras Med 2008; 337: 1284-1287.

- 18-Woodman CB, Collins S, Winter H. Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection in Young Women; A Longitudinal Cohort Study. *Lancet*. 2001; 357: 1831-1836
- 19-Higgins GD, Davy M, Roder D. Increased Age and Mortality Associated with Cervical Carcinomas Negative for Human Papillomavirus RNA. *Lancet*. 1991; 338: 910-913
- 20-Barrasso R, Gross GE. Infecção por Papilomavírus Humano: Atlas clínico de HPV. 1ª Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, RS-Brasil; 1999.

## RESULTADOS E ANÁLISE DOS DADOS

**Tabela 1-** Distribuição das variáveis Idade, Tabagismo, Tipo Viral Prevalente e média da expressão da HLA-DRB1 segundo lesões intraepiteliais pelo exame citopatológico.

VARIÁVEIS	Exame Citológico				Teste de Qui-quadrado Sig. p-valor
	Baixo grau		Alto grau		
	n	%	n	%	
<b>IDADE</b>					
≤ 30 anos	50	40,7	28	26,7	<b>p = 0,027*</b>
>30 anos	73	59,3	77	73,3	
<b>TABAGISMO</b>					
Sim	108	87,8	89	84,8	p = 0,504
Não	15	12,2	16	15,2	
<b>TIPO VIRAL PREVALENTE<sup>♦</sup></b>					
<b>16</b>					
Presente	43	47,8	47	52,2	p = 0,353
Ausente	54	54,5	45	45,5	
<b>18</b>					
Presente	28	60,9	18	39,1	p = 0,136
Ausente	69	48,3	74	51,7	
<b>31</b>					
Presente	17	45,9	20	54,1	p = 0,466
Ausente	80	52,6	72	47,4	
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>51,3</b>	<b>92</b>	<b>48,7</b>	
<b>HLA – DR (alelo b)</b>					
Duas amostras Independentes (médias)	Média: 1,76 D Padrão: 0,650 ♣	Média: 1,73 D Padrão: 0,613 ♣	+t = 0,000 , g.l = 226 p = 0,699 n.s.		

(<sup>♦</sup>)PCR<sup>+</sup>, n = 189 pacientes

(♣) Igualdade de variâncias assumida

(\*) Resultados significativos, p-valor < 0,05

(+)Teste t para comparação das médias de expressão entre a imunexpressão dos marcadores HLA-DRB1 e S100

**Tabela 2:** Distribuição do tipo de HPV nas lesões intraepiteliais pelo exame citológico.

TIPO VIRAL <sup>♦</sup>	Exame Citológico						Teste de $\chi^2$
	Baixo grau		Alto grau		Total		Significância
	n	%	n	%	n	%	<b>p-valor</b>
16	43	47.8	47	52.2	90	47.6	0,353
18	28	60.9	18	39.1	46	24.3	0,136
31	17	45.9	20	54.1	37	19.6	0,466
33	4	36.4	7	63.6	11	5.8	0,306
53	6	54.5	5	45.5	11	5.8	0,826
73	7	77.8	2	22.2	9	4.8	0,171
45	1	50.0	1	50.0	2	1.1	-
56 <sup>++</sup>	-	-	1	100.0	1	0.5	-
42 <sup>++</sup>	1	100.0	-	-	1	0.5	-
51 <sup>++</sup>	-	-	1	100.0	1	0.5	-
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>53.9</b>	<b>92</b>	<b>46.1</b>	<b>189</b>	-	-

(<sup>+</sup>) Nível de significância do teste:  $\alpha = 0,05$  ou 5%

(<sup>++</sup>) Ausência de dados, não pode ser aplicado o teste de qui-quadrado.

**Tabela 3 -** Co-infecção -combinação de tipos virais.

Tipo viral co-infecção	No. Pacientes	Percentual(%)
<b>16-18</b>	<b>10</b>	<b>5,3 (59,0)</b>
16-31-33	1	0,5 (7,8)
16-31	1	0,5 (7,8)
16-53	1	0,5 (7,8)
16-56-73	1	0,5 (7,8)
18-31	2	1,1 (12,0)
31-33	1	0,5 (7,8)
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>9% (100)</b>

**Table 2.** Distribution of PCR results according to the risk level of intraepithelial cervical lesions, as determined by cytological tests, in a population of women from northeastern Brazil ( $n = 228$ )

PCR	Classificação citopatológica					
	Lesão de baixo grau		Lesão de alto grau		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
DNA-HPV						
positive	97	78.9	92	87.7	189	82.9
DNA-HPV						
negative	26*	21.1	13*	12.3	39	17.1
Total	123	100.0	105	100	228	100.0

**Table 3.** Concordância entre exame citopatológico e histopatológico determinado pelo coeficiente **Cohen's** kappa  $\kappa$

Exame Citológico de baixo grau	Exame Histopatológico						Valor estatístico
	Lesão de baixo grau		Lesão de alto grau		Total		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Lesão de	74	83.1	49	35.3	123	53.9	$\kappa = 0.448$ $P = 0.000^*$
Alto grau	15	16.9	90	64.7	105	46.1	
Total	89	100	139	100	228	100	

# CONCLUSÕES

## 6- CONCLUSÕES:

- 1- A redução estatisticamente significativa da expressão da proteína HLA-DRB1 em células de Langerhans relacionada à presença do HPV 31, sugere-nos que esta proteína possa ser alvo da ação citopática viral para evadir-se da resposta imune hospedeira.
- 2- Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da proteína HLA-DRB1 entre lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau bem como nas diferentes faixas etárias. Este achado pode ter decorrido pela elevada prevalência de HPV de alto risco oncogênico em ambas as lesões intraepiteliais e diferentes idades.
- 3- Apenas um tipo viral de baixo risco foi identificado (HPV 42). Prevalência de tipos de HPV de alto risco oncogênico foi observada inclusive em lesões de baixo grau, fazendo-nos repensar as indicações para o uso dos testes DNA-HPV, a proposta de inseri-los no rastreamento das lesões pré-cancerosas do colo uterino e o manejo preconizado para portadoras deste tipo de lesão.

# RECOMENDAÇÕES

## **7 RECOMENDAÇÕES**

A proteína HLA-DR mostra-se, nos dias atuais, como um dos alvos da imunogenética para demonstrar risco ao desenvolvimento de câncer cervical, podendo expressar variações nos genes do sistema de Antígenos Leucocitário Humano através de imunomarcadores específicos. Pesquisas voltadas para a imunogenética poderão apontar fatores de risco inerentes ao hospedeiro, provavelmente contribuindo mais que a identificação de tipos de HPV para a prevenção, diagnóstico e seguimento da terapia de lesões intraepiteliais e outras igualmente induzidas por vírus oncogênicos. As dificuldades técnicas atuais, principalmente relacionadas com os custos, poderão ser minimizadas no futuro, contribuindo para a redução das neoplasias cervicais.

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia básica**. Funções e distúrbios do sistema imune. São Paulo: Revinter, 2003.

ALVES, F.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Melhoramentos SBP, 1999.

ANDERS, A.K., et al. HLA-DM Captures Partially Empty HLA-DR molecules for Catalyzed Peptide Removal. **Nat. Immunol.** 2011. 54-61 p.

BAAK, J. P. A.; OORT, J. **A manual of morphometry in diagnostic pathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. 205 p.

BARRASSO, R.; GROSS, G.E. **Infecção por Papillomavírus Humano: Atlas Clínico de HPV**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.

BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **Methods in Molecular Biology**. 2. ed. PCR Protocols, 2003. 77-97 pp.

BELLANGER, S., et al. The Human papillomavirus type 18 E2 protein is a cell cycle-dependent target of the SCFSKp2 ubiquitin ligase. **J. Virol.**, 2010; 84(1): 437-44 pp.

BOCCARDO, E. **Mecanismos de ação do vírus e da vacina contra o HPV**. HPV News, 2011. 18-25 pp.

BODILY, J.M., et al. The E7 open reading frame acts in cis and in trans to mediate differentiation-dependent activities in the human papillomavirus type 16 life cycle. **J. Virol.**, 2011; 85(17): 8852-62 pp.

BOLPETTI, A., et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunol.**, 2010; 11:27 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil- Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer Coordenação Geral de Ações. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero/** Instituto Nacional de

Câncer. Rio de Janeiro, 2011.

BRISMAR-WENDEL S. et al. Age-specific prevalence of HPV genotypes in cervical cytology samples with equivocal or low- grade lesions. **Br. J. Cancer.**, 2009; 101(3): 511-7 pp.

BURGER J. et al. **DNA- Preservação:** um estudo de microsatélite de DNA-on antigos esqueletos. Antropologia histórica e Ecologia Humana. Instituto de Antropologia, Mainz, Alemanha, 1999; Eletroforese 20; 1722-1728 pp.

BUTTS, C.L. et al. Issue expression of steroid hormone receptors is associated with differential immune responsiveness. **Brain. Behav. Immun.**, 2011; 25(5): 1000-7 pp.

CASHION, A.K. et al. Serial analysis of biomarkers of acute pancreas allograft rejection. **Clin. Transplant.**, 2010; 24(6):214-22 pp.

CHEN, H.S. et al. Papillomavírus capsid proteins mutually impact structure. **Virology**, 2011; 412(2): 378-83 pp.

CHEONG, C., et al. Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse Langerin/ CD207. **J. Immunol.**, 2007. 48-62 pp.

CROMME, F.V., et al. MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. **Oncogene**, 1993; 8:2969-75 pp.

DE VOS VAN STEENWIJK, P.J., et al. An Unexpected Large Polyclonal Repertoire of HPV-Specific T Cells Is Poised for Action in Patients with Cervical Cancer. **Cancer Rev.**, 2010; 70(7): 2707-2717 pp.

DE JONG A., et al. CD1a-autoreactive T cells are a normal component of the human asurasnt T cell repertoire. **Nat. Immunol.**, 2010; 11(12): 1102-9 pp.

DEMAY, R.M. **The Pap Test. American Society for Clinical Pathology.** ASCP Press, 2005.

DUFRENSE S. et al. Humam papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with amplicor HPV an Hybrid Capture-2 assays for detection of high-grade lesions of the uterine cervix. **J. Clin. Microbiol.**, 2011; 49(1): 48-53 pp.

FAHEY, L. M. et al. A major role for minor capsid protein of human papillomavirus type 16 in immune scape. **J. Immunol.**, 2009; 183(10): 6151-6 pp.

FAHEY, L. M. et al. Reversal of Human papillomavirus specific T cell immune suppression through treatment of Langerhans cells exposed to human papillomavirus type 16. **J. Immunol.**, 2009b; 182(5): 2919-28 pp.

FERRARO C.T.L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **J. Bras. Med. Lab**, 2011;47(4): 451-459 pp.

FUTALAN, D. et al. Effects of oxygen levels on the physiology of dendritic cells: implications for adoptive cell therapy. **Mol. Med.**, 2011; 17(9-10): 910-6 pp.

GAO, Y.E. et al. **Expression purification and clinical application of high-risk HPV 16 E4 gene.** Zhong Nan Da Xue Bao Xue Ban, 2008; 33(8): 676-81 pp.

GERNER, M.Y.; MESCHER, M.F. Antigen processing and MHCII presentation by dermal and Tumor- infiltrating dendritic cells. **J. Immunol.**, 2009; 182(5): 2726-37 pp.

GIUSTI, A.L. **Interferências do tabaco no sistema imunitário - estado atual e perspectivas- revisão da literatura.** ConScientiae Saúde 2007; 6(1): 155-163 pp.

GONÇALVES, M.A.G.; DONADI, E.A. **Immune Cellular Response to HPV: Current Concepts** Bras Journal of Infectious Diseases, 2004; 8(1): 1-9 pp.

GOTTSCHLING M.; GÖKER M.; KÖLLER A.; LCHMAN M.D.; STCKFLETH E.; NINDL I. Cutaneotropic beta/gama- HPV types are rarely shared between family members. **J Invest. Dermatol.**, 2009; 129: 2427-2434.

HEBNER, C.M.; LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, 2006; 16(2): 83-97 pp.

HULEY SB; et al. **Delineando a Pesquisa Clínica - Uma abordagem epidemiológica.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

HU, W. et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. **Mol. Cell.**, 2010; 38(5): 689-99 pp.

HUSSAIN, S.; DELOVITCH, T.L. Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic with increase T cell costimulation and development of insulinitis. **J. Immunol.**, 2005; 174(2): 680-7 pp.

IARC. International Agency of Research on Cancer. **Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, 2007; 90:1-636 pp.

ITO, M.M.; VARGAS, S.M; SUZUKI, L.E.; MERLIN, I.C. Dimensão da participação do Papilomavírus humano (HPV) na evolução do câncer cervico-vaginal. **Rev. Bras. Anál. Clínic.**, 2010; 42(2): 127-129 p.

JENNY, G., et al. Langering expressing and CD83-expressing cells in oral líquen planus lesions - **Acta Odontologica Scandinavica**, 2007; 65; 156-161 pp.

JORGERSEN, K.W.; BUUS, S.; NIELSEN, M. **Structural properties of MHCII ligants, implication for the prediction of MHC class II epitopes**, 2010; PLoS One, 5(12): e15877.

KAPLAN, D.H. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. **Trends. Immunol.**, 2010; 31(12): 446-51 pp.

KADAJA, M.; ISOK-PAAS, H.; LAOS, T.; USTAV, E.; USTAV, M. **Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses**. PLoS Pathog, 2009; 5(4).

KWAK, K.; YEMELYANOVA, A.; RODEN, R.B. Prevention of Cancer by prophylatic human papillomavírus vaccines. **Curr. Opin. Immunol.**, 2011; 23(2): 244-51 pp.

LINS, R.D.A.U., et al. **Células Dendríticas: Origem, Distribuição, morfologia, estrutura, atividade funcional e métodos de identificação - uma revisão**. **Rev. Bras. Patol. Oral**, 2003; 2(3): 29-35 p.

LIU, X., et al. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2009; 106(44): 18780-5 pp.

MADELEINE, M.M., et al. **Comprehensive Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQ1 Loci and Squamous Cell Cervical Cancer Risk 2008** **Cancer Res**, 2008; 68 (9): 3532-3539 pp.

MARTINS, N.V.; RIBALTA, J.C.L. **Patologia do Trato Genital Inferior: Diagnóstico e Tratamento**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2005.

MITTELBRUNN, M.; et al. Undirectional transfer of microaRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nat. Commun.**, 2011; 2:282.

MONSONEGO, J. **Infecções e Doenças Genitais por HPV- Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: Ed. Revinter Ltda., 2010.

MUTO, V., et al. Human papillomavirus 16 E5 protein induces expression of beta interferon through interferon regulatory factor 1 in human keratinocytes. **J. Virol.**, 2011; 85(10): 5070-80 pp.

OHTANI, T., et al. **TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to requirement for danger signals for activation**. *Immunology*, 2009; 126(4): 485-99 pp.

OUYANG W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu. Rev. Immunol.**, 2011; 29: 71-109 pp.

PALUCKA, K. et al. Dendritic cell subsets as vector and targets for improved cancer therapy. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 2011: 344:173-92 pp.

RATNAM S. et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as hybrid capture 2 assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. **J. Clin. Microbiol.**, 2011; 49(2): 557-64 pp.

RODRIGUES, Marac; ZERIBINI, Maria Cláudia N.; BARBIERI, Dorina. Estudo imunohistoquímico da expressão HLA-DR no epitélio superficial e lâmina própria da mucosa colônica de crianças portadoras de Doença de Crohn e retocolite ulcerativa. **J. Immunol.**, 2008.

ROMANI, N.; CLAUSEN, B.E.; STOITZER, P. Langerhans cells and more: Langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. **Immunol. Rev.**, 2010; 234(1): 120-41 pp.

ROMANI, N. et al. Targeting of Antigen to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. **Immunol. Cell. Biol.**, 2010; 88(4): 424-30 pp.

ROMERO, M.L.P.; FILHO, G.L.A. **Atlas de DST e diagnóstico diferencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2002.

SANTOS, I. et al. Estudo quantitativo das Células de Langerhans em Carcinomas Basocelulares com maior e menor potencial de agressividade. **Bras. Dermatol.**, 2010; 85(2): 165-171 pp.

SANTOS, N.S.O.; VILLELA, M.T.R.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**.

2. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008.

SANKARKUMAR, U.; GHOSH, K.; BADAHERE, S.; MOHANTY, D. Novel HLA Class II alleles associated in Indian Leprosy patients. **J.Biomed.Biotech**, 2003b; 3:208-211 p.

STANLEY, M.A. Immune responses to human papilloma viruses. **Indian. J. Med. Res.**, 130; 2009; 266-276 pp.

SERRAINO, D.; PISELLI, P. Immunosuppression and cancer study group. Cancer cohort consortium approach: Cancer epidemiology in immunosuppressed group. **Methods Mol Biol**. 2009; 471: 409-19 pp.

THEPAUT, M., et al. **Biochemistry**, 2009; 48(12): 2684-98 pp.

VALLADEAU, J., et al. Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, is an Endocytic Receptor that induces the Formation of Birbeck Granules. **Immunity**, 2010; 71-81 p.

VAN DE LAAR, L., et al. Tight control of STAT 5 activity determines human CD34-derived interstitial dendritic cell and Langerhans cell development. **J. Immunol.**, 2011; 186(12): 7016-24 pp.

VILLIERS, E.M. et al. Classification of Papillomaviruses. **Virology**, 2004. 20; 324(1): 17-27.

WU, C.Y.; et al. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4+ T help and dendritic cell activation. **J. of Bio. Scienc.**, 2010; 17:88

# APÊNDICES

## Apêndice 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **Título da Pesquisa:**

Impacto do Papiloma Virus Humano sobre a ação das Células de Langerhans.

**Investigador:** Dra. Wanúzia Keyla Miranda – Departamento de Citopatologia do Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer da Paraíba – Fone (83)3218-5369.

**Justificativa:** Avaliar possíveis interferências da infecção pelo Papiloma Virus Humano (HPV) sobre as células de defesa, produzindo deficiência na resposta imune celular do hospedeiro contra a ação viral.

**Objetivos:** O estudo investiga o estado das defesas do organismo na infecção pelo HPV.

#### **Procedimentos:**

Concordando em participar deste estudo:

- \* Responderei algumas questões sobre minha história clínica. Isso levará cerca de 15 minutos.
- \* Farei uma coleta de sangue para pesquisa do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). O procedimento causa um desconforto que não dura mais que 1 minuto. Eventualmente podem ocorrer hematomas locais.
- \* Farei um exame especular e será retirado conteúdo do meu colo uterino e vagina usando uma escova, para pesquisar a presença e o tipo do Papilomavirus humano que possuo. Isso durará 5 minutos e não causará dores.
- \* Usando um aparelho (colposcópico) será observado a presença ou não de áreas anormais em colo uterino ou vagina que correspondam ao resultado do meu exame citológico.
- \* Diante de um achado colposcópico anormal, se em meu exame citológico constar lesão de baixo grau, farei a retirada indolor de pequenos fragmentos do tecido alterado, usando uma pinça específica.
- \* Mediante achado colposcópico anormal, se em meu exame citológico constar uma lesão de alto grau, será realizada a retirada da parte do colo que contém a lesão indentificada (conização), aplicando-se anestésico local. Poderá ocorrer a sensação de cólica uterina.
- \* Após a conização usarei um tampão vaginal de gase que será retirado 24 hs após o procedimento cirúrgico e receberei instruções dos cuidados devidos a serem por mim tomados (anexo 3).

**Benefícios:**

- 1- Estarei pesquisando a presença do HIV e meu perfil imune.
- 2- Estarei ciente da presença e tipo viral do HPV que possuo no momento.
- 3- Expandirei a prevenção ao câncer genital realizando colposcopia adicional ao exame citológico.
- 4- Através da biópsia ou conização, reduzirei a minha lesão, minha carga viral e estimularei minha resposta imune contra a presença do HPV.

**Riscos:**

Como a resposta cicatricial após a conização, varia para cada paciente, poderei ter: um aplanamento do colo em relação às paredes vaginais pós conização, estenose do orifício cervical externo sem visualização da junção escamo-colunar em colposcopias futuras. O aplanamento do colo, não oferece danos às avaliações, exames e gestações futuras. Contudo, técnicas utilizadas recentemente tem minimizado estes tipos de ocorrência pós cone. A coleta para citológico realizada com escova nos dá um parâmetro sobre a sanidade do epitélio endocervical caso este não seja visto em colposcopias futuras.

**Compensações:**

Estarei inserida no seguimento periódico da infecção por HPV, com avaliações citológicas e colposcópicas gratuitas realizadas no Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer do Estado da Paraíba por dois anos.

**Confidencialidade:**

Os resultados dos exames realizados e as informações do meu estado de saúde serão confidenciais, só usadas para fins de pesquisa. Minha identidade será mantida em segredo de acordo com o que a lei permitir.

**Questionamentos:**

Caso tenha perguntas adicionais poderei contatar Dra. Wanúzia Miranda pelo fone (83) 3244-7226.

**Direito de recusa ou desistência:**

Minha participação é voluntária podendo recusar ou abandonar a pesquisa, sem pôr em risco futuros atendimentos médicos que precisar.

**Consentimento:**

Concordo em participar deste estudo. Recebi cópia do presente termo de consentimento e tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas.

Assinatura do paciente

---

Impressão dactiloscópica

---

Data:

---

Assinatura do Médico

---

Testemunhas:

---

---

**Apêndice 2**

Pesquisa: IMPACTO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO SOBRE  
A AÇÃO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer da Paraíba (CDC):

**Formulário de colposcopia**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

Reg. \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

Citológico prévio:            ( ) SIM=1                            ( ) NÃO=2

Dados: \_\_\_\_\_

Colposcopia prévia:        ( ) SIM=1                            ( ) NÃO=2

Dados: \_\_\_\_\_

Biópsia cervical prévia: ( ) SIM =1                            ( ) NÃO=2

Resultado: \_\_\_\_\_

Cauterização: ( ) SIM=1                            ( ) NÃO=2

Fuma:                    ( ) SIM=1                            ( ) NÃO=2                    \_\_\_\_\_ Cigarros/dia

Medicação de uso diário \_\_\_\_\_

**EXAMES ADICIONAIS:**

Hiv positivo:            ( ) SIM=1                            ( ) NÃO=2

PCR:                      ( ) POSITIVO=1                            ( ) NEGATIVO=2

Tipo Viral                ( ) BAIXO RISCO=1                            ( ) ALTO RISCO=2

**EXAME MACROSCÓPICO:**

Colo: ( ) PEQUENO=1    ( ) MÉDIO=2    ( ) GRANDE=3    ( ) AUSENTE=4  
( ) NÃO VISUALIZADO=5

Mácula rubra:        ( ) SIM=1                            ( ) NÃO=2

Orifício cervical externo: ( ) CIRCULAR=1    ( ) FENDA TRANSVERSA=2

( ) IRREGULAR=3    ( ) PUNTIFORME=4    ( ) NÃO VISÍVEL=5

Conteúdo vaginal: \_\_\_\_\_

Quantidade: ( ) DISCRETA=1    ( ) MODERADA=2    ( ) ABUNDANTE=3

**EXAME COLPOSCÓPICO:**

Colo uterino:

Zona de transformação: ( ) TIPO I=1    ( ) TIPO II=2    ( ) TIPO III=3

Última glandula \_\_\_\_\_ Junção escamo-colunar: \_\_\_\_\_

Zona de transformação incipiente: ( ) SIM=1    ( ) NÃO=2

Epitélio escamoso em toda cérvix/vagina: ( ) SIM=1    ( ) NÃO=2

**ACHADOS ANORMAIS:**

Epitélio aceto-branco: ( ) PLANO=1 ( ) MICROPAPILAR=2 ( ) DENSO=3  
pontilhado: ( ) FINO=1 ( ) GROSSEIRO=2  
mosaico: ( ) REGULAR=1 ( ) IRREGULAR=2  
Atipia vascular: ( ) SIM=1 ( ) NÃO=2  
Área iodo negativa: ( ) SIM=1 ( ) NÃO=2

**TOPOGRAFIA:**

Margens: ( ) REGULAR=1 ( ) IRREGULAR=2  
Localização: ( ) FORA DA ZT=1 ( ) DENTRO DA ZT=2

**ACHADOS INSATISFATÓRIOS**

( ) COLO NÃO VISÍVEL=1  
( ) JEC NÃO VISÍVEL=2  
( ) ATROFIA INTENSA=3  
( ) COLPITE INTENSA=4

**ACHADOS SUGESTIVOS DE INVASÃO:**

( ) VASOS ATÍPICOS=1  
( ) DESTACAMENTO EPITELIAL ESPONTÂNEO=2  
( ) PERDAS TECIDUAIS (NECROSE)=3

CONDUTA: \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

# ANEXOS

**Anexo 1: Certidão do Comitê de Ética**

**ESTADO DA PARAÍBA**  
**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

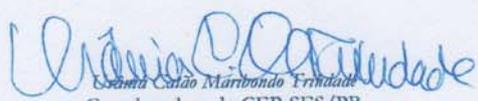
**C E R T I D ã O** **01102008**

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba - CEP/SES-PB, em sua 46ª Reunião Ordinária realizada em 30.09.2008, com base na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS que regulamenta a ética na pesquisa em seres humanos, aprovou o parecer referente ao Projeto de Pesquisa "**Impacto do Papiloma Viras Humano sobre a ação das células de Langerhans**" da pesquisadora responsável Wanúzia Keyla Miranda.

Esta Certidão é provisória, para fins de execução da referida pesquisa, ficando sob a responsabilidade da pesquisadora entregar ao CEP/SES-PB o relatório final de conclusão da pesquisa, ocasião em que será emitida certidão definitiva, nos termos das atribuições conferidas ao CEP pela Resolução já citada.

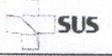
Encaminhe-se a pesquisadora interessada.

João Pessoa, 01 de outubro de 2008.



Wanúzia Keyla Miranda  
Coordenadora do CEP-SES/PB

**Anexo 2: Laudo Histopatológico Sistema Único de Saúde**

 Sistema Único de Saúde		Ministério da Saúde		<b>LAUDO PARA SOLICITAÇÃO/AUTORIZAÇÃO DE PROCEDIMENTO AMBULATORIAL</b>		11s.1/2	
<b>IDENTIFICAÇÃO DO ESTABELECIMENTO DE SAÚDE (SOLICITANTE)</b>							
1 - NOME DO ESTABELECIMENTO DE SAÚDE SOLICITANTE				2 - CNES			
MUNICÍPIO:							
3 - NOME DO PACIENTE				4 - Nº DO PRONTUÁRIO			
5 - CARTÃO NACIONAL DE SAÚDE (CNS)		6 - DATA DE NASCIMENTO		7 - SEXO		8 - RAÇA/COR	
8 - NOME DA MÃE		MASC		FEM		10 - TELEFONE DE CONTATO	
11 - NOME DO RESPONSÁVEL				12 - TELEFONE DE CONTATO			
13 - ENDEREÇO (RUA, Nº, BAIRRO)							
14 - MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA				15 - COD. DO IBGE		16 - UF	17 - CEP
<b>PROCEDIMENTO SOLICITADO</b>							
18 - CÓDIGO DO PROCEDIMENTO PRINCIPAL				19 - NOME DO PROCEDIMENTO PRINCIPAL		20 - QTDE	
				ANATOMO PATOLOGICO		01	
<b>PROCEDIMENTO(S) SECUNDÁRIO(S)</b>							
21 - CÓDIGO DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO		22 - NOME DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO			23 - QTDE		
24 - CÓDIGO DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO		25 - NOME DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO			26 - QTDE		
27 - CÓDIGO DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO		28 - NOME DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO			29 - QTDE		
30 - CÓDIGO DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO		31 - NOME DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO			32 - QTDE		
33 - CÓDIGO DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO		34 - NOME DO PROCEDIMENTO SECUNDÁRIO			35 - QTDE		
<b>JUSTIFICATIVA DO (S) PROCEDIMENTO (S) SOLICITADO (S)</b>							
36 - DESCRIÇÃO DO DIAGNÓSTICO				37 - CID 10 PRINCIPAL		38 - CID 10 SECUNDÁRIO	39 - CID ASSOCIADOS
40 - OBSERVAÇÕES							
<b>SOLICITAÇÃO</b>							
41 - NOME DO PROFISSIONAL SOLICITANTE				42 - DATA DA SOLICITAÇÃO		45 - ASSINATURA E CARIMBO Nº REGISTRO DO CONSELHO	
43 - DOCUMENTO		44 - Nº DO DOCUMENTO (CNS/CPF) DO PROFISSIONAL SOLICITANTE					
CNS		CPF					
<b>AUTORIZAÇÃO</b>							
46 - NOME DO PROFISSIONAL AUTORIZADOR				47 - COD. ORGÃO EMISSOR		52 - Nº DA AUTORIZAÇÃO (APAC)	
48 - DOCUMENTO		49 - Nº DO DOCUMENTO (CNS/CPF) DO PROFISSIONAL AUTORIZADOR					
CNS		CPF					
50 - DATA DA AUTORIZAÇÃO				51 - ASSINATURA E CARIMBO (Nº DO REGISTRO DO CONSELHO)		53 - PERÍODO DE VALIDADE DA APAC	
/ /							
<b>IDENTIFICAÇÃO DO ESTABELECIMENTO DE SAÚDE (EXECUTANTE)</b>							
54 - NOME FANTASIA DO ESTABELECIMENTO DE SAÚDE EXECUTANTE				55 - CNES			

Anexo 3: Laudo de avaliação citopatológica (SUS)

 <b>MINISTÉRIO DA SAÚDE</b>		<b>REQUISISIÇÃO DE EXAME CITOPATOLÓGICO - COLO DO ÚTERO</b>	
<i>Viva Mulher - Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama</i>			
UF	Cartão SUS		Código da Unidade de Saúde
Unidade de Saúde			
Município		Prestuária	
<b>INFORMAÇÕES PESSOAIS</b>			
Nome Completo da Mulher			
Nome Completo da Mãe			
		Apelido da Mulher	
Data de Nascimento		Idade	
Dados Residenciais			
Logradouro			
Número		Complemento	
		Bairro	
Município		UF	
CEP		DDD Telefone	
Ponto de Referência			
ESCOLARIDADE: <input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1º Grau Completo <input type="checkbox"/> 2º Grau Completo <input type="checkbox"/> 3º Grau Completo			
<b>DADOS DA ANAMNESE</b>			
1. Faz o exame preventivo (Papanicolaou) alguma vez? <input type="checkbox"/> Sim. Quando fez o último exame? ano _____ <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		6. Já fez tratamento por radioterapia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	
2. Usa DIU? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		7. Data da última menstruação / regra: _____ Não sabe / Não lembra	
3. Está grávida? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		8. Tem ou teve algum sangramento após relações sexuais? (Não considerar a primeira relação sexual na vida) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não / Não sabe / Não lembra	
4. Usa pílula anticoncepcional? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		9. Tem ou teve algum sangramento após a menopausa? (Não considerar o(s) sangramento(s) na vigência de reposição hormonal) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não / Não sabe / Não lembra / Não está na menopausa	
5. Usa hormônio / remédio para tratar a menopausa? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe			
<b>EXAME CLÍNICO</b>			
10. Inspeção do colo: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Ausente (anomalias congênicas ou retirada cirurgicamente) <input type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/> Colo não visualizado			
Data do exame		Colorido	

ATENÇÃO: Não serão processadas as cartas que não apresentem nome, idade, endereço e nome da mãe da paciente/gestante

## Anexo 4: Normas da Revista

# Instructions for Authors

**The Journal of Gynecologic Oncology (JGO)**, the official journal of the Asian Society of Gynecologic Oncology and the Korean Society of Gynecologic Oncology and Gynecology, publishes the highest quality manuscripts dedicated to gynecologic oncology. Published four times per year in March, June, September and December, the journal aims at publishing evidence-based, scientifically written articles including original articles, review articles, case reports and selected editorials.

JGO has the online submission and editorial system. Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jgo>.

Authors who are unable to submit online should contact the Editorial Office:

Journal of Gynecologic Oncology  
Asian Society of Gynecologic Oncology, Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy  
• 102-80, 55-5 Nonhyeon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-010, Korea  
• Tel: +82-2-512-5915  
• Fax +82-2-512-5421  
• E-mail: [gynonc@gyncancer.or.kr](mailto:gynonc@gyncancer.or.kr)

## Manuscript Categories

**Original article** is a paper reporting results of basic and clinical investigations, which are sufficiently well documented to be acceptable to critical readers. Maximum length of manuscript is 3,500 words of body text, excluding the abstract, references, figures, and tables. These articles are limited to 40 references.

**Review articles** are usually solicited by the Editor-in-Chief and describe concise review on subjects of importance to medical researchers. Authors who wish to submit an unsolicited review should contact the Editor-in-Chief to determine the appropriateness of their review for publication in JGO. These articles are limited to 4,500 words of body text, excluding the abstract, references, figures, and tables. The Editor also suggests a limit of 150 references.

**Case reports** as well as brief communications describe up to three cases of a particular condition that is unusual and also provides new insights into diagnosis or clinical management. Maximum length of manuscript is 1,500 words, 10 references, and up to four published pages.

**Correspondence** (Letters to the Editor) may be in response to a published article, or a short, free-standing piece expressing an opinion. If the Correspondence is in response to a published article, the Editor-in-Chief may choose to invite the article's author to write a Correspondence reply. Correspondence should be no longer than 1500 words in length.

**Editorial** is an invited perspective in gynecologic oncology, dealing on very active areas of research, fresh insights and debates.

## Editorial Policies for Authors

### Authorship

In accordance with the ICMJE, each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. All other contributors who do not meet sufficient criteria for authorship should be noted in the Acknowledgments section. The number of authors listed on the manuscript should not exceed seven for regular articles (except in the case of cooperative group or multi-center trials); five for Review Articles or Case Reports; and three for Correspondence.

### Conflict of interest

All contributors to JGO are required to disclose financial and other relationships with entities that have investment, licensing, or other commercial interests in the subject matter under consideration in their article. These disclosures should include, but are not limited to, relationships with pharmaceutical and biotechnology companies, device manufacturers, or other commercial entities whose products or services are related to the subject matter of the submission.

The conflict of interest for manuscripts may be submitted in several ways: 1) Download the form, have all authors place an official digital signature on the form, and upload it to your submission; or 2) download the form, print it out, hand sign it, scan the signed form, and upload the scanned file to your submission.

### Ethics

For clinical trials details of ethical committee approval and the type of informed consent should be stated. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used. We endorse the principles embodied in the Declaration of Helsinki and expect that all investigations involving human materials have been performed in accordance with these principles. For animal experiments it is expected that investigators will adhere to the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

### Copyright and permissions

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.

### Evidence-based medicine

JGO has incorporated specific guidelines for reporting randomized controlled trials (i.e., CONSORT), meta-analyses and systematic reviews of observational studies (i.e., MOOSE), observational studies (i.e., STROBE), studies of diagnostic accuracy (i.e., STARD), and tumor marker prognostic studies (i.e., REMARK). In your cover letter, be sure to indicate that you have followed the CONSORT, PRISMA, MOOSE, STROBE, STARD, or REMARK guidelines, as appropriate. The checklists and guidelines are available on our web site (<http://www.ejgo.org>).

### Clinical trial registration

JGO has endorsed the statement from the ICMJE that all clinical trials must be enrolled in a central registry in order to be considered for publication. This requirement will lessen the chance of publication bias by making all trials (published or unpublished) available to clinicians, investigators, and the public, even those that are negative or reflect unfavorably on a research sponsor's product.

For the policies on the research and publication ethics not stated in this instructions, 'Good Publication Practice Guidelines for Medical Journals' ([http://kamje.or.kr/publishing\\_etics.html](http://kamje.or.kr/publishing_etics.html)), or 'Guidelines on good publication' (<http://www.publicationethics.org.uk/guidelines>) can be applied.

### Manuscript Preparation Guidelines

JGO will consider manuscripts prepared in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals."

### Title page

The first page of the manuscript must contain the following information: (1) succinct title of the report; (2) author list of 7 or fewer names; (3) names of each author's institutions and indication of each author's affiliation; (4) acknowledged grants of research support; (5) name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author; (6) running head of fewer than 50 characters (including spaces); (7) list of where and when the study has been presented in part elsewhere, if applicable; and (8) disclaimers, if any.

### Abstract

Abstracts are limited to 250 words and must appear after the title page. Abstracts must be formatted according to the following headings: (1) Objective, (2) Methods, (3) Results, and (4) Conclusion. A non-structured abstract is applied to case reports. Abstract is not required for editorials or for correspondence. At the bottom of abstract page, up to six keywords should be listed to be used as index terms. For the selection of keywords, refer to Medical Subject Heading (MeSH) in Index Medicus.

### Text

Organize the manuscript into four main headings: (1) Introduction, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Discussion. Other descriptive headings and sub-headings may be used if appropriate. The body of manuscripts should be written as concisely as possible and must not exceed the manuscript category word limit its described herein. All pages of submissions should be double-spaced with a margin of 25 mm (1 inch) on every side. Line numbers should be included throughout the main body of the manuscript. Arial and Times New Roman at 10 pt size are recommended fonts for all text.

Introduction should orient the reader to the purpose of the study and should

be as concise as possible, without subheadings.

Materials and Methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Appropriate IRB or IACUC approval for the research should be obtained. Also, the statistical analysis and software programs used should be described. As for case reports, Case Report section comprising case history or case description replaces the Materials and Method section as well as Results section.

Results should present detailed description of the findings in the text and/or tables and figures. But, excessive repetition of tables and figure contents should be avoided.

Discussion should appraise implications of the findings and place them in the context of prior reports. Speculation is permitted, but it must be supported by the presented data of authors and be well founded.

#### Conflict of interest

Under a subheading "Conflict of Interest statement," all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence their work.

#### Acknowledgments

All persons who have made substantial contribution, but who are not eligible as authors are named in acknowledgments.

#### References

References must be listed and numbered after the body text in the order in which they are cited in the text. Published manuscripts and manuscripts that have been accepted and are pending publications (in press) should be cited in the reference list. When a reference is an abstract or supplement, it must be identified as such in parentheses at the end of the reference. When a reference is unpublished data, a manuscript in preparation, or a manuscript submitted but not in press, it should be included in parentheses in the body of the text, and not cited in the reference list. Abbreviation of medical periodicals should conform to those used in the latest edition of *Index Medicus* and on MEDLINE. The "List of Journals Indexed in *Index Medicus*" includes the latest abbreviations. List all authors up to six. If more than six, list the first six and add "et al."

#### Reference Style

- Journal articles with more than six authors  
Park B, Park S, Kim TJ, Ma SH, Kim BG, Kim YM, et al. Epidemiological characteristics of ovarian cancer in Korea. *J Gynecol Oncol* 2010;21:241-7.
- Book  
Hay R, Park JG, Gazdar A. *Atlas of human tumor cell lines*. San Diego: Academic Press; 1994.
- Book chapter  
Husain A, Druzin M. Cancer and pregnancy. In: Berek JS, Hacker NF, editors. *Berek & Hacker's gynecologic oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 65-4-69.
- Conference/meeting presentation  
Morrow GR, Ryan JL, Kohli S. Molecular prognostic factors in breast cancer: MASCC in tematical symposia 2006, Abstract 11-070.
- Internet resource  
*American Cancer Society. Cancer facts & figures* [Internet]. Atlanta, GA: American Cancer Society; c2011 [cited 2011 Feb 20]. Available from: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/in dex>.

#### Tables

Tables must be titled in the order in which they appear in the text using Arabic numerals. Table footnotes should be indicated with superscript symbols in sequence: \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, ††, ‡‡. The table's legend may include any pertinent notes and must include definitions of all abbreviations and acronyms that have been used in the table. Tables submitted with multiple parts will be renumbered.

#### Figures

Figures must be titled in the order they appear in the text using Arabic numerals. Figure legends should appear within the document in a separate section just before the references. Figure legends are required for all article types. All relevant and explanatory information extraneous to the actual figure, including figure part labels, footnotes, abbreviations, acronyms, arrows, and levels of magnification

in insets should be defined in the legend text. Figure legends must not exceed 55 words per figure. Formats accepted on first submission are .eps, .pdf, .tif, .jpg, and PowerPoint. Photographs (radiographs, CT/MRI scans, and scanned images) must have a resolution of at least 300 dpi. Figure parts should not have figure numbers or letters embedded in the photographs. Labels may be placed on top of the image or set outside of each part.

#### Editorial and Peer Review Process

The editor selects peer reviewers by recommendation of the Editorial Board members or from the specialist database owned by the Editorial Board.

Acceptance of the manuscript is decided based on the critiques and recommended decision of the referees. A referee's decision is made as "acceptance without revision," "acceptance after minor revision," "review after revision" and "rejection." If there is marked discrepancy in the decisions between two referees or in opinions between the author and referee(s), the Editor may send the manuscript to another referee for additional comment and recommended decision. Three repeated decisions of "review after revision" are regarded as "rejection." The reviewed manuscripts are returned back to the corresponding author with comments and recommended revisions. A final decision on acceptance or rejection for publication is forwarded to the corresponding author from the Editorial Office.

The peer review process takes usually four to eight weeks after the manuscript submission.

Revisions are usually requested to take account of criticism and comments made by referees. Failure to resubmit the revised manuscript within two months is regarded as a withdrawal. The corresponding author must indicate clearly what alterations have been made in response to the referees' comments point by point. Acceptable reasons should be given for noncompliance with any recommendation of the referees.

#### How to Submit a Manuscript

JGO has the online submission and peer review system. Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jgo>. Authors may submit manuscript and track their progress to the final decision.

#### Formatting

To facilitate the review process, manuscripts must be in Microsoft Word format (.doc). Do not reveal your identity anywhere in the document.

#### Submission

Register as a new user or log in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jgo>. At the initial screen, click on "Author Center." And then, click on the "Submit a Manuscript" link to submit a new manuscript and follow steps 1-7.

##### Step 1. Manuscript Type, Title and Abstract

Select manuscript type, and enter your title, running head, and abstract in the appropriate boxes.

##### Step 2. Classification of Manuscript

Select one or more classification(s) of the manuscript from the list.

##### Step 3. Author and Institution

Enter the co-author's information in the "Add a New Co-Author" box and click "Add to My Authors."

##### Step 4. Reviewers and Editors

To indicate the preferred or non-preferred reviewers, enter the information into the text boxes and click the appropriate designation button.

##### Step 5. Details and Comments

Attach the cover letter file by clicking "Attach this Cover Letter" or enter the content of the cover letter in the "Cover Letter" box. In addition, enter the manuscript information and answer remaining questions appropriately.

##### Step 6. File Upload

Upload and select the correct file designation for each. Main document file: *intextformat.doc* (no conflict of interest form) *intextformat.doc*. Acceptable file formats include .eps, .tif, .jpg, .pdf, and .ppt.

##### Step 7. Review and Submit

Review the pdf version of manuscript, and then click "Submit."

#### Proofs

Proof will be sent to the corresponding author via e-mail as a pdf file. The corrected proof should be returned to the publisher, preferably by email, within two days of receipt.



## Author Guidelines

*Immunology* publishes papers on fundamental aspects of immunology including: cellular immunology; innate immunity; molecular immunology; antigen presentation; lymphocyte migration; immunogenetics; imaging at the molecular, cellular or whole animal level; protein crystallography; plasmon resonance; *in silico* modeling; and, knockout and knock-in studies. Original articles describing mechanistic insights to the immune system are particularly welcome. The journal also publishes commissioned review articles on subjects of topical interest to immunologists. The editors are also prepared to consider unsolicited review suggestions in the form of submitted abstracts. *Immunology* is essential reading for workers in all areas of immunological research. Please note that excessively long manuscripts and unnecessary data will slow down the review process. Papers will be accepted for publication provided they meet these requirements and provided they have not been and will not be published elsewhere, in whole or in part.

- [Pre-submission English-language editing](#)
- [Important note before you submit](#)
- [Formatting your manuscript](#)
- [References; Word 2007; Figures and diagrams; Colour artwork; Tables; Ethical issues; Abbreviations; Display of Sequences; Human and Murine Genes; Clinical trials Registry; Microarray Databases; Data Sharing; Distribution of Reagents; CD nomenclature; SI units; Protein sequences](#)
- [Required forms](#)
- [Online submission](#)
- [Revised manuscripts](#)
- [Postal submission](#)
- [Tracking an article through to publication](#)
- [Review articles](#)
- [OnlineOpen](#)
- [Page proofs](#)
- [Offprints](#)
- [Accepted Articles](#)

**Pre-submission English-language editing.** If you are not a native English speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission. A list of companies that will edit your manuscript for a fee can be found here

[http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). Professional editing is not compulsory, but will mean that reviewers are better able to read and assess your manuscript. Use of one of these companies does not guarantee acceptance or preference for publication in this journal.

**Important note before you submit.** *Immunology* aims to publish scientific research of the highest standard, and clarity of language is of vital importance in conveying scientific meaning. Once accepted

for publication, your article will be checked by a copy editor, and may be returned to you for further editing if it is felt that the text needs further clarification prior to proofing – with resultant delays to the schedule. We therefore recommend that before submission, please ensure that your article is given a final read-through for clarity and syntax, by a colleague, or native English speaker (if possible).

**Disclosures.** For each author, disclose potential conflicts of interest, including all relevant financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding) in any company or institution that might benefit from the publication (or state 'none'). Authors do not need to report the sums concerned.

**Publication Ethics** *Clinical and Experimental Immunology* is a member of the UK Committee on Publication Ethics and subscribes to its recommendations (Committee on Publication Ethics [COPE]: guidelines on good publication practice, [www.publicationethics.org.uk](http://www.publicationethics.org.uk)). Best Practice Guidelines on Publication Ethics are also available from <http://www.blackwellpublishing.com/publicationethics/> (Graf C, Wager E, Bowman A, *et al.*, *Int J Clin Pract* 2007; **61** [suppl 152]: 126). The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds.

**Formatting your manuscript.** Manuscripts should be formatted with double spacing using a general font such as Times Roman/New Roman, Arial or Helvetica throughout; preferably with a 3-cm margin (Far Eastern/Asian fonts may create problems during PDF conversion). When adding symbols, e.g. Greek characters, the degree symbol etc. you should use the Symbol font. Alternatively, you may wish to write out any unusual characters/symbols in full. The manuscript should be prefaced by a covering page, bearing the full title of the article; a short title; name, postal and e-mail address of the corresponding author (together with the name of the institute where the work was done), and also the email address of the senior author. The paper should be divided into the following parts, in the order indicated. (1) *Summary/abstract*: this should not be longer than **250 words** (for tips on how to optimize your abstract for search engines go to <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/seo.asp>). (2) *Introduction*: this should give the reasons for doing the work, but not an extensive review of previous work in the area. (3) *Materials and Methods*: these should be concise but sufficient detail must be included to allow the work to be repeated; where appropriate, reference to previously published methodology should be made in place of experimental detail. (4) *Results*: these should be as concise as possible; the use of tables and figures to illustrate the same results will only rarely be allowed. (5) *Discussion*: this section must be used for discussion of the significance of the results only, not for reiteration of results. (6) *Acknowledgments*: must also include details of financial support. (7) *References*: see below. The author should keep a copy of his/her manuscript. The Editor reserves the right to make literary corrections. The Editor's decision concerning acceptance or rejection will normally be made approximately **30 days** after receipt of the manuscript. Appeals regarding decisions made by the Editors regarding the suitability of manuscripts for publication should be directed to the Editors. Accepted papers will normally be published online within **4–6 weeks** and in print within **2 months**.

**References.** We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>. References should be numbered sequentially as they appear in the text; those cited in figure legends and tables should be numbered according to the

position of the citation of the figure or table in the text. In the text, use superscripted numbers (with no brackets) for references, with the reference number appearing outside punctuation, but inside parentheses. The numerical list of references to articles and papers at the end of the paper should show the full title of the paper with first and last page numbers. The journal name should be abbreviated according to the system adopted by IndexMedicus. In papers with 8 authors or less, all author names should be listed. In papers with more than 8 authors, please list the first three names followed by *et al.* For example:

Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, McCloskey TW, Hosaka N, Kayagaki N, Yagita H, Pahwa S. Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J Immunol* 1997; **158**:2456–63.

Cheng J, Zhou T, Liu C *et al.* Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; **263**:1759–62.

When the reference is to a book, the following forms should be used:

Virella G, Goust JM, Fudenberg HH. *Introduction to Medical Immunology, 2nd edn.* New York: Marcel Dekker, 1990.

Specific chapter/section in book:

Kearse KP, Kaplan AM, Cohen DA. Role of cell surface glycoproteins in the formation of T-cell: APC conjugates. In: Schook LB, Tew JG, eds. *Antigen Presenting Cells: Diversity, Differentiation, and Regulation.* New York: Alan R. Liss, 1988: 221–34.

Only papers that have been published or accepted for publication (in press) should be listed in the references. Unpublished observations and personal communications should be cited as such in the text only. Work listed as 'in press' in the reference list should include the target journal.

**Word 2007.** Authors please note that Word 2007 is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Please use Word's 'Save As' option to save your document as an older (.doc) file type.

**Figures and diagrams** should be referred to as 'Figs' and given Arabic numbers. Although low-res image files embedded within the manuscript document are acceptable for review purposes, once your article is accepted it will be necessary to supply high-quality versions. For production purposes, it is best if you supply digital versions of your figures in TIFF or EPS format; however it is also possible to use Illustrator or Photoshop files saved in the format ".eps" or ".tif". Other formats such as Powerpoint or JPG may be acceptable depending on the quality. If you are unable to provide these specified formats, please provide the figures in as many different file formats as possible. As a guide, the ideal figure resolution/specification for various types of original figures, *at their final published size*, is as follows:

Line art – minimum 600 dpi, *or* a vector image with no bitmapped elements.

Halftone (i.e. both B/W and colour photographs) – minimum 300 dpi.

Line and tone (line art and halftone combined) – minimum 600 dpi.

E.g. a photograph (halftone) that will be printed at single column width, 3 inches across, should have 3900 pixels across at 1:1 resolution (this means that the figure should not be created at a smaller size and simply enlarged, it must be created at this size). As a guide, if the electronic files are viewed at 400% on the computer screen and they look pixellated in any way then they will probably not be of sufficient quality for printing.

Photographs should be well contrasted on glossy paper, and be about the same size as the finished block final published image would be. Masking instructions or lettering, arrows etc., can, if necessary be indicated on an overlay. Paper printouts are acceptable for line diagrams providing that the quality is good: the lines should be solid, the text in a standard font and not blurred, and the overall image should be sharp and clear. The author's name, manuscript number and figure number should be given on the back of each hardcopy figure. Where there is any possible doubt as to the orientation of an illustration, the top should be marked with an arrow.

Avoid using tints where possible: if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse.

Detailed information on our digital illustration standards is available at:

<http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

*Ideally, if authors have doubts about the quality of electronic figures, they should also send high-quality printed versions of the figures to the editorial office once their manuscript has been found to be acceptable for publication.* Manuscripts will NOT BE ACCEPTED and sent to the publishers until suitable quality productions files/good quality hard copies of the figures have been received by the Editorial Office.

Legends should be separate from the figures and included in the main text of the manuscript. A statement of magnification should be included for drawings and photographs. In the full-text on-line version of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of the key aspects of the figure.

**Colour artwork.** Reproducing artwork in colour in the print journal incurs a cost. Authors will be expected to pay for all aspects of the colour reproduction and should complete a colour-work agreement form after acceptance ([www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_F\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf)). However, *Immunology* offers **free colour** reproduction for all figures within a given manuscript, if a figure from that manuscript is chosen for the front cover image. Alternatively, in the event that an author is unable to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the print version of the journal, *Immunology* also offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (they will still appear in black and white in the print version). For those authors whose papers were submitted with colour figures; once your manuscript has been accepted for publication, we strongly encourage you to complete and return the colour work agreement form – even if you have decided to present your figures in black & white in the published version. The form allows you to specify black & white reproduction for all of your figures, and thus streamlines the administration associated with article processing, and reduces the possibility of error. The form, of course, also allows you to specify 'colour in print' for all, or selected, images (and indicates the associated costs); as well as free 'online only' colour reproduction for all images. If an author wishes to take advantage of the free colour-on-the-web service, or has any other questions relating to colour artwork, they should liaise with the Editorial Office ([s.tobin@immunology.org](mailto:s.tobin@immunology.org)) to ensure that any necessary documentation is completed satisfactorily for the Publisher.

**Tables** should be provided as one table per page, and should be given Arabic numbering. The approximate position in the text should be indicated. Units should appear in parentheses in the column

headings, but not in the body of the table. Both figures and tables should be comprehensible without reference to the text.

**Ethical issues.** If the work involves experimentation on living animals, authors must provide evidence that it was performed in accordance with local ethical guidelines. In the case of work involving human beings, evidence must be provided that it was performed with the approval of the local ethical committee.

**Abbreviations.** The journal recognizes the abbreviations given in the Instructions to Authors *Biochemical Journal*. Abbreviations not listed there may be used for unwieldy terms, when these occur frequently. These abbreviations and their meanings should be listed on a separate page and the list will appear as a footnote on the first page of the article.

**Display of Sequences.** Prepare sequences as figures, not tables. This will ensure that proper alignment is preserved. Submission of sequences to GenBank. Original DNA sequences reported in *Clinical and Experimental Immunology* must also be submitted to GenBank. Instructions for submission can be found at the following address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. An accession number should be supplied parenthetically at a relevant location in the text.

**Human and Murine Genes.** For human genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Nomenclature Committee. Approved gene symbols should be obtained prior to submission from the HUGO Nomenclature Committee, [nome@galton.ucl.ac.uk](mailto:nome@galton.ucl.ac.uk). For nomenclature guidelines, see White et al., 'Guidelines for Human Gene Nomenclature' [Genomics, 45, 468-471 (1997)]. The Gene Name Proposal form may be completed on the Nomenclature Web page: <http://www.genenames.org>. Use ISCN nomenclature for cytogenetics notation [Mitelman, F. (ed.) ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S. Karger, Basel]. Human gene names and loci should be written in uppercase italics and Arabic numerals. Protein products are not italicized. CD nomenclature is to be used for all cell differentiation antigens, with or without alternative names which give information about the molecule's function. Complement receptors should be named CR1 etc., followed by the correct CD terminology in parentheses: CR1 (CD35); CR2 (CD21); CR3 (CD11b, CD18); CR4 (CD11c, CD18). For mouse strain and genetic nomenclature, refer to the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: <http://www.informatics.jax.org/nomen/>. New symbols and names for genes should be obtained prior to submission through the online symbol registry form at: [http://www.informatics.jax.org/nomen/nomen\\_submit\\_form.shtml](http://www.informatics.jax.org/nomen/nomen_submit_form.shtml).

**Clinical Trials Registry.** In accordance with the guidelines published by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), *Immunology* will require, as a condition of consideration for publication, that all clinical trials be registered in a public trials registry (for example, at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Trials must register at or before the onset of patient enrollment. For more information, see [www.icmje.org](http://www.icmje.org) and go to Section III.J.

**Microarray Databases.** *Immunology* supports the efforts of the Microarray Gene Expression Data Society to standardize the presentation of microarray data, and we recommend that authors follow their guidelines and checklist (<http://www.mged.org/>

[Workgroups/MIAME/miame\\_checklist.html](#)). In addition, the journal strongly recommends the supplemental microarray data be deposited in a public database such as Gene Expression Omnibus (or GEO, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or submitted for peer-review with the initial submission of the manuscript.

**Data Sharing.** *Immunology* supports the efforts to encourage open sharing of publication-related data. *Clinical and Experimental Immunology* adheres to the beliefs that authors should include in their publications the data, algorithms, or other information that is central or integral to the publication or make it freely and readily accessible; use public repositories for data whenever possible; and make patented material available under a license for research use. For more information, see the NAS website: <http://books.nap.edu/books/0309088593/html/1.html>

**Distribution of Reagents.** The Editors of *Immunology* have adopted the policy that any readily renewable resources mentioned in a journal article not already obtainable from commercial sources shall be made available to all qualified investigators in the field. The policy stems from the long-standing scientific principle that authenticity requires reproducibility. Publication in *Immunology* constitutes a *de facto* acceptance of this policy. Included are reagents that can be easily provided; specifically, nucleic acid sequences, cDNA and genomic clones, cell lines, and monoclonal antibody clones. Small amounts (sufficient for the replication of any in vitro work reported) of novel protein reagents are also considered easily transferable.

Although the Editors appreciate that many of the reagents mentioned in *Immunology* are proprietary or unique, neither condition is considered adequate grounds for deviation from this policy. Suitable material transfer agreements can be drawn up between the provider and requester, but if a reasonable request is turned down and submitted to the Editor-in-Chief, the corresponding author will be held accountable. The consequence for noncompliance is simple: the corresponding author will not publish in *Immunology* for the following three years.

**CD nomenclature** to be used for all cell differentiation antigens, with or without alternative names which give information about the molecule's function. Complement receptors should be named CR1 etc., followed by the correct CD terminology in parentheses: CR1 (CD35); CR2 (CD21); CR3 (CD11b, CD18); CR4 (CD11c, CD18).

**SI units.** The journal recognises the adoption of the Système International d'Unités (SI units) proposed in Units, Symbols and Abbreviations (1972), published by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London, W1M 8AE. Other abbreviations should be used only for unwieldy names and only when they occur frequently. Where such non-standard abbreviations are used, a glossary should be provided.

**Protein sequences** determined by direct sequencing must be submitted to SWISSPROT (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hixton, Cambridge CB10 1SD, UK; E-mail: [data\\_subs@ebi.ac.uk](mailto:data_subs@ebi.ac.uk)), who do not provide accession numbers in advance for protein sequences that are the result of translation of nucleic acid sequences. These translations will automatically be forwarded from the EMBL nucleotide database and are assigned SWISS-PROT accession numbers on incorporation into TrEMBL. Results from characterization experiments should also be submitted to SWISS-PROT ([update@ebi.ac.uk](mailto:update@ebi.ac.uk)).

**Required forms.** Upon submission, every author is required to complete the author's declaration form ([www.blackwellpublishing.com/pdf/imm\\_author\\_declaration\\_online.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/imm_author_declaration_online.pdf)). In addition, once accepted, papers become copyright of Blackwell Publishers and authors are then required to complete an exclusive licence form ([www.blackwellpublishing.com/pdf/imm\\_elf.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/imm_elf.pdf)). Copyright licensing is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been licensed (papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement. Note that a completed colour-work agreement form ([www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_F\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf)), as referred to in the relevant section above, will also be required after acceptance.

**Online submission.** All manuscripts should be submitted online as this enables the Editorial Office to process manuscripts in the most efficient way. New manuscripts should be submitted as a single Word/RTF/PDF file containing the complete manuscript i.e. text, tables and figures. If your manuscript is subsequently found to be acceptable for publication, separate figure files of appropriate quality will be required for production purposes, as detailed in the section related to figures and diagrams above. Papers are accepted on the understanding that all of the material submitted is the property of the authors (except where due acknowledgement is given), and that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. Papers involving human subjects should receive local ethical approval and the informed consent of all subjects should be obtained. Experiments involving animals should be conducted in accordance with the relevant local legislation. Once papers have been accepted for publication they become the copyright of the Journal. To submit, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/imm> and follow the step-by-step instructions provided. Please note that it is the corresponding author's Manuscript Central Account that should be used for submission. If you require any help during the submission process you can use the online help facility provided, contact the Manuscript Central support team ([support@ScholarOne.com](mailto:support@ScholarOne.com)) or contact the *Immunology* Editorial Office (Sharon Tobin: [s.tobin@immunology.org](mailto:s.tobin@immunology.org)). Word and RTF files with the figures and tables inserted can be uploaded to Manuscript Central, as can PDF files containing the complete manuscript. Word/RTF files will be converted to a PDF upon upload to the system and it is the PDF version that will be used for review. Users of Macintosh computers should ensure that the file extension name (e.g. DOC or RTF) is present to ensure conversion to PDF files. Please ensure that the figures inserted into the Word/RTF file or included in the PDF are of suitable quality for review and that each figure is labelled with a figure number (Figure 1, Figure 2 etc). During submission, you can suggest **potential reviewers** for your manuscript. You should not propose people that are working in your institution or close collaborators elsewhere. If you refer to unpublished papers, you should upload these as additional files that are available for review.

**Revised manuscripts** should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/imm> in two formats:

- (i) A file for re-review - This should be a single file containing the text, all figures and all tables even if these were not altered during revision. All alterations made to the manuscript should be UNDERLINED/HIGHLIGHTED as this makes it easier for the referees and editors to assess the changes made. Single Word or RTF files with the figures and tables inserted can be uploaded during re-submission, as can single PDF files containing the complete manuscript as for submission of the original manuscript.
- (ii) Files for production - In order to speed publication, you should also upload separate text and figure

files for production. The text file should be a single file that contains: the text of the manuscript with all the highlighting/underlining removed; the references; tables; and figure legends. It should be in a word-processed, not PDF, format because PDF files cannot be used for production. The figures should NOT be included in this file as this can lead to errors during production. For instructions regarding the figure formats/file quality that are suitable for uploading please see the section dealing with figures and diagrams.

**Postal submission.** If you are unable to submit your manuscript online you should contact the editorial office ([s.tobin@immunology.org](mailto:s.tobin@immunology.org)) for advice. If necessary, you can send four complete copies of the text, tables and figures, along with a disk containing a word-processed file of the manuscript to:

*Immunology* Editorial Office  
British Society for Immunology  
Vintage House  
37 Albert Embankment  
London  
SE1 7TL  
UK

Please ensure that the disk version is identical to the hard copy. All revisions and corrections to the paper (including those to the references) should be made on the disk, so that the final version of the hard copy and the disk are identical. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off. Save figures on disk in as many different formats as are available to you (see the instructions in 'Figures and tables' above). Always enclose a hard copy of figures. The size and density of the disk, the nature of the software system and of the operating system (MS-DOS, CPM, etc.) must be indicated. The preferred system for this Journal is IBM compatible, using Word, but any system and disk can be handled. The filenames used must also be supplied with the disk, which itself should be labelled with the name of the first author and the first three words of the Title. Any special characters used (e.g. to indicate Greek letters, etc.) must be indicated separately. Disks will not be returned to authors. Please note that postal submissions will take longer to process than those manuscripts submitted online.

**Tracking an article through to publication.** Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production. The author will receive an email with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete email address is provided when submitting the manuscript. Visit [www.blackwellpublishing.com/bauthor](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

**Review articles** *Immunology* published review articles in all topical areas of immunological research. These are generally commissioned, but the Editor-in-Chief also welcomes unsolicited reviews and proposals. Reviews are typically between 2,500 and 3,500 words long, and generally include up to 100

references (although precise length will be dependent upon context). The inclusion of Figures and Tables is requested, with a maximum limit of four of each. For reviews colour figures may be included at no additional charge for print reproduction. Completed reviews will be assessed by an editor and/or referee prior to acceptance and publication and revisions may be requested. Please contact the Editorial Office ([s.tobin@immunology.org](mailto:s.tobin@immunology.org)) for further information.

**OnlineOpen** is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Online Journal website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of **£1300** (equivalent to **\$3000**) to be met by, or on behalf of, the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Online Journal service. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and copyright licence form available from our website at:

[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/IMM\\_OOF.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/IMM_OOF.pdf)

(Please note this form is for use with OnlineOpen material **ONLY**.) Once completed, this form should be sent to the Editorial Office, along with the rest of the manuscript materials, at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Prior to acceptance there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to.

**Page proofs** will be submitted to the contributors for minor corrections. Major alterations to the text will not be accepted. Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

**Offprints.** Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form, which accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is greater if the order form arrives too late for the main print run. Offprints are normally dispatched within three weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the following if offprints do not arrive: C.O.S. Printers Pte Ltd., 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; Email: [offprints@cosprinters.com](mailto:offprints@cosprinters.com). However, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to six weeks to arrive.

**Accepted Articles.** *Immunology* offers Accepted Articles for all articles.

**Anexo 5: Anexo da submissão**

**The combined use of polymerase chain reaction and standard cytological tests does not improve the management of low-risk intraepithelial lesions**

Journal:	JournalofGynecologicOncology
ManuscriptID:	Draft
ManuscriptType:	OriginalArticle
DateSubmittedbythe Author:	n/a
CompleteListofAuthors:	Miranda,Wanuzia;CENTEROFCANCERDIAGNOSISOFPARAIBA, CITOPATHOLOGY Lacerda,Heloisa;FederalUniversityofPernambuco,Tropical Medicine dasilva,teresinha;FederalUniversityofPernambuco,Maternaland Child Souza,Paulo;FederalRuralUniversityofPernambuco,Geneticand moleculabiology
Classificationofmanuscript:	10.030Cervicalcancer<10.000EPIDEMIOLOGY

**HPV 31 inhibits the expression of HLA DRB1 in the Langerhans cells of intraepithelial cervical lesions**

Journal:	<i>Immunology</i>
ManuscriptID:	Draft
Wiley-Manuscripttype:	OriginalArticle
DateSubmittedbytheAuthor:	n/a
CompleteListofAuthors:	Miranda,Wanuzia;CenterofCancerDiagnoses,Citopathology; Lacerda,Heloisa;FederalUniversityofPernambuco,TropicalMedicine daSilva,Teresinha;FederalUniversityofPernambuco,MaternalandChild Souza,Paulo;FederalRuralUniversityofPernambuco,MoleculaBiology andGenetic
KeyWords:	Dendriticcells,IMMUNODEFICIENCY,CANCER