

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARIA ODETE DE OLIVEIRA CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS DE LANGERHANS E ATIVAÇÃO
DE LINFÓCITOS T NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DAS LESÕES DO COLO
UTERINO ASSOCIADA À INFECÇÃO CAUSADA PELO VÍRUS DO PAPILOMA
HUMANO**

Rio de Janeiro

2016

**IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS DE LANGERHANS E ATIVAÇÃO
DE LINFÓCITOS T NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DAS LESÕES DO COLO
UTERINO ASSOCIADA À INFECÇÃO CAUSADA PELO VÍRUS DO PAPILOMA
HUMANO**

MARIA ODETE DE OLIVEIRA CARVALHO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
do Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas para obtenção do grau de
doutor em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas

Orientadoras: Dr^a Maria da Glória Bonecini
de Almeida

Rio de Janeiro
2016

MARIA ODETE DE OLIVEIRA CARVALHO

IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS DE LANGERHANS E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DAS LESÕES DO COLO UTERINO ASSOCIADA À INFECÇÃO CAUSADA PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

**ORIENTADORAS: Dr^a. MARIA DA GLÓRIA BONECINI DE ALMEIDA
Dr^a ANA TERESA GOMES FERNANDES**

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Otavio de Melo Espíndola – INI/Fiocruz (presidente)

Dr^a. Elyzabeth Avvad Portari – IFF/Fiocruz

Dr^a. Joseli Oliveira Ferreira - IOC/Fiocruz

Dr^a. Juliana Lauar Gonçalves - INI/Fiocruz (revisora)

Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos – IFF/Fiocruz

Dr^a. Monique Ribeiro de Lima – IOC/Fiocruz (suplente)

Setembro de 2016

Aos meus pais, **Djalma** (*in memoriam*) e **Creusa** que através dos “**sim**” me fizeram crescer, mas que através dos “**não**” me fizeram fortalecer.

Aos meus irmãos **Carlos Eduardo** e **Paulo Rogério**, aos agregados **Carlinhos**, **Cézar** e **Marcos** e aos meus sobrinhos e afilhados **Pedro Henrique**, **Didi**, **Gustavo**, **Julinho**, **Hugo**, **Bruno**, **Neto**, **Marcio** e **Marcos**

Obrigada

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

Aos **meus pais, Guedes e Creusa**, meu infinito agradecimento. **Obrigada** por sempre acreditarem em mim e na minha capacidade. Isso só me fortaleceu e me fez tentar ter sempre o melhor de mim. **Obrigada pelo amor incondicional!**

Aos meus irmãos **Carlos Eduardo** e **Paulo Rogério**, aos agregados **Carlinhos, Cézar** e **Marcos** e aos meus sobrinhos e afilhados **Bruno, Brenda, Pedro Henrique, Didi, Gustavo, Julinho, Hugo, Bruno, Neto, Marcio** e **Marcos Felipe**.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, **Dr^a Maria da Gloria Bonecini de Almeida**, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, profissionalismo e principalmente dedicação, mesmo nos seus momentos mais difíceis...

Um Muito Obrigado Super Especial à minha co-orientadora, **Dr^a Ana Teresa Gomes Fernandes**, pela amizade, pelas conversas, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser exemplo de profissional e de mulher batalhadora.

Agradeço a todo o pessoal do laboratório pelo carinho e atenção em todos os momentos, fossem estes difíceis ou não: Andreia Lamoglia e nossas conversas sobre nossos pais; ao **Eric** e seu vocabulário mineirês (“Nó!...”); à **Bruna**, que passou correndo, mas deixou o Octacílio com a gente; aos estagiários marcantes, **Maria Clara** e **Pedro Henrique**, apesar de recém-chegados;

Um agradecimento especial para a **Natália**, que sempre me acompanhou, minha companheira de todos os lanches, que me fez crer que o restaurante ia embora se não corrêssemos para chegar lá.

Agradeço sinceramente à coordenação do curso e às funcionárias da Pós-graduação, especialmente à **Priscila**, pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Obrigada pela ajuda!

Agradeço o carinho e a atenção dispensada pela **Dr^a Juliana Lauar**, durante o meu trabalho de pesquisa, e também enquanto revisou com toda paciência a parte escrita da minha dissertação. Guardarei para sempre os momentos que reservou para

mim, até mesmo quando o trabalho não permitia. Momentos como esse “não têm preço”.

Aos colegas **Francisco das Chagas** e **Luiz Claudio** da Anatomia Patológica do Instituto Nacional de Infectologia / Fiocruz, pela presteza, solidariedade em todas as fases das imuno-histoquímicas. Agradeço!

Ao pessoal da Anatomia Patológica do Instituto Fernandes Figueira, um carinho especial à **Nilma**, ao **Vitor** e ao **Marcelo**.

Ao **Dr Fabio Russomano** pela colaboração e pelo exemplo de profissionalismo. À **Drª Elyzabeth Avvad** pela atenção, pelo carinho e pelas longas conversas pelo WhatsApp.

Agradeço ao colega **Giordani Devitte Martins**, da Escola Nacional de Saúde Pública / Fiocruz, pelo auxílio na impressão e acabamento das figuras. O meu Muito Obrigada!

À **Dr Alcina Nicol** pela atenção e carinho dispensados, sem medir esforços, principalmente nos momentos mais difíceis. Agradeço de coração!

Aos colegas do laboratório de Micologia que sempre me apoiaram, e estiveram presentes em momentos de dificuldade.

Ao pessoal do setor de Imunodiagnóstico e a Pimenta, pelos cafezinhos e bate papos de manhã cedo.

À **Drª Monika Barth**, que sempre esteve disponível e disposta a me ajudar, a me ouvir, a me dar carona ou até mesmo pegar carona comigo (e, por que não?...) e sempre me amparou em todos os momentos. Acreditou em mim, e me fez enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma Tese, mas vidas humanas. Essa é a minha referência profissional. **Obrigada** por estar sempre ao meu lado e acreditar tanto em mim.

“O maior inimigo do conhecimento não é ignorância, mas, a ilusão do conhecimento”.

Stephen Hawking

Carvalho, MOO. Identificação da presença de células de Langerhans e a ativação de linfócitos T nos diferentes estágios das lesões do colo uterino associada à infecção causada pelo Vírus do Papiloma Humano. Rio de Janeiro, 2016. 106f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas]

RESUMO

O câncer de colo uterino, quarto tipo de tumor mais frequente na população feminina em todo o mundo, está associado à infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Contudo, a maioria das lesões cervicais associadas ao HPV regridem espontaneamente, indicando que a infecção por si só não é suficiente para a indução da carcinogênese. O sistema imune participa do controle da infecção pelo HPV, porém ainda há muito o que ser investigado sobre os mecanismos exatos que regulam as lesões neoplásicas, e subsequente desenvolvimento do câncer. Assim, o presente estudo objetivou identificar a presença de células de Langerhans (LC, CD1a⁺) e ativação de linfócitos T, induzidas pela infecção pelo HPV. O estudo incluiu 68 participantes do sexo feminino, com idade entre 18 e 50 anos. Destas, 51 apresentavam diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NIC I a III, n=17 em cada grupo) relacionadas à infecção pelo HPV, e 17 voluntárias não apresentaram lesões cervicais. A presença do HPV foi observada em 46 (90,2%) das 51 voluntárias com lesão, e no grupo controle, todas as voluntárias foram negativas. Observamos um aumento na distribuição de células TCD45RA⁺ (*naïves*) e TCD45RO⁺ (ativadas, de memória) em lesões de alto grau (NIC II e/ou NICIII) quando comparados ao grupo controle, nas regiões do epitélio e camada basal do epitélio. Em relação às LCs, nosso estudo aponta uma redução no número dessas células em lesões de baixo grau, em todas as áreas investigadas quando comparadas ao grupo controle, e de acordo com a evolução para lesões pré-malignas. Ao analisar CCL20, observamos um aumento de células expressando essa quimiocina na região do córion, conforme há aumento da gravidade das lesões. De modo inverso, observamos uma diminuição dessas células no epitélio. Em relação ao receptor de CCL20, CCR6, observamos um aumento da distribuição de células positivas na camada basal do epitélio das lesões de alto grau (NIC II e III) quando comparadas ao controle. Diante do exposto, concluímos que há redução no número de células de Langerhans na região epitelial, e que os linfócitos T migram nessa direção, em associação com os distintos graus de lesões cervicais. No entanto, esses linfócitos margeiam o local da lesão, concentrando-se no córion, indicando que o HPV possa influenciar no microambiente da lesão, alterando a expressão de quimiocinas e influenciando negativamente no recrutamento de células inflamatórias para o local de infecção.

Palavras-chave: 1. HPV. 2. CD1a⁺. 3. CCL20. 4. CD45RA⁺. 5. CD45RO⁺

Carvalho, MOO. Identification of Langerhans cells and lymphocytes activation in different stages of HPV infection-associated cervical lesions. Rio de Janeiro, 2016. 106f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas]

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer in the female population worldwide, associated with human papillomavirus (HPV) infection. Nevertheless, most of cervical lesions regress spontaneously, indicating that HPV infection is not sufficient for inducing carcinogenesis. Immune system has a crucial role in HPV infection control, however there is still much to be investigated about the precise mechanisms that regulate neoplastic lesions, and subsequent cancer development. Thus, the present study aimed to identify the presence of Langerhans cells (LC, CD1a⁺) and activated T lymphocytes, induced by HPV-infection. This study enrolled 68 women, aged from 18 to 50 years old. From these, 51 presented HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN I-III, n=17 in each group), and 17 volunteers without cervical lesion. HPV-DNA was observed in 46 (90.2%) of 51 CIN volunteers, and in all of women from control group were HPV-negatives. We observed an increase in the CD45RA⁺ (naives) cells and CD45RO⁺ (activated, memory) distribution in high-grade lesions (CIN II and/or CIN III) when compared with control group in epithelium and basal layer do epithelium. In relation to LC, our study showed a reduced number of these cells in low-grade lesions in all of investigated areas when compared with control group, in according to pre-malign lesions evolution. For CCL20 analysis, we observed an increased number of these chemokine-expressing cells in stroma area, in accordance to lesions severity. On the other hand, we observed a decrease in these cells in the epithelium. In relation to CCL20 receptor, CCR6, we observed an increase in the distribution of positive cells in the basal layer of epithelium in high-grade lesions (CIN II and III) when compared with control group. Thus, we concluded that LC and T lymphocytes migrate in direction to epithelium area, where viral infection occurs, in association with the different cervical lesions degree. However, the inflammatory cells bordering the epithelial areas, focusing in stroma area, indicating that HPV can influence the lesion microenvironmental, changing negatively the inflammatory cells recruitment to the site of infection.

Keywords: 1. HVP. 2. CD1a⁺. 3. CCL20. 4. CD45RA⁺. 5. CD45RO⁺

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Células escamosas atípicas (<i>atypical squamous cells</i>)
ASC-H	Células atípicas que não pode excluir lesões de alto grau
ASC-US	Células atípicas de significado indeterminado
CC	Carcinoma cervical
CDC	Centro de controle de doenças (<i>Centers for Disease Control</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato (<i>Deoxyribonucleoside Triphosphates</i>)
DST	Doença Sexualmente Transmissível
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HSIL	Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (<i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
HSPGs	Proteoglicanos de Heparan Sulfato (<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>)
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human papillomavirus</i>)
IC	Intervalo de Confiança
ICTV	Comitê Internacional para Taxonomia das Vírus (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
LCR	Região controladora longa (<i>long control region</i>)
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (<i>low-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
MDSC	Células supressoras de linhagem mielóide (<i>myeloid-derived suppressor cells</i>).
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
p53	Proteína de 53kD
pb	pares de base
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PNI	Programa Nacional de Imunizações

qsp	quantidade suficiente para
SBP	Sociedade Brasileira de Pediatria
TCR	Receptor de células T (<i>T cell receptor</i>)
TNM	Tamanho, Nodo e Metástase
VLP	Partículas semelhantes a vírus (<i>virus like particles</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotomicrografia eletrônica do HPV 5
- Figura 2: Representação esquemática da árvore filogenética dos gêneros e tipos de papilomavírus humanos. Os tipos comprovadamente carcinogênicos podem ser identificados pela grafia em vermelho 6
- Figura 3: Representação esquemática da organização do genoma de um Alfapapilomavirus, HPV16. O esquema exibe as regiões: LCR (regulatória); E (inicial) e L (tardia) 7
- Figura 4: Representação esquemática do ciclo de infecção de HPVs de alto risco no epitélio do colo uterino 9
- Figura 5: Representação esquemática do microambiente imunológico em infecções por HPVs. No local, pode-se observar que o HPV promove redução na apresentação de antígeno 13
- Figura 6: Ilustração de um fragmento de colo uterino (coloração HE – 4x), demonstrando as diferentes áreas estudadas: epitélio (1), subepitélio (2) e córion (3). A região perivascular não está indicada 36
- Figura 7: Análise da distribuição das células TCD45RA⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 41
- Figura 8: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CD45RA⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D). 41

Figura 9: Análise da distribuição das células TCD45RO⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. 43

Figura 10. Análise imuno-histoquímica da expressão de células CD45RO⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D) 43

Figura 11: Análise da distribuição das células CD1a⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 45

Figura 12: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CD1A⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D) 45

Figura 13: Análise da distribuição das células CCL20⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 47

Figura 14: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CCL20⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D) 47

Figura 15: Análise da distribuição das células CCR6⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 49

Figura 16: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CCR6⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D) 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Função das regiões codificantes do genoma do HPV.....	7
Tabela 2: Sequência de nucleotídeos dos primers MY09/11 e β -globina	33
Tabela 3: Marcadores imunohistoquímicos utilizados na determinação dos antígenos analisados	36
Tabela 4 - Dados clínicos e comportamentais.	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 HPV	5
2.2 Infecção e patogênese do HPV	8
2.3 Fatores de risco	10
2.4 Resposta imunológica	11
2.4.1 Resposta imune inata	13
2.4.2 Resposta imune adaptativa	19
2.4.3 Exaustão de Células T	21
2.5 Imune score	25
2.6 Vacinação profilática contra HPV	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Local do estudo	30
4.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	30
4.3 Desenho do estudo e Casuística	30
4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão do estudo	31
4.4 Obtenção de fragmentos de tecidos de colo uterino	31
4.5 Avaliação das variáveis clínico comportamentais	32
4.6 Identificação da presença do HPV pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
4.6.1 Extração do DNA	33
4.6.2 PCR	33
4.7 Avaliação da presença de células de Langerhans e da expressão do receptor CCR6, células TCD45RA e TCD45RO pela técnica de imuno-histoquímica	35
4.8 Quantificação das células positivas	36
4.9 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38

5.1 Casuística e dados clínico comportamentais	38
5.2 Identificação da presença do HPV através da reação da polimerase em cadeia nos diferentes grupos estudados	41
5.3 Identificação de células T CD45RA ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical	41
5.4 Identificação de células T CD45RO ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical	43
5.5 Identificação da presença de células CD1a ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical.....	45
5.6 Identificação da expressão de CCL20 nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical.....	47
5.7 Identificação da presença de células CCR6 ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical	49
5.8 Correlação da distribuição de células TCD45RA ⁺ e TCD45RO ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical	51
5.9 Correlação da distribuição de células TCD45RO ⁺ e CCL20 ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical	51
5.10 Correlação da distribuição da expressão de células CD1a ⁺ e CCL20 ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical...	51
5.11 Correlação da distribuição da expressão de células CCR6 ⁺ e CCL20 ⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical...	52
6 DISCUSSÃO	53
7 PRINCIPAIS ACHADOS	59
8 CONCLUSÃO	60
9 BIBLIOGRAFIA	61
10 ANEXOS	81
10.1 Calendário Vacinal 2015	81
10.2 Calendário Nacional de Vacinação 2016 – Recomendação	82
10.3 Calendário Nacional de Vacinação 2016 – NOTA EXPLICATIVA	83
10.4 Informações sobre a vacina utilizada pelo Ministério da Saúde....	84
10.5 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	85

10.6 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes HPV positivas atendidas no Ambulatório de Patologia Cervical do Instituto Fernandes Figueira	87
10.7 Questionário	91

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero, ou câncer cervical, é o quarto tipo de tumor mais frequente na população feminina em todo o mundo (CONG *et al.*, 2015; MOERMAN-HERZOG & NAKAGAWA., 2015). No Brasil, há uma estimativa para o ano de 2016, de 16.340 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

As verrugas genitais causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) são descritas desde a Antiguidade. Contudo, os primeiros relatos da origem infecciosa do câncer de colo uterino ocorreram a partir da segunda metade do século passado (MEISELS *et al.*, 1977). Mais tarde, o advento das técnicas de biologia molecular e o crescente interesse da comunidade científica revelaram a infecção pelo HPV como condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical (MUNOZ, 2000; Zur HAUSEN, 2009).

Até o momento, mais de 200 tipos de HPV são reconhecidos, e cerca de 40 apresentam tropismo específico para a mucosa anogenital (UM *et al.*, 2011; MONGELOS *et al.*, 2015). Destes, 15 tipos estão relacionados às neoplasias intraepiteliais de alto grau e aos cânceres invasivos e, desta forma, são considerados como de alto risco oncogênico (MONGELOS *et al.*, 2015). Sendo, portanto, associado com o desenvolvimento de lesões precursoras de câncer e do carcinoma cervical (UM *et al.*, 2011). Todavia, a maioria das pacientes, que apresentam a infecção pelo HPV, não evolui para uma condição maligna da doença, sugerindo que outros fatores podem ser necessários para a ocorrência de transformação neoplásica.

Cientistas buscam arduamente os mecanismos exatos que favorecem a carcinogênese e o subsequente desenvolvimento de lesões neoplásicas relacionadas a esse grupo viral. Porém, a carcinogênese é um processo que ocorre em múltiplas etapas, que podem ser morfológicamente categorizadas em lesões precursoras (neoplasias intraepiteliais cervicais – NICs), envolvendo a expressão de oncoproteínas virais, capazes de alterar os mecanismos do ciclo celular (MÜNGER *et al.*, 2004; DOORBAR, 2012).

A presença destas oncoproteínas altera o comportamento das células de Langerhans (LC), células apresentadoras de antígenos (APC) predominantes na epiderme, que existem de forma abundante no local em que se inicia a infecção pelo HPV (HUBERT *et al.*, 2005; DELIGEOROGLOU *et al.*, 2013). Estudos sugerem que o comportamento dessas células pode apresentar-se alterado, com a distribuição diminuída dessas células em acordo com o aumento da gravidade das lesões causadas pelo HPV (HIBMA *et al.*, 2012; JIANG & XUE, 2015). Isso pode ser explicado pelo fato da oncoproteína E6 inibir diretamente a expressão de E-caderina em queratinócitos, fator necessário para adesão das LCs em tecidos epiteliais. Desta forma, a redução do número de LCs pode resultar da perda da capacidade de adesão destas células aos queratinócitos (MATTHEWS *et al.*, 2003; HUBERT *et al.*, 2005).

A regulação do recrutamento de LCs por células epiteliais para a mucosa é controlada pela expressão da quimiocina CCL20 (DIEU-NOSJEAN *et al.*, 2000; TOHYAMA *et al.*, 2001). Esta é uma proteína de 70 aminoácidos, e é uma potente molécula quimioatrativa para LCs em mucosas via receptor CCR6 (BABA *et al.*, 1997). Em níveis basais a expressão de CCL20 modula a migração de LCs e linfócitos de memória, e o exacerbar de sua expressão durante a inflamação pode influenciar no aumento da migração destas células (SCHUTYSER *et al.*, 2003). Portanto, identificar a presença de CCL20 nas lesões pré neoplásicas do colo uterino poderá ser uma ferramenta útil no acompanhamento das pacientes que apresentam infecção pelo HPV.

CCR6, receptor constitutivamente expresso em órgãos linfóides e não linfóides, pode servir como mediador da ligação das respostas inespecíficas e adaptativa em LCs, pois estas células reduzem a expressão de CCR6 após captação antigênica (FRICK *et al.*, 2016). A presença de CCR6⁺ em células TCD8⁺ indicam um subtipo com fenótipo de memória, que participam da imunidade de mucosa e possuem habilidade para migrar em resposta a CCL20 (KONDO *et al.*, 2007). CCR6 tem função importante na migração de Th17 para o ambiente intratumoral (WANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2015) e ocorre principalmente pela via CCR6-CCL20 (YU *et al.*, 2015). No câncer cervical e em lesões pré-neoplásicas, há aumento desta população evidenciando um pior prognóstico (ZHANG *et al.*, 2011). Sendo assim, o CCR6 pode ser um potencial marcador prognóstico indireto

da presença de células inflamatórias. Portanto, avaliar a expressão de CCR6 em lesões causadas pelo HPV na cérvix uterina poderá acarretar maior entendimento no prognóstico de pacientes com lesões pré-malignas.

A ativação das células T requer a transdução de sinais de distintas moléculas da família CD45, uma tirosina fosfatase transmembranar, expressa em todas as células nucleadas hematopoiéticas (ALTIN & SLOAN, 1997). Em células T, a molécula CD45 indica diferentes estágios de maturação e ativação e, as isoformas CD45RA e CD45RO estão expressas em células T *naives* (virgens) e células T ativadas, respectivamente. Dessa forma, determinar a presença de células T, com a utilização de marcadores do tipo CD45RA/CD45RO, em tecidos que apresentam alterações decorrentes de evolução tumoral, em conjunto com a comprovação da presença do CCR6 poderá servir de auxílio na observação da resposta imunológica de pacientes que apresentam os diferentes estágios de lesões do colo uterino.

Estudos suportam a forte associação existente entre carcinogênese e progressão neoplásica relacionada ao HPV e ao sistema imunológico. Porém, os verdadeiros mecanismos que impulsionam a resposta imune contra as lesões relacionadas a esses vírus são pouco conhecidos, mas acredita-se que podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico ou à composição genética do hospedeiro (SCHIFFMAN & WENTZENSEN, 2013).

Sendo assim, temos como hipótese que a infecção pelo HPV modula negativamente a migração de células inflamatórias na região cervical, influenciando a progressão de lesões pré-malignas. Tivemos como objetivo principal estudar a presença de LCs e células T CD45RA⁺ e TCD45RO⁺ em lesões de colo uterino de mulheres infectadas pelo HPV, bem como avaliar a distribuição de células expressando a quimiocina CCL20 e seu receptor CCR6, responsáveis pela migração celular para as lesões. A realização deste trabalho poderá contribuir fundamentalmente com o conhecimento da resposta imune celular local e, potencialmente, no prognóstico das lesões malignas e pré-malignas do trato genital feminino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HPV

Os HPVs são vírus não envelopados, compostos de ácido nucleico do tipo DNA circular de fita dupla, organizado em aproximadamente 7900 pares de bases, envolvidas por 72 subunidades proteicas, denominadas capsômeros, medindo em torno de 55nm de diâmetro. A simetria icosaédrica, apresentada pelas partículas virais, justifica a morfologia esférica observada em microscopia eletrônica (Figura 1) (BOSCH *et al.*, 2013; MORSHED *et al.*, 2014).

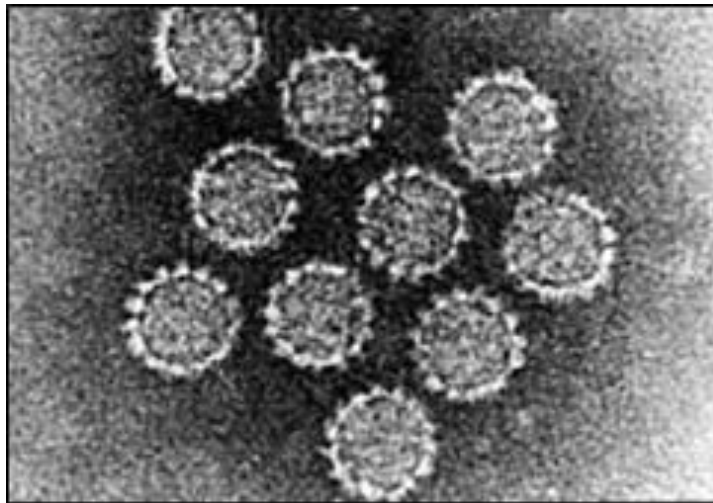


Figura 1: Fotomicrografia eletrônica do HPV (CATROXO *et al.*, 2013).

De acordo com o Comitê Internacional para Taxonomia das Virose (ICTV - do inglês – *International Committee on Taxonomy of Viruses*), os diversos tipos de HPV estão inseridos na família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*. A família é composta por 12 gêneros, porém, apenas os alfa, beta, gama, mu e nu são capazes de causar infecção humana (BERNARD *et al.*, 2010; EGAWA *et al.*, 2015), e estão representados na Figura 2.

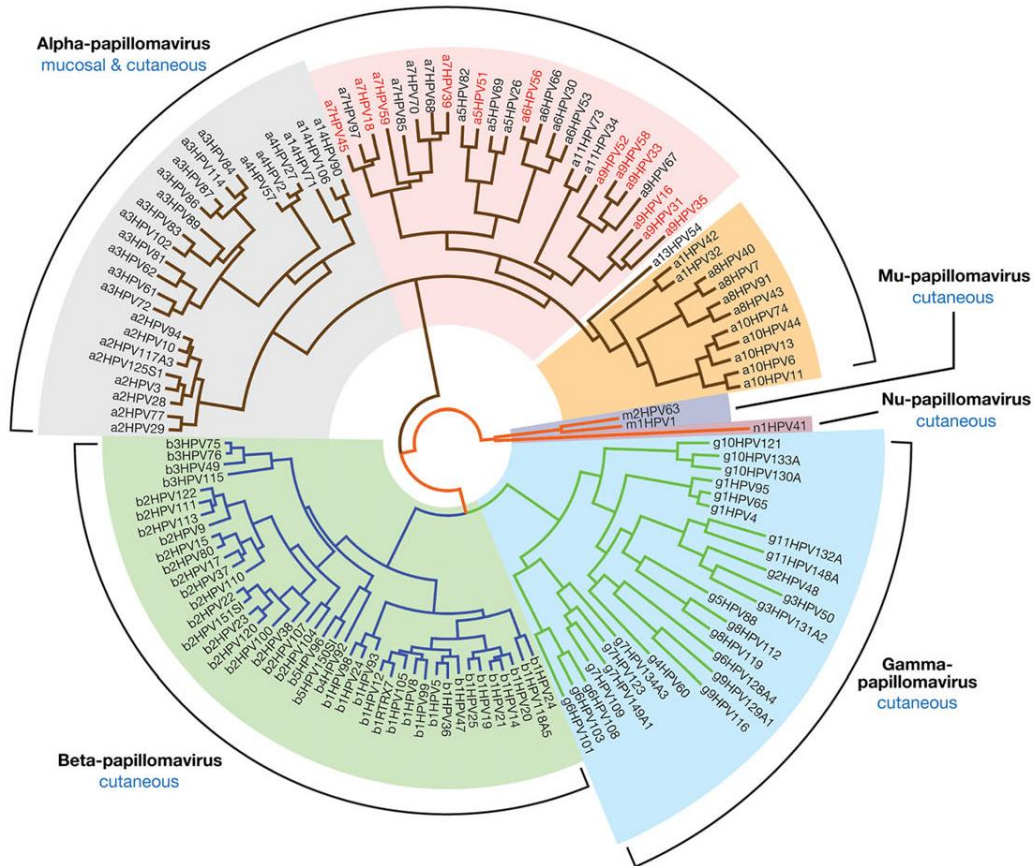


Figura 2: Representação esquemática da árvore filogenética dos gêneros e tipos de papilomavírus humanos. Os tipos comprovadamente carcinogênicos podem ser identificados pela grafia em vermelho (DOORBAR et al., 2015).

Os HPVs capazes de infectar mucosas podem ainda ser classificados quanto ao potencial oncogênico, sendo agrupados em alto risco os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 59, em baixo risco os tipos 6, 11, 40, 44, 57, 61, 70, 72, 81, 83 e 89. Enquanto, os tipos 26, 42, 43, 53, 54, 66, 67, 68, 69, 73, e 82 são considerados de risco indeterminado (QUINT *et al.*, 2015). Os tipos de alto risco estão fortemente associados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas.

O genoma dos HPVs encontra-se organizado em 3 segmentos, reconhecidos como E (do inglês, *Early*) ou inicial, L (do inglês, *Late*) ou tardia e região LCR (do inglês, *Long Control Region*) ou controladora (Figura 3). A região E é formada por 7 proteínas (E1 – E7), envolvidas na replicação do ácido nucleico viral, no controle da transcrição e em transformação celular. Enquanto a região L é composta pelas

proteínas estruturais, L1 e L2, envolvidas na formação do capsídeo viral, e os elementos essenciais para estimulação da expressão inicial dos genes virais, logo após infecção, estão representados na região LCR, que se localiza entre as regiões E e L (MORSLED *et al.*, 2014, Tabela 1).

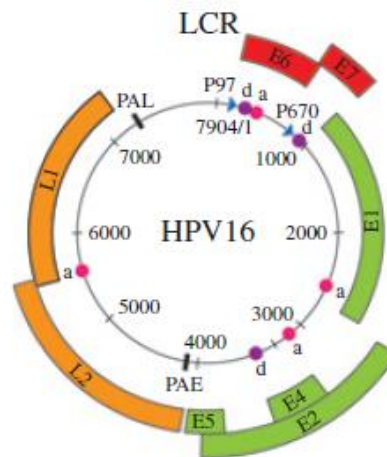


Figura 3: Representação esquemática da organização do genoma de um Alfavirapilomavírus, HPV16. O esquema exibe as regiões: LCR (regulatória); E (inicial) e L (tardia) (QUINT *et al.*, 2015).

Tabela 1: Função das regiões codificantes do genoma do HPV.

Região	Função
E1/E2	Codificam as proteínas responsáveis pelo controle dos genes E6 e E7;
E4	Codifica proteína de função ainda desconhecida; segundo alguns autores pode estar envolvida na liberação do vírus pelas células;
E5	Codifica proteína hidrofóbica, responsável pelo aumento do tempo de vida da célula hospedeira;
E6	Codifica proteína que inibe negativamente os reguladores do ciclo celular e o fator de transcrição, p53, bloqueando apoptose;
E7	Codifica a proteína viral que se liga à proteína supressora de tumor, pRb, permitindo que a célula siga com o ciclo celular;
L1/L2	Codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral.

2.2 Infecção e patogênese do HPV

Os HPVs possuem a capacidade de causar infecção nos diversos sítios corporais, sendo reconhecidos em regiões como conjuntiva, canais auditivos e cavidade oral, sendo mais prevalente no trato genital (CHOW *et al.*, 2010). Esses vírus possuem a capacidade de causar lesões no epitélio da pele e das mucosas, associadas às diversas manifestações clínicas, que podem variar de verrugas comuns a verrugas da região anogenital denominadas condilomas, ou ainda, a epidermodisplasia verruciforme e os papilomas de laringe. As infecções podem permanecer subclínicas, ou tornar-se ativas e induzir lesões epiteliais hiperproliferativas do tipo benignas, pré-malignas e/ou malignas (cânceres genitais).

Na região anogenital, o risco de desenvolvimento de câncer está amplamente associado à persistência da infecção pelos tipos de HPV de alto risco e com a desregulação da expressão gênica do hospedeiro, acarretando massiva proliferação celular, deficiência no reparo do DNA, e acúmulo de dano genético na célula infectada (DOORBAR *et al.*, 2012).

O ciclo de propagação do HPV é intimamente ligado ao processo de diferenciação de queratinócitos. A entrada do vírion ocorre devido a micro rupturas do tecido epitelial, habitualmente causadas pelo ato sexual, que possibilitam o alcance viral às camadas mais basais do epitélio, e permitem a entrada de partículas virais infecciosas nas células em estado de proliferação. Geralmente, essa infecção ocorre na zona de transformação (ZT) do colo uterino, também conhecida como junção epitélio escamo-colunar (JEC), onde o vírus alcança diretamente células mucosas em estágio de proliferação (CULP & CHRISTENSEN, 2004; DOORBAR, 2006; CHEN *et al.*, 2011).

Ao serem infectadas, as células tornam-se reservatórios e o HPV passa a utilizar a maquinaria protéica da célula hospedeira. Nessa mesma fase, as proteínas E1 e E2 são expressas a fim de manter o DNA viral na forma episomal, e garantir a segregação do genoma do HPV às células hospedeiras descendentes, de maneira tal que pelo processo de estratificação do epitélio, essas células atinjam as camadas mais superficiais (DOORBAR, 2006; DOORBAR *et al.*, 2012).

Em epitélio normal, ao atingir a camada intermediária, as células entram no processo terminal de diferenciação que acarreta a parada do ciclo celular, onde acontecem alterações na produção de lipídeos e em filamentos de queratina permitindo a formação da barreira natural do epitélio. Nos casos em que ocorrem lesões intraepiteliais de baixo grau, as células infectadas da camada basal são estimuladas a produzir as proteínas virais E6 e E7. Estas, por sua vez impulsionam a divisão celular, através da interação com proteínas que participam dos mecanismos de controle do ciclo celular, como p53 e pRb. Portanto, o aumento da expressão de E6 e E7 está fortemente relacionado com o desenvolvimento da neoplasia (MELSHEIMER *et al.*, 2004; DOORBAR *et al.*, 2012).

Quando infectadas, as células na camada intermediária do tecido, aumentam a expressão de proteínas necessárias à amplificação do genoma viral. Essas células apresentam expressão da proteína E4, e entram na fase S ou G2 do ciclo celular. Quando atingem a camada mais superficial do epitélio, as células com alta expressão de E4, passam a expressar as proteínas L1 e L2, que compõem o capsídeo, permitindo assim, o empacotamento do genoma viral (Figura 4 - DOORBAR, 2006; DOORBAR *et al.*, 2012).

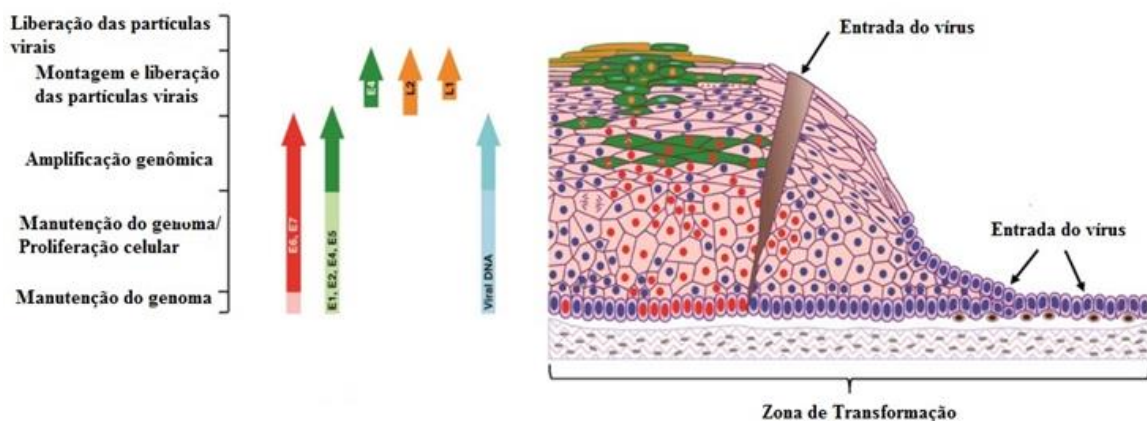


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de infecção de HPVs de alto risco no epitélio do colo uterino. (Adaptado de DOORBAR *et al.*, 2012).

As proteínas E6 e E7 dos tipos virais de alto e baixo risco oncogênico apresentam características distintas em relação ao desenvolvimento de neoplasias, dificultando a generalização do papel que representam nas infecções pelo HPV (DOORBAR *et al.*, 2012 - Figura 4). Estas proteínas estão associadas ao

desenvolvimento do carcinoma cervical, principalmente pela inativação de duas proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb, respectivamente, que participam da regulação do ciclo celular e mantêm a estabilidade genômica (DOORBAR *et al.*, 2012).

2.3 Fatores de risco para o desenvolvimento dos lesões do colo uterino

Pesquisas indicam que mais de 90% das infecções por HPV no colo uterino são eliminadas espontaneamente em 3 anos, enquanto 10% tornam-se persistentes, e menos de 1 % evoluem para o câncer cervical (SASSAGAWA *et al.*, 2012). Estes resultados tornam evidente a necessidade de estudos que possam esclarecer as diferenças entre mulheres que apresentam, ou não, lesões de colo uterino e o comportamento da infecção pelo HPV. Sendo assim, pesquisadores descrevem sobre a influência de fatores genéticos, imunológicos e sócio comportamentais que possam acarretar essas divergências (GRITZ *et al.*, 2005; ALAM *et al.*, 2008; LUHN *et al.*, 2013). Entre estes, os mais estudados são o uso de contraceptivo oral, multiparidade e tabagismo (HINKULA *et al.*, 2006).

A identificação do uso de contraceptivo oral como fator de risco na formação de lesões cervicais, e conseqüente evolução para carcinogênese cervical recebe influência de outros fatores. O período de tempo que o contraceptivo foi utilizado, bem como o tempo de cessação deste fator parecem ser importantes (WANG *et al.*, 2009). Apesar disso, em estudo recente, o uso de contraceptivo oral foi apontado como um fator de risco reduzido para progressão de lesões, entre as participantes que apresentam persistência de lesões associadas à infecção pelo HPV (JENSEN *et al.*, 2013).

A multiparidade está entre os fatores de risco para a carcinogênese cervical em mulheres portadoras de infecção pelo HPV (HINKULA *et al.*, 2006). Há indicações de que o número de células metaplásicas na zona de transformação aumenta durante a gravidez, e na fase imatura do desenvolvimento essas células são mais suscetíveis a infecção pelo HPV, e posterior progressão para o câncer cervical (MUNOZ *et al.*, 2002; HINKULA *et al.*, 2006).

O hábito de fumar é considerado importante fator de risco na carcinogênese cervical. Pesquisas revelam que o tabagismo pode contribuir com a formação de lesões intraepiteliais cervicais, e consequente desenvolvimento de câncer, em mulheres HPV positivas (XI *et al.*, 2009; ROURA *et al.*, 2014). Acredita-se ainda, que o tempo de duração deste hábito bem como a intensidade, também são fatores relevantes (CASTELLSAGUE & MUNOZ, 2003). O tabaco está relacionado com alterações do sistema imune que incluem redução do número de células T e LCs, bem como baixo nível de imunoglobulinas e desregulação da produção de citocinas que participam da resposta inflamatória (FONSECA-MOUTINHO, 2011).

2.4 Resposta imunológica à infecção pelo HPV

Reconhecidamente, a participação do sistema imune no controle das infecções causadas pelo HPV é de valor fundamental. Demonstrar os mecanismos exatos que regulam o crescimento do tumor e subsequente desenvolvimento de lesões neoplásicas relacionadas ao HPV, vem sendo alvo de diversos grupos de pesquisa. O processo de carcinogênese está diretamente relacionado à expressão de oncoproteínas virais, principalmente, E6 e E7. Em conjunto, essas proteínas são capazes de alterar os mecanismos do ciclo celular, interagindo e modificando a expressão de proteínas celulares como as supressoras tumorais e aquelas responsáveis pela manutenção e controle do ciclo celular (MÜNGER *et al.*, 2004; DOORBAR *et al.*, 2012).

A imunidade protetora resulta da interação da imunidade inata e adquirida. O sistema imune inato reconhece moléculas que não são normalmente encontrados em mamíferos, tal como o tecido danificado, a superfície repetitiva, estruturas de paredes celulares bacterianas, ou sequências de DNA contendo motivos típicos de sequências virais. Essas estruturas são reconhecidas através de receptores semelhantes ao *Toll* (TLR, *toll like receptors*) (AKIRA *et al.*, 2006; KAWAI *et al.*, 2010). Os TLRs fazem parte de uma família de receptores imunológicos que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, em inglês), estes ativam vias de sinalização importantes nas respostas inata e adaptativa. Os TLRs endossomais desenvolvem um papel no reconhecimento de ácidos nucleicos

virais, TLR3 reconhece RNA de fita dupla, TLR7 e TLR8 RNA de fita simples e TLR9 DNA de fita dupla (PRINCE *et al.*, 2011).

Os queratinócitos fazem parte do sistema inato e são considerados células sentinelas (NESTLE *et al.*, 2009). Eles agem como células apresentadoras de antígenos não profissionais e são capazes de induzir a expressão de citocinas Th1 e Th2, bem como respostas citotóxicas em células T CD4⁺ e CD8⁺. (BLACK *et al.*, 2007). Os queratinócitos no trato genital expressam TLR em superfície celular (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 e TLR-6) ou em endossomos (TLR3 e TLR9) (NASU *et al.*, 2010). A ativação desses receptores promove a produção de citocinas pró-inflamatórias (TAKEDA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; SANGHAVI *et al.*, 2005). Em queratinócitos, resulta na produção de TNF- α , IL-8, CCL2, CCL20, CXCL9 e IFN-I (LEBRE *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2007). O HPV induz modificações no local de sua infecção, acarretando uma diminuição de sua apresentação antigênica as células competentes, como forma de evasão do sistema imune (STANLEY, 2012). Além disso, o vírus é capaz de modular a resposta inflamatória, inibindo a ativação e a migração de LC, e evasão de DC para o córion. Há relatos de que queratinocitos adjacentes à lesão cervical possuem um perfil pró-inflamatório (Figura 5, AMADOR MOLINA *et al.*, 2013).

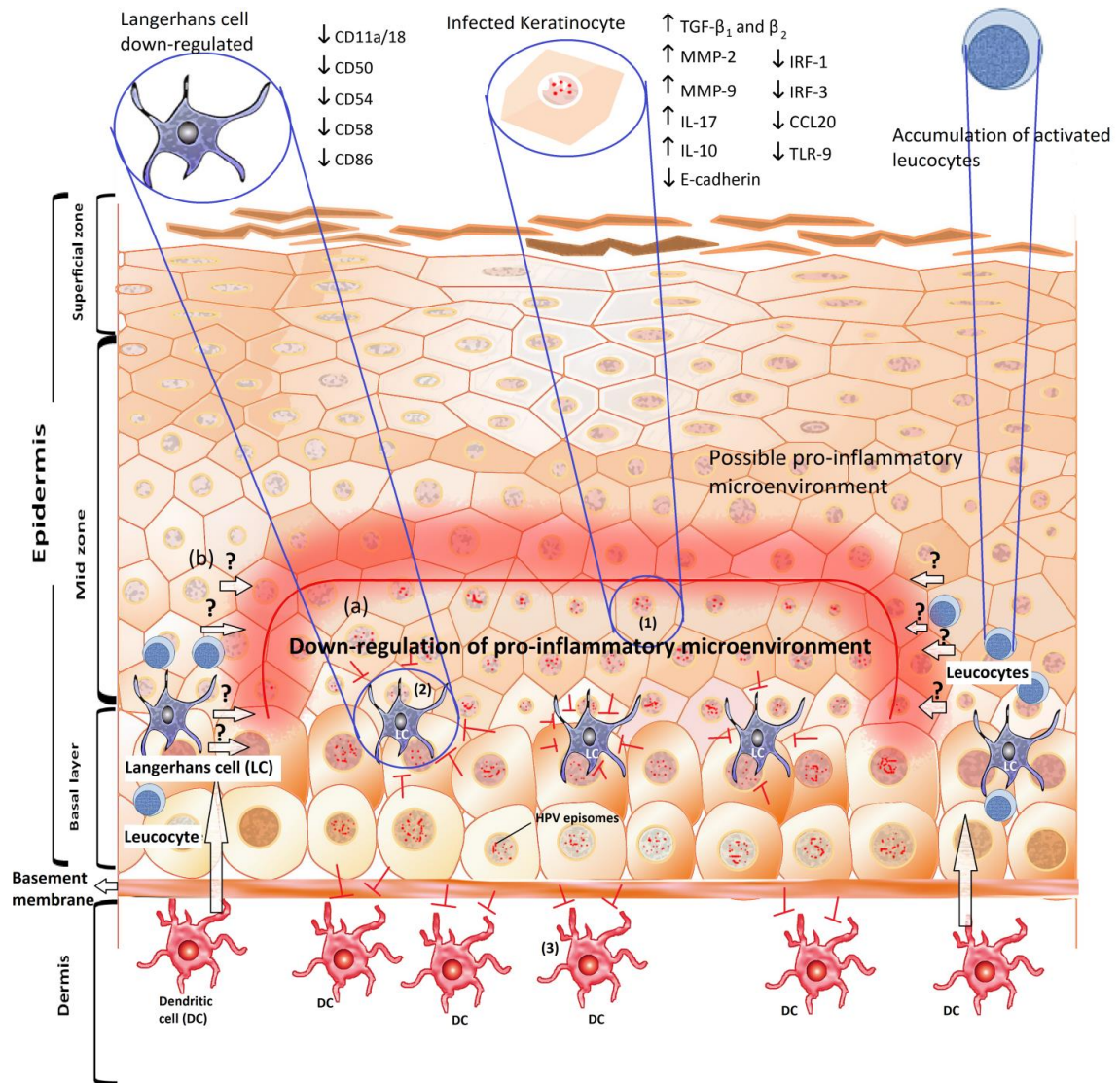


Figura 5: Representação esquemática do microambiente imunológico em infecções por HPV. No local, pode-se observar que o HPV promove redução na apresentação de antígeno (AMADOR-MOLINA *et al.*, 2013).

2.4.1. Resposta imune inata

Durante as fases iniciais da infecção pelo HPV, a resposta imune inata possui um papel importante no controle das lesões do colo uterino. Células *natural killer* (NK), *natural killer T* (NKT), DCs, LCs, bem como queratinócitos, estão envolvidos na indução de resposta imune adaptativa eficiente contra a infecção por HPV. No entanto, o HPV pode escapar da resposta imune, principalmente através da ação das oncoproteínas E6 e E7. O longo período observado entre a infecção inicial e o

desenvolvimento de câncer causado pelo HPV aponta a capacidade desse vírus de evadir o sistema imune. O ciclo de infecção é caracterizado por ausência de viremia, baixa replicação do genoma e produção de proteínas virais, ausência de inflamação e ciclo replicativo não lítico, o que limita os sinais que ativam a resposta imune do hospedeiro. A resposta imune contra o HPV geralmente é pouco eficiente, pois, no início da infecção, o vírus permanece confinado às células basais do epitélio, protegido das células circulantes do sistema imunológico, em estado de baixa replicação de proteínas virais (STANLEY, 2006). A associação entre o controle da resposta imune celular, mediada principalmente por células T e a infecção pelo HPV, está no aumento da incidência, prevalência e persistência desses vírus, em indivíduos infectados pelo HIV-1, nos quais o aumento da suscetibilidade à infecção e diminuição da habilidade de eliminar o HPV estão associados à imunossupressão (PALEFSKY, 2009).

As células NK representam uma barreira importante e um componente-chave do sistema imune inato. Estas células têm a capacidade de reconhecer e eliminar células infectadas por vírus por meio de dois mecanismos: a citotoxicidade dependente de grânulos; e a via de apoptose em células alvo (SUTLU & ALICI, 2009). A atividade dessas células é rigidamente controlada por meio de um equilíbrio entre receptores inibitórios e ativadores (BRYCESON & LONG, 2008). Os receptores de citotoxicidade, NKp30 e NKp46, são encontrados em baixos níveis em células NK de pacientes com câncer do colo uterino e suas lesões precursoras, diminuindo, assim a atividade citotóxica destas células (GARCIA-IGLESIAS *et al.*, 2009).

Outro importante receptor que está relacionado com a citotoxicidade é o NKG2D. Este está envolvido na lise celular através da interação com as proteínas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe de cadeia relacionada-IA (MICA, em inglês). Ambos, NKG2D e MICA, são modulados na presença do HPV. Além disso, os níveis de MICA livres no soro aumentam com a progressão das lesões do colo do útero e o câncer, sugerindo que ele seja um fator que possa contribuir para a persistência do HPV ou a progressão do tumor (ARREYGUE-GARCIA *et al.*, 2008). Em linhagens de células NK (NKL), a expressão do receptor NKG2D é diminuída quando estas células são cultivadas com linhagens de queratinócitos infectadas pelo HPV, HeLa e SiHa. (JIMENEZ-PEREZ *et al.*, 2012).

Macrófagos são considerados células efetoras do sistema imune envolvidas na resposta primária a patógenos, homeostasia de tecidos normais e apresentação de antígenos, seguido de injúria ou infecção. Possuem interação bidirecional com linfócitos e outras células do sistema imune inato (MOSSER & EDWARDS, 2008; BISWAS & MANTOVANI, 2010; HAO *et al.*, 2012). Os macrófagos são originários de monócitos, e podem se diferenciar em dois tipos distintos, M1 e M2, dependendo do microambiente em que se encontram.

Por ação de citocinas do tipo Th1 (tais como IFN- γ), há uma polarização para o fenótipo M1, caracterizado por liberar citocinas pro-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, intermediário reativo de oxigênio e nitrogênio, alta expressão de MHC II, apresentação microbicida e tumoricida. Por outro lado, citocinas de Th2, IL-4, IL-13 e IL-10 e glicocorticoide, induzem a presença de M2, caracterizado pela baixa expressão de IL-12 e a alta expressão de IL-10, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), capacidade deficiente de apresentação antigênica, baixa atividade tumoricida, aumento na angiogênese e remodelamento tecidual, facilitando o crescimento e invasão tumoral (SOLINAS *et al.*, 2009; BISWAS & MANTOVANI, 2010).

M2 são conhecidos também como macrófagos associados a tumor (TAM, em inglês), e podem promover a migração e proliferação de células cancerígenas, angiogênese e restrição das defesas imunes (HAMES *et al.*, 2007). Durante a progressão das lesões neoplásicas, o número dessas células aumenta consideravelmente (LEPIQUE *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstram que há correlação entre células com esse perfil e o aparecimento de lesões de alto grau induzidas pelo HPV (BERMUDEZ-MORALES *et al.*, 2008; BOLPETTI *et al.*, 2010).

Em epitélio escamoso as LCs estão situadas nas camadas mais basais e intermediárias, onde assumem importante papel imunológico contra infecções virais e tumorais, e possuem a função de apresentar antígenos e ativar linfócitos (UCHIMURA *et al.*, 2005). As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são expressas nas camadas basais do epitélio, onde estas células são mais abundantes, e, portanto, altos níveis dessas proteínas afetam a função da E-caderina sobre os queratinócitos locais, diminuindo desta forma a quantidade das LCs (MATTHEWS *et al.*, 2003).

Conhecidas como células apresentadoras de antígeno profissionais (APC), as células de Langerhans (LC) são caracterizadas pela capacidade de captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T. Normalmente, distribuídas entre as células do epitélio estratificado da epiderme, cavidade oral, esôfago, córnea, vagina e cérvice uterina perfazendo aproximadamente 2% a 3% do total de células nucleadas locais, onde atuam como sentinelas do sistema imunológico, e representam, portanto, a primeira barreira imune contra patógenos invasores (VILLABLANCA & MORA, 2008; SERÉ *et al.*, 2012). As LCs imaturas constituem a principal população de APCs do microambiente cervical, onde formam uma rede contígua através da extensão epitelial desempenhando a função de capturar antígenos e estimular células T (MILLER, 2007). Estas células em estado ainda imaturo circulam no sangue periférico e após o processamento de antígenos e expressão diferencial de marcadores de superfície, migram para órgãos linfóides periféricos onde encontram as células T (GUESS & MCCANCE, 2005; MILLER, 2007).

As LCs são móveis, de vida longa, e caracterizam uma população presente na epiderme desde os estágios mais iniciais do desenvolvimento fetal. Durante o processo evolutivo, estas células gradualmente conquistam os marcadores próprios da linhagem, e aqueles que revelam a distinção da população de DCs (MIZUMOTO & TAKASHIMA, 2004; MERAD *et al.*, 2008; ROMANI *et al.*, 2012). Entre estes, os grânulos de Birbeck, organelas intracitoplasmáticas cuja verdadeira função ainda permanece obscura, demonstram ser uma particularidade única de LCs humanas e murinas (MERAD *et al.*, 2008).

A população de LCs na epiderme pode ser rapidamente identificada pela expressão do marcador de células hematopoiéticas, CD45 (LY5), e da molécula MHC II, característico de APCs e que garante apresentação antigênica às células TCD4⁺. Constitutivamente, expressam uma molécula para adesão aos queratinócitos, a E-caderina (ou CDH1), que impede a maturação espontânea de células em estado quiescente, e se liga a CD103, uma integrina também expressa em células T. Além da E-caderina, as LCs se aderem às células epiteliais através da EpCAM (do inglês, *Epithelial-cell adhesion molecule*, também reconhecida como, TACSTD1) (MIZUMOTO & TAKASHIMA, 2004; MERAD *et al.*, 2008).

Após capturar e processar o antígeno na região epidérmica, principalmente através da molécula CD1a, as LCs garantem a responsabilidade de passar essa informação às células T, sendo o receptor CD1a importante na apresentação de antígenos de origem lipídica (MIZUMOTO & TAKASHIMA, 2004; MERAD *et al.*, 2008). Para isso, estas células se dissociam dos queratinócitos, acarretando a liberação de citocinas como o TNF- α , interferindo na atividade da E-caderina e facilitando a passagem através da membrana basal e subsequente direcionamento para a derme (OUWEHAND *et al.*, 2010).

As mucosas vaginal e ectocervical são ricas em LCs (MILLER, 2007). A migração das LCs é regulada pela expressão de quimiocinas e seus receptores de maneira sequencial e diferencial (OUWEHAND *et al.*, 2008). As LCs transitam do microambiente periférico para os órgãos linfoides secundários, sítio favorável à ativação de linfócitos *naive* (VILLABLANCA *et al.*, 2008). Esse processo de migração das LCs é facilitado pela perda gradual da capacidade de processamento de antígenos aliada à aquisição da atividade de apresentação às células T (CUMBERBATCH *et al.*, 2000).

Grânulos de Birbeck consistem de organelas citoplasmáticas encontradas exclusivamente em LCs, mas que apresentam função ainda pouco compreendida. Apesar disso, grande parte dos estudos consideram esses grânulos, fragmentos de membrana, integrantes de um retículo endossômico constituente de uma estrutura tubular que participa ativamente do processamento e apresentação de antígenos (ZAVALA *et al.*, 2002; VERDIJK *et al.*, 2005; MERAD *et al.*, 2008). Pesquisadores aceitam que a formação desses grânulos ocorre em consequência da captura de antígenos pela langerina, por revelar uma rota de acesso antigênico (MERAD *et al.*, 2008). As moléculas de CD1a e langerina presentes na superfície de LCs depositam os antígenos capturados nos grânulos de Birbeck (MIZUMOTO & TAKASHIMA, 2004).

Uma série de alterações induzidas pela interação de quimiocinas e seus respectivos receptores orquestram o recrutamento e saída das LCs na epiderme (CUMBERBATCH *et al.*, 2000). Constitutivamente expressa em células epiteliais da cérvix uterina, a quimiocina CCL20 possui função importante na homeostasia de mucosa. Sua expressão encontra-se fortemente aumentada na presença de

citocinas inflamatórias e fatores derivados de células T (GIANNINI *et al.*, 2002; SCHUTYSER *et al.*, 2003). Adicionalmente, pesquisadores revelam a participação desta quimiocina no recrutamento de células T e LCs para o sítio inflamatório (GUESS *et al.*, 2005; LE BORGNE *et al.*, 2006). Em ambiente tumoral, a positividade para CCL20 parece estar proporcionalmente relacionada à presença de LCs, devido ao seu receptor CCR6, e a sua redução está associada com o aparecimento de lesões cervicais de alto grau relacionadas às infecções pelo HPV (SCHUTYSER *et al.*, 2003; JIANG & XUE, 2015).

Após a captura de antígenos, há uma diminuição na expressão de CCR6, e um aumento concomitante de CCR7, receptor para as quimiocinas CCL19 (MIP-3 β) e CCL21 (6CKine), presentes em linfonodos (CUMBERBATCH *et al.*, 2000; OUWEHAND *et al.*, 2008). Enquanto isso, CCR6, único receptor para a quimiocina CCL20 (MIP-3 α), é negativamente modulado após a maturação das LCs. Em células T, CCR6 tem importante função na migração de células T após ativação, quando diminuem a expressão de CCR7 e passam a CCR6 (BERARD & TOUGH, 2002; KONDO *et al.*, 2007). De modo semelhante aos outros receptores de quimiocina, CCR6 também está envolvido na mobilização do cálcio intracelular, entretanto, diferentemente do observado em quimiocinas e receptores, este é o único receptor para CCL20 (SCHUTYSER *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2014).

A participação deste receptor de quimiocina já foi importantemente comprovada tanto em processos inflamatórios quanto na homeostasia do sistema imune (LEE *et al.*, 2013). LCs que apresentam CD1a, langerina e CCR6 migram em resposta a CCL20, quimiocina produzida por queratinócitos (BARBAROUX *et al.*, 2006; VILLABLANCA *et al.*, 2008). Em células T, quimiocinas e seus receptores também apresentam papel fundamental no recrutamento das diferentes populações celulares comprovadamente, CCR6 é indispensável na migração de Th17 para o ambiente intratumoral (YU *et al.*, 2015).

LCs que apresentam CD1a, langerina e CCR6 migram em resposta a CCL20, quimiocina produzida por queratinócitos (BARBAROUX *et al.*, 2006; VILLABLANCA *et al.*, 2008). Sendo assim, a expressão de quimiocinas e receptores também se revelam essenciais na migração de LCs e células T para locais de infecção (GIANNINI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005; ROY *et al.*, 2014).

2.4.2 Reposta imune adaptativa

Após a fase de desenvolvimento intratímico, células T maduras imunologicamente *naïves* são liberadas na corrente sanguínea, em baixo número de cópias. O reconhecimento do antígeno apropriado em associação com os sinais co-estimulatórios em APCs direciona estas células *naïves* à proliferação e diferenciação, quando passam a ser denominadas efetoras (BERARD & TOUGH, 2002; BEVAN *et al.*, 2011). Este é o processo de ativação de células T, realizado com a participação do receptor de células T (TCR) e outras moléculas de superfície celular (ALTIN & SLOAN, 1997).

Os mecanismos envolvidos na geração de células T de memória ainda estão por ser desvendados. Sabe-se que a etapa inicial de uma resposta imune, denominada fase de ativação, é marcada pela expansão clonal de células T reagentes ao antígeno que adquirem receptores próprios para tecidos periféricos, atividade citotóxica e aumentam a secreção de citocinas efetoras (TANEL *et al.*, 2009). Quando a infecção se resolve, reter uma função efetora poderia acarretar um processo inflamatório prejudicial ao organismo. Sendo assim, grande parte destas células efetoras morre por ativação da apoptose, induzida pela depleção de fatores de crescimento, ocasionando a redução da população de células antígeno específicas e revelando a sobrevivência de apenas uma pequena porção destas, como célula de memória (BERARD & TOUGH, 2002; TANEL *et al.*, 2009).

A molécula CD45 é essencial para a ativação de células T e B por fazer a mediação do contato entre células e regular quinases envolvidas na transdução de sinal (JACOBSEN *et al.*, 2000). As células *naïves* expressam as moléculas CD45RA, CCR7, os receptores co-estimulatórios CD27 e CD28 (TANEL *et al.*, 2009). A isoforma CD45RA é uma tirosina fosfatase gerada pelo splicing diferencial de exons extracelulares (A, B e C). As células T *naïves* expressam altos níveis das três isoformas, entretanto, ao serem ativadas as perdem, e passam a ser reconhecidas fenotipicamente como CD45RO (BERARD & TOUGH, 2002).

Ao serem ativadas recebem a denominação de células efetoras, e são direcionadas através das vênulas endoteliais altas (HEVs) para os tecidos periféricos. Para isso, são auxiliadas pela expressão de CD62L, que faz o rolamento destas células através das HEVs e CCR7, que promove a adesão firme destas células em linfonodos (SALLUSTO *et al.*, 1999). Ambos os receptores são necessários na migração de células T para os órgãos linfoides secundários (CAMPBELL *et al.*, 2001). As células *naives* expressam altos níveis dessas moléculas enquanto as células de memória perdem essa expressão (BERARD & TOUGH, 2002).

Receptores, como o CCR7 participam da localização de células T *naives*, e de memória central em linfonodos, outro grupo de receptores, irão garantir a chegada, adesão e migração destas células em tecidos periféricos (FAGIN *et al.*, 2012). O CCR6, que tem a quimiocina CCL20 como seu único ligante é expresso principalmente em linfócitos maduros e em células de memória (KONDO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014). O CCR6 mais frequente em células TCD4 do que entre as TCD8 é também expresso em DCs imaturas, mas ausente em DCs terminalmente diferenciadas (KONDO *et al.*, 2007).

A diferença entre as populações de células T *naive* e de memória em infecções pelo HPV já foi observada. Williams e colaboradores (2002) observaram um estímulo de células T de memória em PBMC (*Peripheral blood mononuclear cell*) de pacientes saudáveis quando estimulados com partículas *virus-like* (VLP) da região L1 do HPV11.

Sendo assim, a expressão de quimiocinas e seus receptores pelos linfócitos T podem alterar a frequências de populações celulares com perfil *naive* ou de memória no sítio de infecção, modulando a resposta a diversos microrganismos. Foi demonstrado que células Th17 expressam CCR6 e são produtoras de CCL20, e que desta forma favorecem a progressão do câncer colorretal (GHADJAR *et al.*, 2009). Frequência aumentada da população de Th17 também foi comprovada no câncer cervical (YU *et al.*, 2015). Determinar a presença de subpopulações de células T, com perfis CD45RA/CD45RO, recém-chegadas à áreas de lesões cervicais neoplásicas, aliada à presença de células CCR6+ e a CCL20; poderá auxiliar a compreensão da resposta imune cervical em pacientes infectadas pelo

HPV e possibilitar a identificação de novos marcadores de prognóstico para o câncer cervical.

2.4.3 Exaustão de células T

O controle e aperfeiçoamento da função imune celular tem o auxílio de moléculas co-inibitórias e co-estimulatórias que atuam como reguladores críticos da imunidade adaptativa (ODORIZZI & WHERRY, 2012; MARRACO *et al.*, 2015). Células T efetoras que entram no ambiente tumoral possuem função e fenótipo regulados por uma complexa rede imunossupressora, composta de células cancerígenas, células inflamatórias e citocinas. Estes componentes direcionam as células T terminais a se diferenciar em células T exaustas, um comportamento inicialmente descrito após a exaustão de células TCD8 vírus-específicas e sua deleção, que ocorre em infecções crônicas. Este processo foi também comprovado em populações de células TCD4 (FULLER & ZAJAK., 2003; GOLDEN-MASON *et al.*, 2009; YI *et al.*, 2010; BAITSCH *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2015). O processo é caracterizado como a perda gradual e progressiva das funções de células T que pode culminar com a eliminação das células respondedoras (YI *et al.*, 2010). Esse mecanismo de exaustão, mantém o controle da resposta imune celular, levando ao estabelecimento da persistência viral. Sendo, portanto, um mecanismo tanto benéfico para o hospedeiro quanto prejudicial. Visto que ao mesmo tempo que protege da exacerbação de resposta, minimiza o potencial de controle da infecção (KAHAN *et al.*, 2015).

A exaustão de células T já foi documentada em infecções virais e tumorais, e em cada um destes casos, as células após estimuladas, iniciam uma sequência progressiva de alterações funcionais e fenotípicas (WHERRY *et al.*, 2003; YI *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2015). Entretanto, essa evolução do estado de exaustão não ocorre de modo aleatório, e as primeiras características são alteração da capacidade de proliferação, e das funções efetoras, como citotoxicidade e secreção de citocina em resposta a estimulação antigênica (JIANG *et al.*, 2015; KAHAN *et al.*, 2015; KAHAN *et al.*, 2015). O processo é gradual com a perda da função

citolítica, seguida inicialmente pela extinção da capacidade de produzir IL-2 e perda de produção de TNF- α na fase intermediária, enquanto em estágio mais avançado há privação da capacidade de produção de IFN- γ e granzima B (JIANG *et al.*, 2015; YI *et al.*, 2010).

Em estado de exaustão, as células T passam a exibir um fenótipo alterado, com altos níveis de receptores inibidores (iRs, *inhibitory receptors*), proteínas de membrana que transmitem sinais de inibição para o interior das células após ligação aos respectivos ligantes (BAITSCH *et al.*, 2012). Entre estes, destacam-se o gene 3 de ativação linfocitária (LAG-3, *lymphocyte-activation gene 3*, ou CD223), o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, ou CD152), a proteína de morte celular programada 1 (PD-1, *Programmed cell death-1*, ou CD279) e o domínio de mucina e imunoglobulina de célula T (TIM-3, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), como revisto por JIANG *et al.*, 2015.

LAG-3 é uma proteína transmembrana estruturalmente similar à molécula CD4 presente em células T, que além de ser expressa em células T ativadas e em processo de exaustão, já foi observada em células B, células NK e em DC plasmocitóide (KISIELOW *et al.*, 2005; GOLDBERG & DRAKE, 2014; SEGA *et al.*, 2014). É um marcador que atua no controle da função de células T efectoras, sendo desta forma, considerado um receptor inibidor de células T (KAHAN *et al.*, 2015). LAG-3 está envolvido na modulação do fluxo de cálcio associado ao TCR, e diminuição da proliferação e produção de citocina (KAHAN *et al.*, 2015). Assim, LAG-3 tem participação na regulação da expansão de células T ativadas em células antígeno específicas bem como em tumores (WORKMAN & VIGNALI, 2005; GROSSO *et al.*, 2007; SEGA *et al.*, 2014). Enquanto o bloqueio de LAG-3 induz a expressão de CD69 em células TCD4 e TCD8, e estimula a expansão de células T e produção de citocinas Th1 em células T em repouso (MAÇON-LEMAITRE & TRIEBEL, 2005). Porém, a participação na exaustão de células T parece mesmo ocorrer em cooperação com outro receptor inibidor (RICHTER *et al.*, 2010).

CTLA-4 é uma proteína transmembrana com função de receptor inibidor, que possui sequência homóloga ao CD28 principal molécula coestimulatória na ativação inicial de células T. Porém, a expressão de CD28 é constitutiva, enquanto

o CTLA-4 não é expresso em células *naive*, e possui avidéz maior para a molécula B7-2 (SANSOM, 2000; KIM *et al.*, 2016). A ligação de células T *naive* à molécula B7-2, presente em APC, estimula as células antígeno específicas à sobrevivência e expansão, no entanto, após ativadas ocorre aumento da expressão de CTLA-4, que se ligarão à B7-2 com maior avidéz (KIM *et al.*, 2016). Sendo assim, CTLA-4 torna as células T *naive* menos sensíveis ao estímulo pelas APCs, e limita a produção de IL-2, citocina que ativa a proliferação de células T (SANSOM, 2000).

PD-1 é uma proteína transmembrana, presente na superfície de células T, células T natural killer, monócitos e células B (KEIR *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2015). Assim como o CTLA-4, PD-1 também compartilha homologia de sequência com o CD28, e atua como receptor inibidor de células T (ZHONG *et al.*, 2004; KIER *et al.*, 2008). PD-1 possui dois ligantes, PD-L1 e PD-L2, que atuam de maneira co-inibitória (OKAZAKI & HONJO, 2007). PD-L1 está presente em células T, células B, DCs, macrófagos, células endoteliais e células das ilhotas pancreáticas onde atua na proteção de tecidos periféricos em processos inflamatórios. Enquanto PD-L2 é mais restrito, sendo expresso apenas em DCs e macrófagos e tem como função principal regular a iniciação ou polarização de células T (HE *et al.*, 2015). A interação PD-1:PD-L atua na regulação negativa do sistema imune de modo bem semelhante ao CTLA-4 (KIM *et al.*, 2016). Essa via de inibição reduz a apoptose de células T ativadas, facilita a anergia e exaustão de células T, aumenta a função de células T regulatórias, inibe a proliferação de células T, restringe produção de IL-2 e reduz a memória imunológica de longo prazo por impedir a conversão de células de memória efetora em células de memória central (HE *et al.*, 2015). Sendo assim, mantém a tolerância periférica explorada por tumores e vírus que causam infecção crônica para fugir da resposta imunológica (RIELLA *et al.*, 2012).

O TIM-3 é uma proteína transmembrana, expressa em células TCD4 que secretam interferon-gama (IFN- γ), células TCD8, T natural killer (NKT), Th17, NK, macrófagos/monócitos e DCs (ANDERSON, 2014; TIEU *et al.*, 2014; OCANA-GUZMAN *et al.*, 2016). Porém, TIM-3 pode ser observado em concentração reduzida em células T *naive*, enquanto PD-1 é expresso em células de memória efetora, e LAG-3 em estágio mais avançado de ativação (MARRACO *et al.*, 2015). TIM-3 tem como receptor a galactina-9, e a ligação Gal-9:TIM-3 sinaliza regulação negativa da sobrevivência e função de células T (KIM *et al.*, 2015).

Desta forma, os mecanismos inibidores participam como integrantes da homeostase imunológica, atuando na minimização de danos colaterais durante a resposta inflamatória prolongada, na manutenção da auto-tolerância periférica e na auto-imunidade. Além de limitar a atividade de células efetoras, especialmente células T (TIEU *et al.*, 2014).

No ambiente tumoral, células T exaustas expressam níveis elevados de receptores inibidores e reduzida produção de citocinas e atividade citolítica, revelando falha na eliminação do cancer (JIANG *et al.*, 2015). Relatos recentes, indicam que exista ampla participação destes receptores inibidores em células tumorais (LI *et al.*, 2016). A realização destes estudos permitiu a observação de que existe correlação da abundância de células TCD8 e a expressão de receptores inibidores, e que pesquisas subsequentes poderão servir de auxílio na identificação de alvos terapêuticos de diferentes tipos de cancer (LI *et al.*, 2016).

No cancer cervical, esses marcadores de células T exaustas estão sendo extensivamente estudados, sendo demonstrado que há associação de TIM-3 com promoção de metástase, e pobre prognóstico no cancer cervical (CAO *et al.*, 2013; MARRACO *et al.*, 2015). PD-L1 encontra-se elevado de modo significativo em células tumorais e inflamatórias do cancer cervical (MEZACHE *et al.*, 2011).

2.5 Imune score

O advento da Biologia Molecular revelou inúmeras alterações genômicas que podem ser identificadas no câncer. Com base nestas observações, outras características foram adicionadas ao conceito de câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Sendo assim, a avaliação do ambiente tumoral tornou-se um importante mecanismo diagnóstico, e originou o conceito do *immune score*, metodologia utilizada para quantificar o infiltrado imunológico *in situ* (KIRILOVSKY *et al.*, 2016).

No ambiente tumoral todos os tipos de células imunes podem ser encontradas (GALON *et al.*, 2012). Desta forma, a análise criteriosa da localização, densidade

e orientação funcional destas diferentes subpopulações celulares em tumores humanos é um instrumento útil na identificação de componentes que podem atuar em benefício do hospedeiro (GALON *et al.*, 2007; FRIDMAN *et al.*, 2012). Portanto, analisar os marcadores tumorais, junto à resposta imune ao tumor poderá auxiliar tanto na determinação do comportamento tumoral quanto no estabelecimento de biomarcadores (OGINO *et al.*, 2011).

A análise histopatológica de tumores humanos tem fornecido características do contexto imune tumoral, e revela a heterogeneidade de populações funcionais de células imunes que estão presentes nas diferentes áreas de um tumor, indicando que podem desempenhar papéis distintos no controle do tumor (FRIDMAN *et al.*, 2012). Em geral, os macrófagos, mastócitos, granulócitos e células supressoras mielóide derivadas (MDSC - *myeloid-derived suppressor cells*) são encontrados infiltrando ou circundando o leito tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2008). DCs imaturas estão dispersas na área do core, em contato com células tumorais ou no estroma circundante, e tornam-se maduras nos locais em que há concentração de células T *naives* (DIEU-NOSJEAN *et al.*, 2008). Células NK são vistas no estroma, mas sem contato com células tumorais. As células T, particularmente do tipo CD8, encontram-se distribuídas na margem invasiva e no core (FRIDMAN *et al.*, 2012). Enquanto, as células B são normalmente observadas na margem invasiva e nas adjacências do leito tumoral (DIEU-NOSJEAN *et al.*, 2008).

O *immune score* é a investigação da existência de correlação entre populações celulares presentes no contexto imune com a significância clínica, e propõe a análise de cada região tumoral para fornecer informações sobre a patofisiologia tumoral e o prognóstico provável (FRIDMAN *et al.*, 2012; KIRILOVSKY *et al.*, 2016). Em acordo com o demonstrado em tumores de colon, a presença de células T CD3/ CD4⁺ ou CD8⁺ e células T CD45RO de memória foi associada a bom prognóstico (revisto por KIRILOVSKY *et al.*, 2016). Sendo assim, o *immune score* tem como base a contagem de dois marcadores, tanto na região do core tumoral quanto nas margens invasivas. Em seguida essas contagens são organizadas em alta e baixa densidade em cada região, classificando os pacientes de acordo com um valor de *cutoff* pre determinado (GALON *et al.*, 2012).

2.6 Vacinação profilática contra o HPV

A vacinação é o método de maior sucesso, e eficácia no controle de doenças infecciosas em termos de custo e efetividade. Duas vacinas profiláticas foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos: a vacina bivalente Cervarix™ (HPV2, GlaxoSmithKline) para prevenção dos HPV's tipo 16 e 18; e a quadrivalente Gardasil (HPV4, Merck Sharp & Dohme) para HPV tipos 6, 11, 16 e 18. Estas vacinas usam vetores que expressam o gene L1 do vírus, que foram usados com sucesso para gerar partículas semelhantes a vírus (VLP - *virus-like particles*), e induzem títulos elevados de anticorpos específicos. Ambas protegem contra infecções e, indiretamente contra o câncer cervical, causados pelos HPV's 16 e 18, responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical no mundo (EINSTEIN *et al.*, 2009).

Hoje, no Brasil, estas duas vacinas contra o HPV estão comercialmente disponíveis, sendo a vacina quadrivalente aprovada em 2006 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Na posologia são necessárias três doses intramusculares (IM): 0 dias, 60 dias e 180 dias. O Programa Nacional de Imunizações (PNI) adotou a partir de 2014, o esquema de vacinação estendido: 0, 6 e 60 meses, tendo como público alvo, adolescentes do sexo feminino na faixa etária entre 11 a 13 anos de idade. Em 2015 a faixa etária passou a ser de 9 a 11 anos, e, posteriormente, em 2016 o PNI passou a disponibilizar para as meninas de 9 a 13 anos (ANEXOS 1, 2 e 3).

Atualmente, a vacinação é realizada em 2 doses, com intervalo de 6 meses entre a primeira e a segunda dose (0 e 6), e com a recomendação de não administrar a vacina em meninas grávidas, que tiveram reação grave à dose anterior ou a algum componente da vacina. As mulheres HIV+ entre 9 e 26 anos de idade devem continuar recebendo o esquema de três doses . A segunda vacina foi aprovada pela ANVISA desde 2008 para uso em mulheres de 10 a 25 anos de idade. Esta, é bivalente e específica para os HPV's tipo 16 e 18, e comercialmente reconhecida como Cervarix® (GlaxoSmithKline S.A.). Também deve ser aplicada em três doses IM: 0 dia, 30 dias e 180 dias (GONÇALVES *et al.*, 2014) (ANEXOS 2, 3 e 4).

O mecanismo de proteção induzido pela vacina parece ser mediado, principalmente, pelas altas concentrações de anticorpos neutralizantes (dez vezes ou mais elevados do que as concentrações após a infecção natural). A vacinação profilática com VLP de L1 tem se apresentado como muito eficaz na prevenção da infecção primária, da infecção latente e das patologias associadas. Entretanto, as concentrações séricas de anticorpos necessárias para conferir proteção contra esta infecção são desconhecidas, de modo que o período de proteção dado pelas vacinas permanece indeterminado (EINSTEIN *et al.*, 2009).

A eficácia da vacinação profilática contra a infecção pelo HPV nos homens tem sido analisada. As pesquisas enfatizam esta vacinação como estratégia de prevenção de HPV em homens que fazem sexo com homens (HSH) (HILLMAN *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2014). A vacina quadrivalente tem se mostrado eficaz contra infecção e doença em homens que fazem sexo com mulheres e em homens que fazem sexo com homens, prevenindo as verrugas genitais, pelos HPVs tipos 6/11, e as neoplasias intraepiteliais anais pelos HPVs tipos 6, 11, 16 e 18 (GIULIANO *et al.*, 2011). Desta forma, acredita-se que a vacinação contra o HPV em homens poderá proteger também a infecção das mulheres. Alguns países como EUA, Canada, Áustria e Austrália já tem recomendado a vacinação para homens (BROTHERTON *et al.*, 2011).

Embora as vacinas possam reduzir a incidência de diversas doenças infecciosas e os benefícios superarem os riscos, alguns efeitos adversos graves foram reportados, requerendo um rigoroso monitoramento da vacinação após cada aplicação (booster) vacinal, bem como uma avaliação crítica de indivíduos com doenças autoimunes (LINCON *et al.*, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar presença de células de Langerhans e ativação de linfócitos T, induzidas pelo HPV em lesões cervicais intraepiteliais de baixo e alto grau oncogênicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar as células TCD45RA⁺, TCD45RO⁺ e células de Langerhans em lesões cervicais intraepiteliais de baixo e alto grau oncogênicos induzidas pelo HPV.

- Quantificar as células expressando a quimiocina CCL20 e seu receptor CCR6 em lesões cervicais intraepiteliais de baixo e alto grau oncogênicos induzidas pelo HPV.

- Analisar a correlação entre a presença de células TCD45RA⁺ e TCD45RO⁺, bem como do eixo CCL20/CCR6 com a progressão das lesões precursoras do câncer cervical e propor possíveis biomarcadores de prognóstico no câncer cervical.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fiocruz e Instituto Nacional da Saúde da Mulher, Criança e Adolescente Fernandes Figueira (IFF)/Fiocruz.

4.2 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI/Fiocruz sob o número: 056/2011, CAAE 0031.0.009.008-11 e referenciado pelo Comitê de Ética do IFF/FIOCRUZ (em anexo).

Todas as voluntárias foram incluídas na pesquisa após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), permitindo a utilização de suas amostras biológicas em projetos relacionados ao HPV (em anexo).

4.3 Desenho do Estudo e Casuística

Estudo transversal a partir de pacientes atendidas no Setor de Patologia Cervical do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente Fernandes Figueira (IFF), Fiocruz, onde a sua maioria é soronegativa para o HIV, e está sob a coordenação do Dr. Fábio Russomano.

Todas as pacientes que apresentaram lesões cervicais foram convidadas a participar do estudo no momento da consulta ginecológica. Dados demográficos,

comportamentais e clínicos foram coletados por meio de questionários semi-estruturados durante a visita na qual as amostras cervicais foram obtidas.

4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Foram incluídas no estudo todas as pacientes que ao serem convidadas assinaram o TCLE, e responderam ao questionário com dados clínico e comportamentais. Sendo excluídas as grávidas, as imunossuprimidas e aquelas que receberam vacina contra o HPV.

Esta proposta não intervém com o método diagnóstico e a conduta médica. Todas as pacientes foram atendidas pelo médico ginecologista que indicou e realizou, quando necessário, a devida intervenção clínica conforme recomendado nas Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (MS/INCA, 2011).

4.4 Obtenção de fragmentos de tecidos de colo uterino

Ao serem encaminhadas ao Serviço de Patologia Cervical do IFF, as voluntárias foram examinadas pelo médico ginecologista e em caso de presença de lesão e/ou necessidade de confirmação diagnóstica da infecção pelo HPV, um fragmento do colo uterino, representativo da lesão, foi coletado pelo médico e dividido em duas porções. Todas as condições de anestesia, assepsia, antisepsia e proteção individual foram observadas durante o procedimento.

O tecido biopsiado foi enviado para o Serviço de Anatomia Patológica do IFF, responsável pela realização do diagnóstico histopatológico das mulheres selecionadas, bem como pela identificação das lesões causadas pelo HPV, descritas como neoplasias intra-epiteliais celulares (NIC), que se referem a gravidade do desarranjo na arquitetura tecidual e celular, onde foram classificadas em acordo com o resumo abaixo (disponível em <http://www.pro-celula.com.br/home/atlascitologico/atlas/texto/cito-cerv-uterino.htm>)

- NIC I (Neoplasia intra-epitelial cervical grau I), onde há discreta hiperplasia atípica da camada basal com atipias nucleares restritas ao terço inferior do epitélio.
- NIC II (Neoplasia intra-epitelial cervical grau II), onde há hiperplasia basal com mitose atípica envolvendo os dois terços inferiores da espessura do epitélio.
- NIC III (Neoplasia intra-epitelial cervical grau III), onde há atipias e despolaridade envolvendo praticamente toda a espessura do epitélio.
- Carcinoma invasivo, lesão onde se encontra a presença de agrupamentos de células neoplásicas rompendo a membrana basal e infiltrando o estroma.

Após a liberação dos resultados histopatológicos, os blocos parafinizados foram encaminhados para o Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do INI, para serem cortados e a análise do perfil celular realizada.

A outra porção foi enviada para o Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do INI, para a realização da reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação do DNA-HPV. No momento da coleta, os fragmentos destinados à PCR foram imediatamente acondicionados em Tris-EDTA e armazenados em freezer -70°C até a realização do ensaio.

4.5 Variáveis clínico comportamentais

Ao assinar o TCLE, as voluntárias foram orientadas quanto a importância do estudo e da própria participação para a realização. No mesmo momento, as participantes responderam a um questionário com dados comportamentais e sócio-demográficos, tais como idade, etnia, sexarca, número de parceiros, etilismo, tabagismo, número de gestações e número de abortos.

4.6 Identificação da presença do HPV pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com a utilização do kit QIAamp® DNA mini kit para tecidos (Hilden- Alemanha), segundo protocolo do próprio fabricante, a partir de material acondicionado em tampão Tris/EDTA (Tris/Ácido tetra-acético diaminoetano), e estocado em freezer -70°C até o processamento.

4.6.2 PCR

A reação ocorreu com a utilização do par de primers genéricos, MY09/MY11 que amplificam uma sequência de DNA de 450pb dentro do gene L1 do HPV (Tabela 2). Como controle de qualidade da amostra, foram utilizados primers do gene da β -globina humana, GH20 / PC04 que amplifica uma sequência de 268pb, constitutivamente expressa em humano, para evitar a interpretação de resultado falso negativo (Tabela 2).

Tabela 2: Sequência de nucleotídeos dos primers MY09/11 e β -globina.

PRIMER	SEQUÊNCIA	AMPLICON (pb*)
MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	450
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	268
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	

Onde: M= A+C; R=A+G; W=A+T; Y+C+T

*pb – pares de base

A reação de amplificação foi executada segundo Tristão (2012) em 25 μ L da seguinte mistura de reação, para os primers do HPV (MY/09 MY/11):

2,5 μ L do tampão de PCR (10X - *invitrogen*®)

1,5µL de MgCl (50mM invitrogen®)

2,5µL de nucleotídeos – dNTPs (2mM - *invitrogen*®)

1µL (10pmoles / µL *invitrogen*®) do oligonucleotideo MY09

1µL (10pmoles / µL *invitrogen*®) do oligonucleotideo MY11

4µL de DNA

0,5µL de Taq polimerase (5U/µL - *invitrogen*®) do

Água deionizada qsp 25µL

O ciclo de

A reação de amplificação foi executada em 25µL da seguinte mistura de reação, para os primers da β-globina (GH₂₀; PC04):

2,5µL do tampão de PCR (10X - *invitrogen*®)

1,0µL de MgCl (50mM invitrogen®)

2,5µL de nucleotídeos – dNTPs (2mM - *invitrogen*®)

1µL (10pmoles / µL *invitrogen*®) do oligonucleotideo PC04

1µL (10pmoles / µL *invitrogen*®) do oligonucleotideo GH₂₀

4µL de DNA

0,5µL de Taq polimerase (5U/µL - *invitrogen*®)) do

Água deionizada qsp 25µL

Em todas as reações, a água foi utilizada em substituição ao DNA de uma amostra, servindo como controle negativo e controle positivo, na detecção de contaminantes.

Para visualização dos resultados, 5 µL dos produtos amplificados foram misturados a 2 µL de azul de bromofenol (Promega, Madison, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados utilizando o marcador de 100pb DNA Ladder

(Amersham Biosciences). O gel de agarose foi visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador de ultravioleta e fotografado utilizando o software Quantity One (BioRad Laboratories).

4.7 Avaliação da presença de células de Langerhans e da expressão do receptor CCR6, células TCD45RA e TCD45RO pela técnica de imuno-histoquímica

Para observação e quantificação de LC e células TCD45RA e TCD45RO em material parafinado de lesões de colo uterino, bem como a identificação de células que expressam o receptor CCR6 foi realizada a técnica de imuno-histoquímica.

Para este procedimento, o material embocado em parafina gentilmente cedido pelo Setor de Anatomia Patológica do IFF foi cortado em micrótomo em seções de 3 μ m, e em seguida fixadas em lâminas de vidro silanizadas. Após um período mínimo de 24 horas em estufa, as lâminas foram utilizadas para a reação de imuno-histoquímica para o processo de desparafinização, seguido de dois banhos de xileno 100%, cada um com 10 minutos de duração. Posteriormente, foram realizados dois banhos sucessivos de etanol 100%, durante 10 minutos cada. Em seguida, foi feita a recuperação antigênica para facilitar o acesso do anticorpo ao epítipo alvo com a utilização da solução de Trilogy (Cell Marque), em banho de água (FANEM, 102R) durante 45 minutos a uma temperatura de 95°C. Todas as etapas posteriores seguiram o protocolo descrito pelo fabricante do kit REVEAL Biotin-Free Polyvalent HRP (Spring Bioscience). Foi realizado o bloqueio da enzima peroxidase endógena com a solução de peróxido de hidrogênio. Com o objetivo de diminuir as ligações inespecíficas, foi utilizado o bloqueador de proteínas. Após isso, a amostra foi incubada com o anticorpo primário (anti-CD1a, anti-CCR6, anti-TCD45RA ou anti-TCD45RO), conforme descrito na TABELA 3, por um período de uma hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário por 15 minutos, e seguido pelo procedimento de 3 lavagens sucessivas na solução de PBS acrescida de Tween 20 0,05%. Posteriormente, adicionou-se o conjugado, e na etapa subsequente o DAB (Diaminobenzidina 3,3, Spring). As lâminas foram coradas com uma solução de hematoxilina de Meyers e submetidas a um banho de álcool e outro de xilol por 10

minutos cada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com Etellan (MERCK) e o material recoberto com lamínulas. O último passo foi a observação das lâminas em microscopia óptica (marca, LEIKA - DMLB), no qual foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada independente da intensidade de marcação. A quantificação das células foi realizada com o auxílio de uma gráticula em quadrantes de 0,1 mm² e observada através da microscopia óptica em aumento de 400x.

Tabela 3: Marcadores imuno-histoquímicos utilizados na determinação dos antígenos analisados

ANTICORPO	DILUIÇÃO	MARCA	ESPECIFICAÇÃO
Anti CCL20	1:4	ABCAM	Quimiocina CCL20
Anti CD1a	1:50	ABCAM	Células de Langerhans
Anti CCR6	1:200	ABCAM	Receptor CCR6
Anti CD45RA	1:100	BD Pharmingen	Células T <i>naives</i>
Anti CD45RO	1:100	BD Pharmingen	Células T ativadas

4.8 Quantificação das células positivas

Após a marcação imuno-histoquímica, a presença de células positivas foi observada nas regiões do epitélio, subepitélio (ou camada basal do epitélio), córion e perivascular do material tratado, conforme está demonstrado na Figura 6. Cada lâmina foi analisada para os respectivos marcadores em pelo menos 20 campos, e a contagem, foi realizada em microscópio ótico composto por uma objetiva com aumento de 40 vezes e uma ocular gradeada com aumento de 10 vezes. Em cada campo foi registrado o número total de células positivas para o marcador a ser analisado. Todos os casos foram fotografados para permitir futuras avaliações e servirem como forma de ilustração para este trabalho.

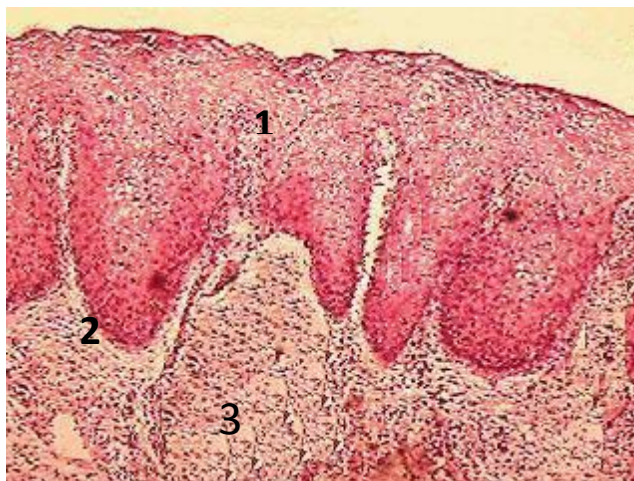


Figura 6: Ilustração de um fragmento de colo uterino (coloração HE – 4x), demonstrando as diferentes áreas estudadas: epitélio (1), camada basal do epitélio (2) e córion (3). A região perivascular não está indicada (adaptada do site <http://www.pro-celula.com.br/atlas/atlas.htm>).

4.9 Análise Estatística

Os dados foram armazenados em planilha Excell[®]. Os dados quantitativos, referentes as análises comportamentais e a distribuição das células inflamatórias no colo uterino, bem como as análises de correlação (realizadas por grupo de estudo apresentando lesões cervicais) entre as variáveis CD45RA/CD45R0, CCL20/CCR6 CD45RO/CCL20 e CCL20/CD1a foram analisados pelo programa Prisma 5[®] pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, e o pós teste de comparação múltipla de Dunns. As análises comportamentais qualitativas foram analisadas através do teste X^2 pelo Programa Epi-Info 7[®]. Foi considerado estatisticamente significativo valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Casuística e dados clínico comportamentais

No presente estudo, foram incluídas 68 participantes do sexo feminino, maiores de 18 anos. Entre estas, 51 apresentavam alterações relacionadas à

infecção pelo HPV, considerando-se a presença de NIC: NIC-I (n=17), NIC-II (n=17) e NIC-III (n=17), e 17 amostras controle de participantes que foram submetidas a histerectomia, e que apresentavam-se negativas para neoplasias ou lesões precursoras de câncer e/ou infecção pelo HPV. A idade das participantes variou de 19 a 50 anos ($38,5\pm 7,78$), sendo a média de $31,29\pm 5,31$, $33,47\pm 10,28$, $26\pm 7,45$ e $33,5\pm 8,14$ anos, para os grupos controle, NIC I, NIC II e NIC III, respectivamente, sem apresentar diferença estatística entre estes ($p>0,05$). Quanto à etnia, 34 (50%) eram brancas, enquanto 34 (50%) eram negras ou pardas sem diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$).

Na Tabela 4, estão representados os dados clínico-comportamentais das participantes do estudo. A média da sexarca, entre os grupos, foi de $18,41\pm 2,29$, $17,88\pm 3,29$, $17,29\pm 2,75$ e $16,47\pm 2,72$ anos, respectivamente, para os grupos controle, NIC I, NIC II e NIC III sem diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Quanto ao número de parceiros, a média foi de $4,5\pm 2,89$, $4\pm 1,41$, $6,8\pm 8,22$ e $5,31\pm 5,01$, sem apresentar diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Em relação ao etilismo, 5 (29,4%), 7 (41,2%), 8 (47,1%) e 6 (35,3%) voluntárias dos grupos controle, NIC I, NIC II e NIC III, respectivamente, afirmavam ter o hábito de beber. Não houve diferença estatísticas entre os grupos. Quanto ao tabagismo, 4 (23,5%), 11 (64,7%), 3 (17,6%) e 1 (5,9%) participantes dos grupos controle, NIC I, NIC II e NIC III, respectivamente, possuíam o hábito de fumar. Ao comparar os grupos, foi observada diferença estatística entre os grupos de NIC I e NIC II ($p=0,005$), e NIC I e NIC III ($p=0,0003$). A média do número de gestações entre as participantes foi de $1,75\pm 1,12$, $1,82\pm 1,42$, $1,59\pm 2,15$ e $1,76\pm 1,44$, nos grupos controle, NIC I, NIC II e NIC III, respectivamente, sem diferença estatística observada. Em relação ao número de abortos, a média foi de $1,5\pm 1,17$, $0,5\pm 0,77$, $0,29\pm 0,47$ e $1,5\pm 1,17$ nos grupos controle, NIC I, NIC II e NIC III, respectivamente. A significância estatística foi observada entre os grupos controle e NIC II ($p=0,0142$).

Tabela 4 - Dados clínicos e comportamentais

	CONTROLE	Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)			p^a	p^b	p^c	p^d	p^e	p^f
		NIC I	NIC II	NIC III						
IDADE (Média±DP)*	31,29±5,31	33,47±10,28	26±7,45	33,5±8,14	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
ETNIA n (%)**										
Branca	9 (52,4%)	7 (41,2%)	9 (52,9%)	9 (52,9%)	0,49	0,86	1,00	0,49	0,49	1,00
Negra/Parda	8 (47,6%)	10 (47,6%)	8 (47,1%)	8 (47,1%)						
ETILISMO n (%)**										
Sim	5 (29,4%)	7 (41,2%)	8 (47,1%)	6 (35,3%)	0,47	0,28	0,71	0,72	0,94	0,48
Não	12 (70,6%)	10 (58,8%)	9 (52,9%)	11 (64,7%)						
TABAGISMO n (%)**										
Sim	4 (23,5%)	11 (64,7%)	3 (17,6%)	1(5,9%)	0,01	0,67	0,27	0,005	0,0003	0,28
Não	13 (76,5%)	6 (35,3%)	14 (82,4%)	16 (94,1%)						
SEXARCA (Média±DP)*	18,41±2,29	17,88±3,29	17,29±2,75	16,47±2,72	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
NÚMERO DE PARCEIROS (Média±DP)*	4,5±2,89	4±1,41	6,8±8,22	5,31±5,01	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
NÚMERO DE ABORTOS (Média±DP)*	1,5±1,17	0,5±0,77	0,29±0,47	1,5±1,17	p>0,05	p<0,01	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

p^a Controle vs NIC I; p^b Controle vs NIC II; p^c Controle vs NIC III; p^d NIC I vs NIC II; p^e NIC I vs NIC III; p^f NIC II vs NIC III

* Teste T Student,

** p valor, Teste χ^2

5.2 Identificação da presença do HPV através da reação da polimerase em cadeia nos diferentes grupos estudados

A reação ao PCR foi positiva em 46 (90,2%) das 51 voluntárias que possuíam diagnóstico de lesão associada à infecção pelo vírus (NIC I, NIC II ou NIC III). No grupo controle (n=17), todas as mulheres revelaram ser negativas para a detecção de DNA-HPV.

5.3 Identificação de células T CD45RA⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

Na análise da região epitelial foi observada significância estatística ($p < 0,05$) entre o grupo com NIC-III ($0,96 \pm 1,14$) e o grupo controle ($0,20 \pm 0,11$). Na camada basal do epitélio revelou que durante a evolução para lesões de alto grau observamos um aumento significativo destas células em comparação com grupo controle ($0,39 \pm 0,26$, $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente para os grupos de NIC II ($1,30 \pm 0,93$) e NIC III ($2,81 \pm 2,90$).

Em relação a área de córion, a análise de distribuição das células CD45RA⁺ identificou significância estatística com um aumento no número destas células nas pacientes com NIC III ($12,10 \pm 8,69$) em relação ao grupo NIC I ($5,18 \pm 1,80$; $p < 0,05$) e deste com grupo controle ($9,46 \pm 3,35$; $p < 0,001$). Já na região perivascular, os resultados não comprovaram significância na comparação intra grupos com lesão e entre o grupo controle (Figuras 7 e 8).

Estes resultados indicam que na cervix controle há a presença de células CD45RA⁺, que diminuem em número após na fase inicial da infecção pelo HPV, e progressivamente se elevam com a gravidade das lesões. A migração de linfócitos para lesão cervical induzida pelo HPV é mediada principalmente por CCL20, e ao longo da evolução das lesões pré malignas pode haver ativação destas células, tornando-as CD45RA⁻ e CD45RO⁺.

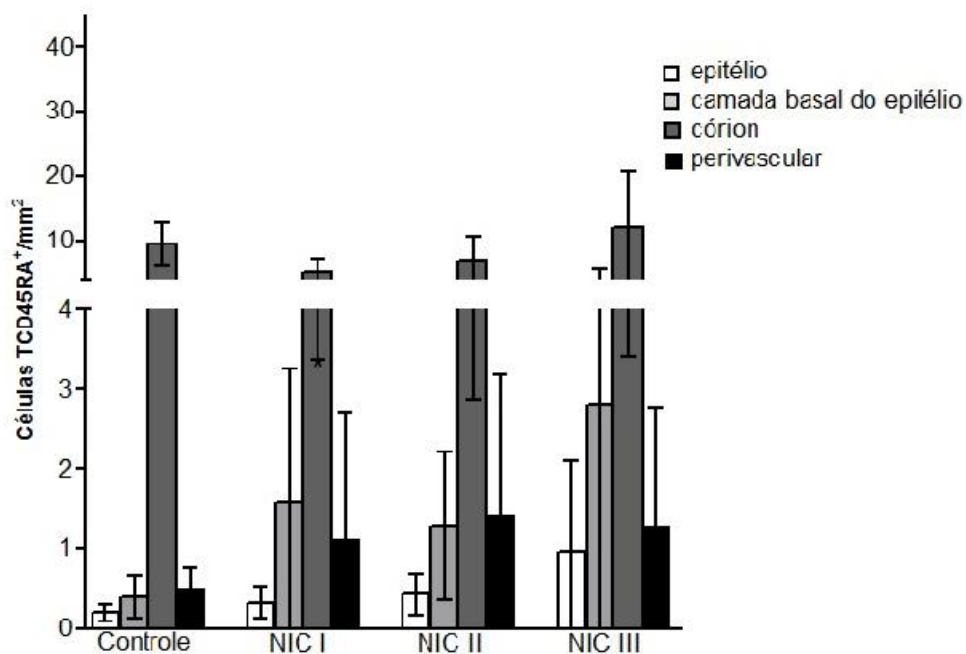


Figura 7: Análise da distribuição das células TCD45RA⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III).

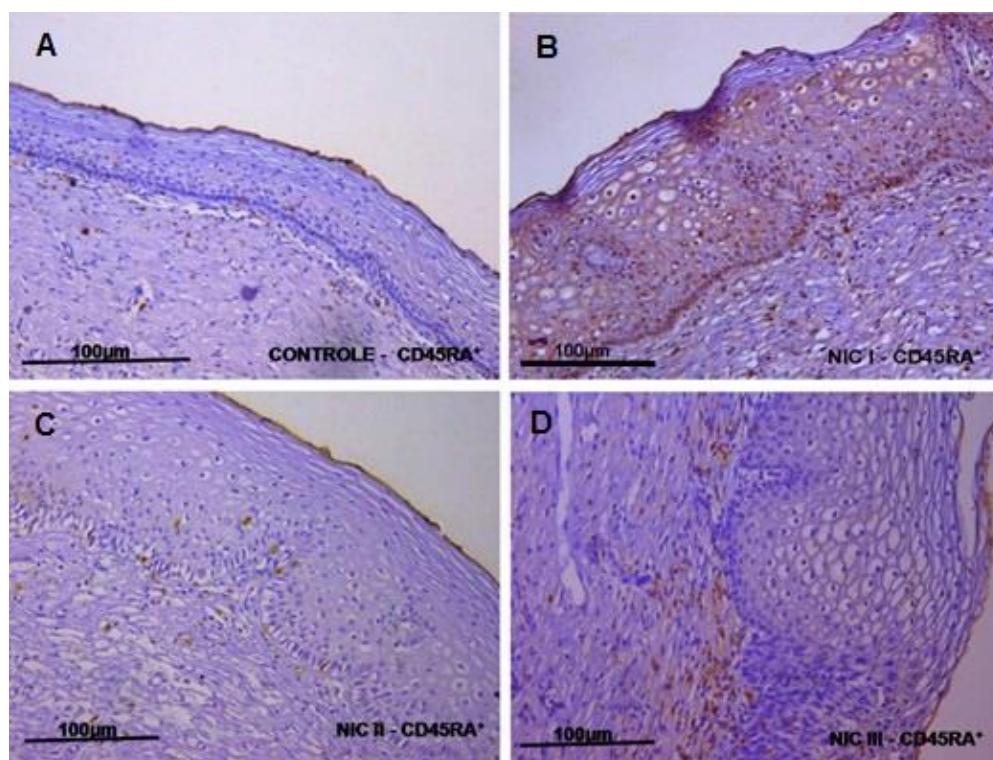


Figura 8: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CD45RA⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D).

5.4 Identificação de células T CD45RO⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

A análise de distribuição das células CD45RO⁺ na região epitelial demonstrou significância estatística somente entre os grupos de NIC II ($3,68 \pm 2,72$) e NIC III ($3,02 \pm 1,66$) em relação ao grupo controle ($0,83 \pm 0,78$; $p < 0,0001$ para ambas análises). Na camada basal do epitélio, a análise de distribuição das células CD45RO⁺ apresentou os mesmos resultados observados na área epitelial. A significância estatística foi comprovada apenas entre os grupos de NIC II ($4,78 \pm 2,89$) e NIC III ($4,56 \pm 2,70$) em relação ao grupo controle ($1,22 \pm 0,93$; $p < 0,0001$).

No córion, observamos significância estatística entre os grupos de NIC I ($12,01 \pm 8,13$) e NIC III ($25,37 \pm 17,55$; $p < 0,05$), e entre o grupo de NIC III e o grupo controle ($11,89 \pm 3,64$; $p < 0,05$). Na área perivascular, a significância foi comprovada entre os grupos de NIC II ($2,07 \pm 1,41$) e NIC III ($2,54 \pm 1,58$) em relação ao grupo controle ($0,29 \pm 0,26$), com $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (Figuras 9 e 10).

A presença do marcador CD45RO caracteriza a presença de células ativadas. Em acordo com o resultado apresentado, células CD45RO⁺ estão presentes na cérvix normal desde a região perivascular, e chegam a alcançar a região epitelial. A observação dos diferentes sítios, revela que a presença do marcador CD45RO encontra-se em níveis aumentados na região do córion das participantes de NIC III. Sendo válido ressaltar que neste sítio, as células chegam a alcançar o dobro do valor encontrado no tecido normal. Talvez a migração destas células com fenótipo ativado nas lesões de alto grau acarrete acúmulo da população na região do córion.

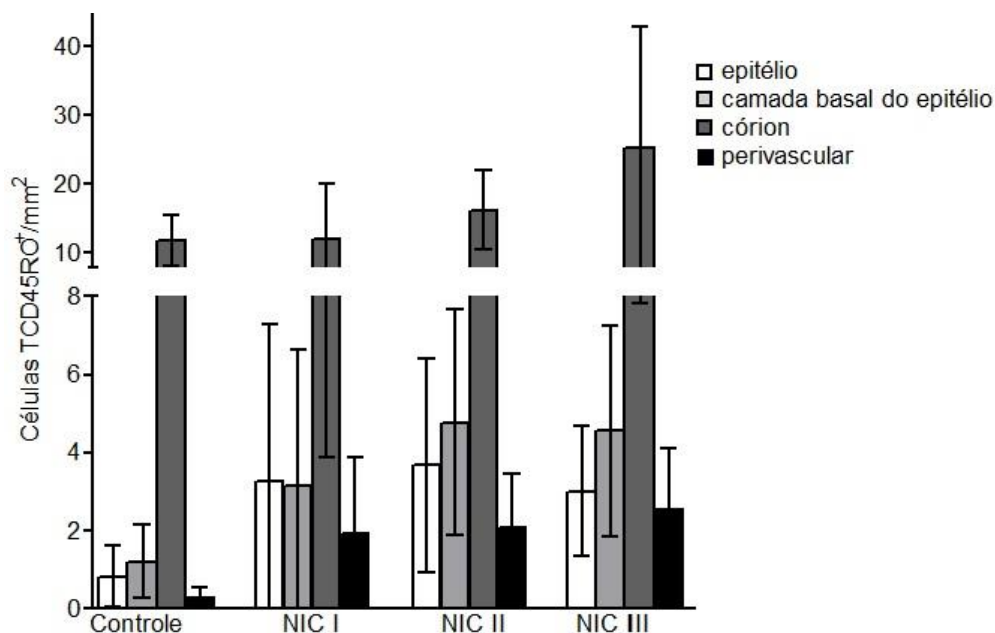


Figura 9: Análise da distribuição das células TCD45RO⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

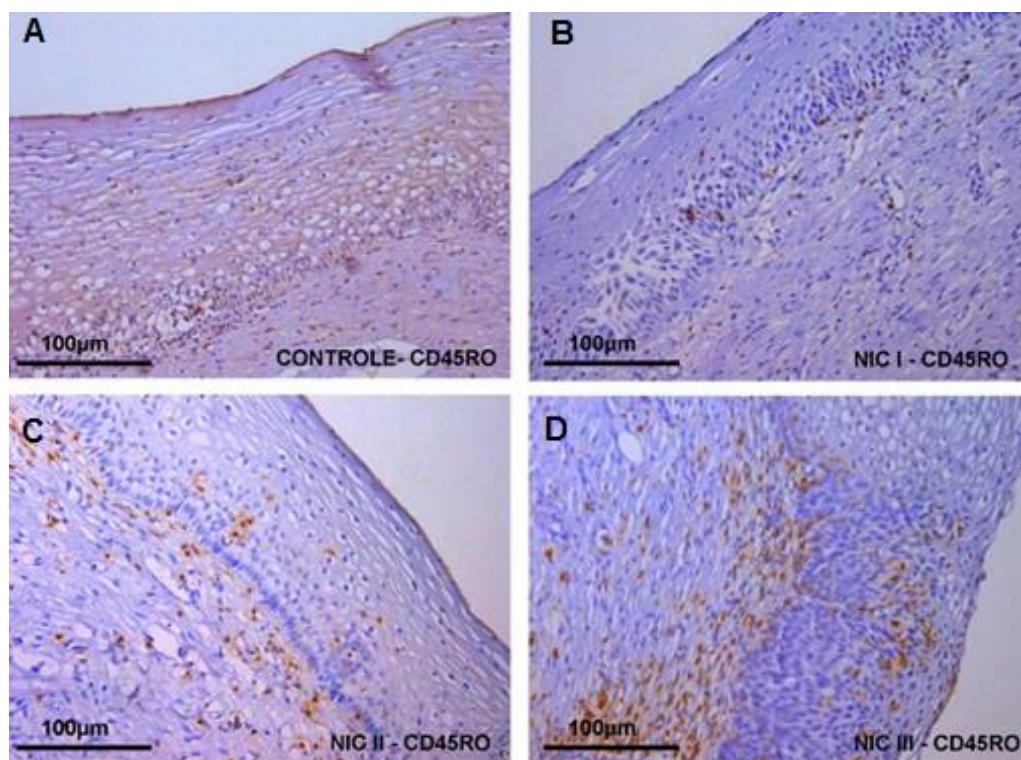


Figura 10. Análise imuno-histoquímica da expressão de células CD45RO⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D).

5.5 Identificação da presença de células CD1a⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

A distribuição das células CD1a⁺ na área epitelial, demonstrou haver significância entre os grupos de NIC I ($1,20 \pm 0,24$) e NIC II ($0,55 \pm 0,27$; $p < 0,001$), e entre os grupos de NIC I e NIC III ($0,45 \pm 0,14$; $p < 0,0001$) bem como entre os grupos de NIC II e NIC III em relação ao grupo controle, ambos com o $p < 0,0001$. Na camada basal do epitélio houve significância comprovada entre os grupos de NIC II ($0,56 \pm 0,17$) e NIC III ($0,58 \pm 0,20$; $p < 0,05$), em relação ao grupo controle ($1,49 \pm 0,29$; $p < 0,0001$).

Na região do córion, a análise de distribuição das células CD1a⁺ revelou significância estatística entre o grupo de NIC I ($3,20 \pm 0,59$) e os grupos de NIC III ($2,20 \pm 0,70$; $p < 0,001$) e controle ($3,15 \pm 3,01$; $p < 0,0001$); e entre o grupo de NIC II e o grupo controle ($p < 0,001$). Na área perivascular não demonstrou haver diferença significativa na comparação intra grupos de lesão, NIC I ($0,11 \pm 0,16$), NIC II ($0,15 \pm 0,11$) e NIC III ($0,12 \pm 0,04$) e entre o grupo controle ($0,21 \pm 0,10$), como demonstrado nas Figuras 11 e 12.

O marcador CD1a, expresso em células de Langerhans é utilizado para apresentação de antígenos às células T. No presente trabalho, foi possível observar a presença de células de CD1a⁺ na cérvix uterina do grupo controle. Entretanto, o estudo aponta redução do número dessas células CD1a⁺ nas lesões de baixo grau, em todas as áreas investigadas. Essa diminuição de células CD1a⁺ parece ocorrer em acordo com a gravidade das lesões. A migração de LCs para os locais de lesão recebe a influência de quimiocinas, como a CCL20 constitucionalmente expressa em queratinócitos, população celular infectada pelo HPV.

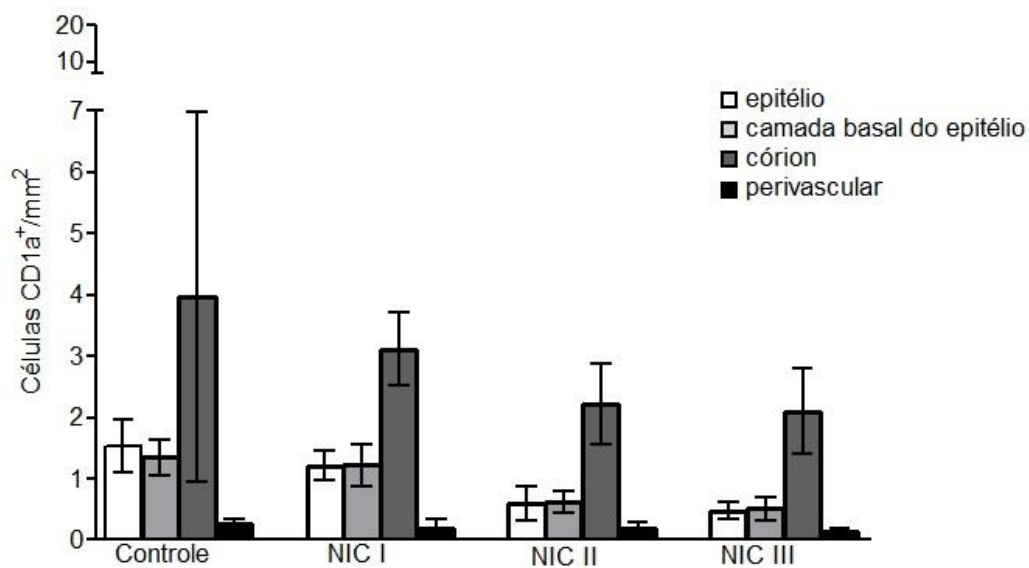


Figura 11: Análise da distribuição das células CD1a⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

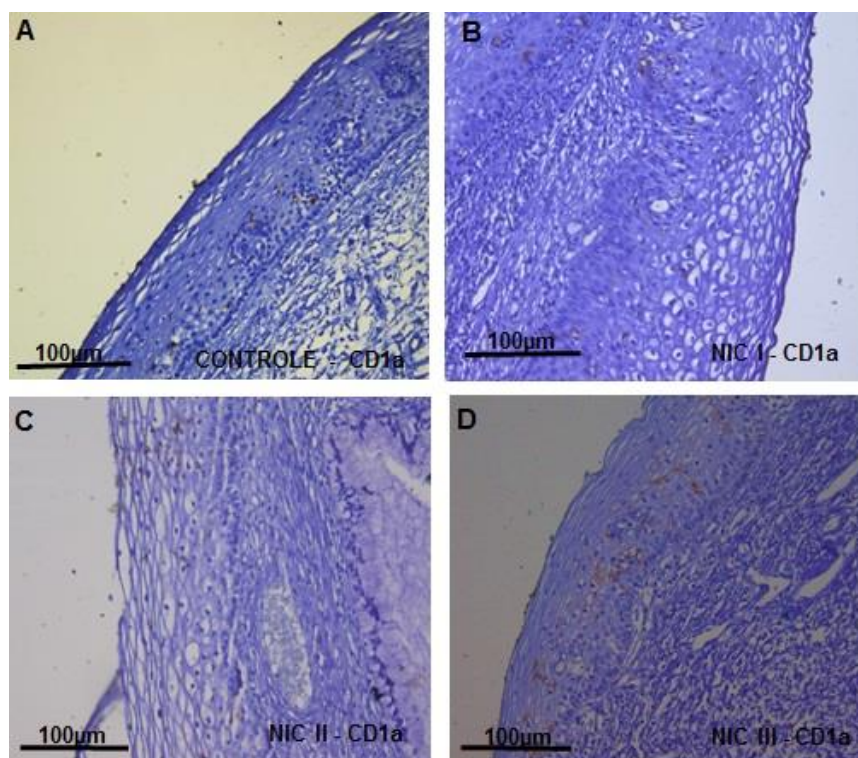


Figura 12: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CD1A⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D).

5.6 Identificação da expressão de CCL20 nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

A análise de distribuição da expressão de CCL20 na região epitelial demonstrou significância estatística, entre os grupos com lesões cervicais [NIC I ($0,45 \pm 0,31$), NIC II ($0,52 \pm 0,27$), NIC III ($0,99 \pm 0,86$)]. Entretanto, observamos uma diminuição do número de células expressando esta quimiocina nos grupos com lesões (NIC I, $p < 0,0001$; NIC II, $p < 0,0001$ e NIC III, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($1,46 \pm 0,46$). Os resultados da análise de distribuição da expressão de CCL20, na camada basal do epitélio não comprovaram significância na comparação intra-grupos de lesão (NIC I, $1,76 \pm 0,1,67$; NIC II, $1,42 \pm 0,97$; e NIC III, $2,68 \pm 1,87$) e entre o grupo controle ($1,23 \pm 0,50$).

A análise de distribuição da expressão de CCL20 na região do córion mostrou significância comprovada entre os grupos de NIC I ($5,43 \pm 1,51$) e NIC III ($7,40 \pm 4,71$) em relação ao controle ($3,67 \pm 2,42$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Na região perivascular, os resultados não comprovaram significância na comparação intra grupos de lesão, NIC I ($0,36 \pm 0,27$), NIC II ($0,73 \pm 0,54$) e NIC III ($0,84 \pm 0,51$) e entre o grupo controle ($0,33 \pm 0,11$), como demonstrado nas Figuras 13 e 14.

Os resultados apresentados, permitem concluir que a expressão de CCL20, quimiocina responsável pela migração de LCs, células T e monócitos para o sítio da infecção, pode ser observada em todos os sítios analisados, sendo observada principalmente na região do córion, aumentando gradativamente com a evolução para lesões precursoras do CC. Entretanto, o estudo mostra diminuição desta quimiocina na região epitelial nas lesões de NIC I e NIC II, com aumento nas lesões de alto grau (NIC III), mostrando que a infecção pelo HPV pode alterar a expressão desta quimiocina pelos queratinócitos, influenciando negativamente a migração celular para o sítio da infecção.

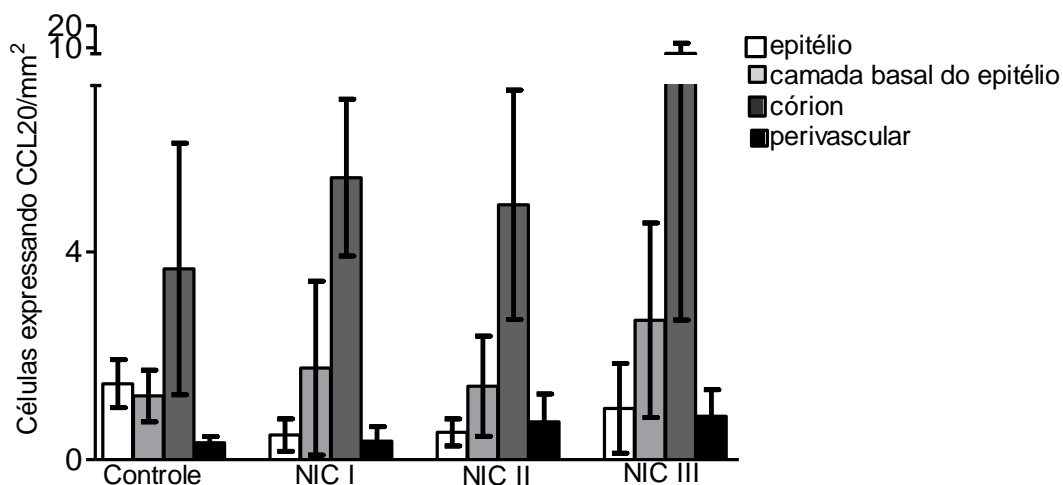


Figura 13: Análise da distribuição das células CCL20⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

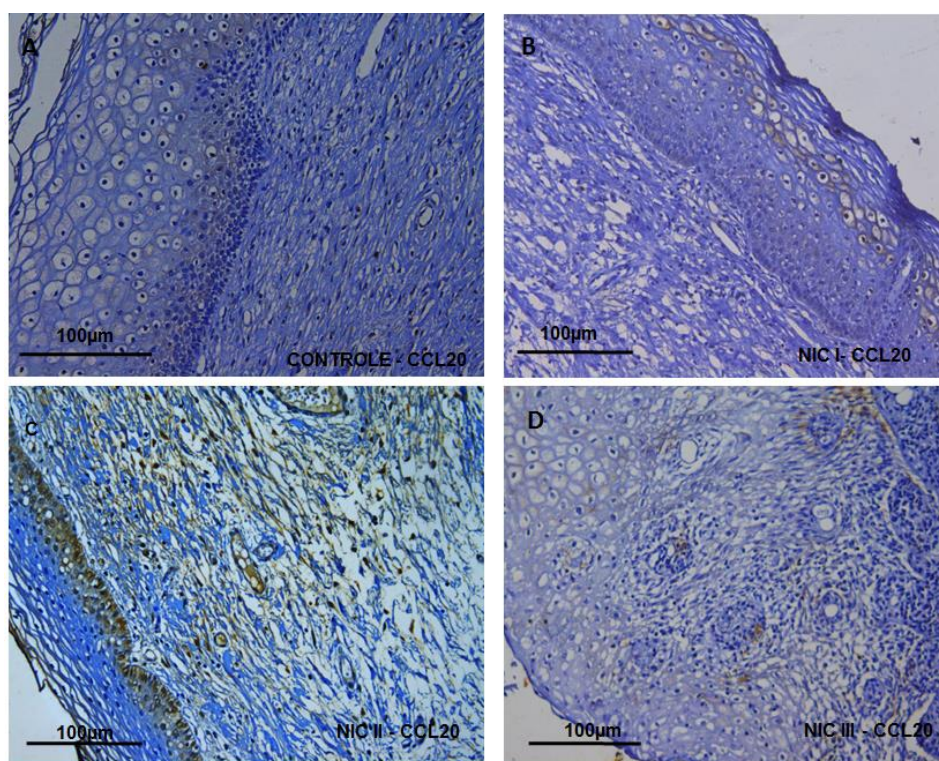


Figura 14: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CCL20⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D).

5.7 Identificação da presença de células CCR6⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

Na região epitelial, a análise de distribuição das células CCR6⁺, os resultados não comprovaram diferença estatística significativa na comparação intra grupos de lesão (NIC I, $0,48 \pm 2,22$; NIC II, $0,50 \pm 0,34$ e NIC III, $0,45 \pm 0,98$) e entre o grupo controle ($0,40 \pm 0,15$). Na camada basal do epitélio, houve significância estatística nos grupos de NIC II ($1,20 \pm 1,11$) e NIC III ($2,30 \pm 2,98$) em relação ao grupo controle ($0,45 \pm 0,32$; $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Na área do córion demonstrou abundância de células CCR6⁺, com diferenças entre os grupos de NIC II ($5,30 \pm 3,61$) e NIC III ($9,14 \pm 6,10$; $p < 0,001$), NIC I ($5,45 \pm 1,46$) e controle ($10,40 \pm 3,50$; $p < 0,0001$) e o grupo de NIC II e o grupo controle ($p < 0,001$). A região perivascular na análise de distribuição das células CCR6⁺, não comprovou significância na comparação intra grupos de lesão, (NIC I, $1,00 \pm 1,14$; NIC II, $0,67 \pm 1,74$ e NIC III, $0,92 \pm 0,90$) e entre o grupo controle ($0,50 \pm 0,35$). Figuras 15 e 16.

Podemos concluir que as células expressando o receptor CCR6, principalmente linfócitos de memória e células dendríticas, estavam presentes raramente no epitélio, local da replicação viral, e mantinham-se no córion durante a infecção pelo HPV, com diminuição destas células no início da infecção (pacientes com NIC I) e gradual retorno ao número basal observado no grupo controle, após evolução para lesões de alto grau. A migração destas células imunocompetentes pode estar comprometida, influenciando o controle da replicação viral e o surgimento de lesões pré-malignas.

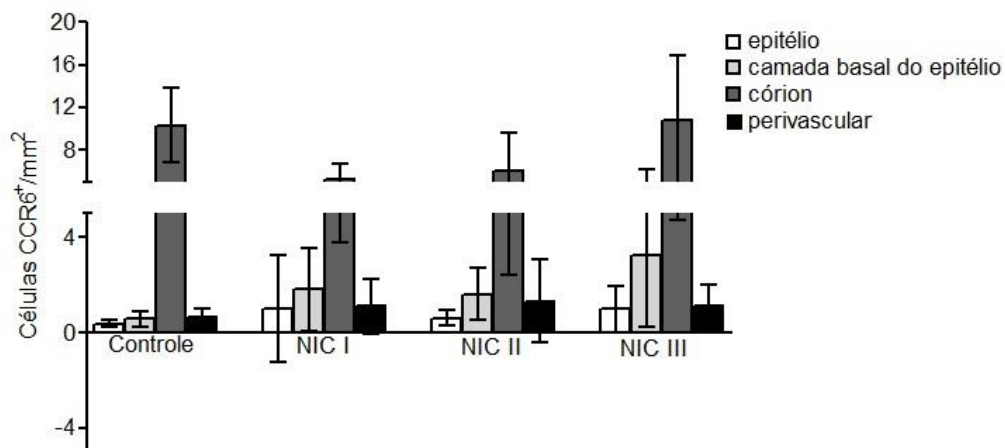


Figura 15: Análise da distribuição das células CCR6⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e com neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) e neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC II e NIC III). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

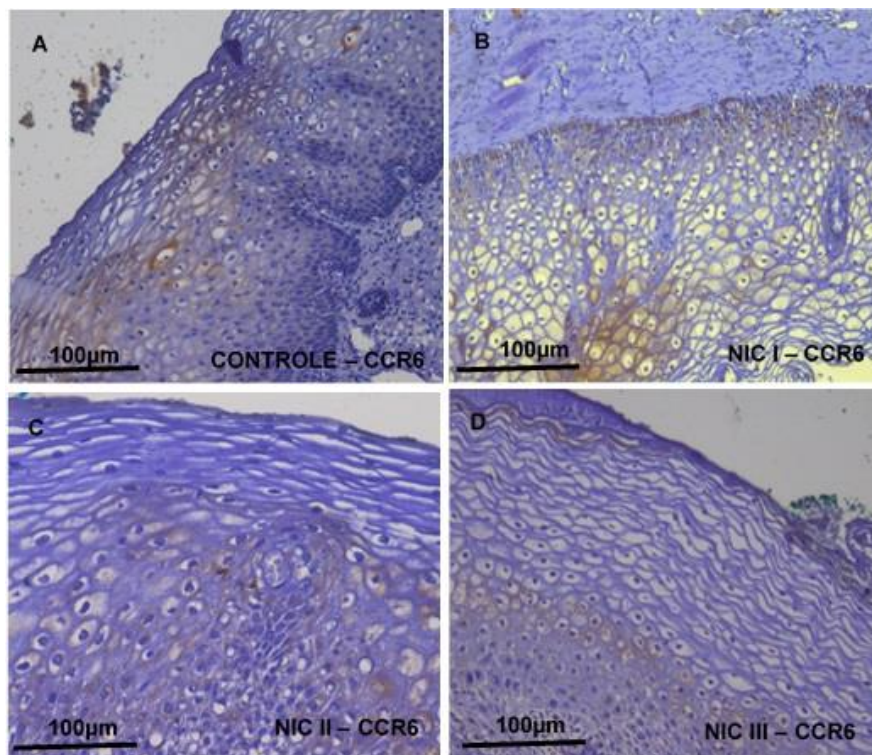


Figura 16: Análise imuno-histoquímica da expressão de células CCR6⁺ em fragmentos do colo uterino nos grupos controle, sem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (A), e com NIC I (B), NIC II (C) e NIC III (D).

5.8 Correlação da distribuição de células TCD45RA⁺ e TCD45RO⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

A avaliação da correlação da distribuição de células TCD45RA⁺ e TCD45RO⁺ foi realizada em todas áreas de cada um dos grupos estudados. Os resultados da comparação apontaram correlação positiva na região epitelial dos grupos de NIC I ($r=0,74$; $p=0,0008$), NIC III ($r=0,68$; $p=0,003$) e controle ($r=0,51$; $p=0,03$). Na camada basal do epitélio a correlação foi comprovada no grupo de NIC III ($r=0,62$; $p=0,009$). Na área do córion, a correlação foi observada nos grupos de NIC II ($r=0,54$; $p=0,02$) e controle ($r=0,55$; $p=0,02$). Entretanto, na área perivascular a correlação foi comprovada apenas nos grupo de NIC III ($r=0,76$; $p=0,01$).

5.9 Correlação da distribuição de células TCD45RO⁺ e CCL20⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

A avaliação da correlação da expressão de células CCL20⁺ e TCD45RO⁺ foi realizada em todas áreas de cada um dos grupos estudados. Os resultados da comparação apontaram correlação positiva nos grupos de NIC III na região epitelial ($r=0,66$; $p=0,004$), na camada basal do epitélio ($r=0,66$; $p=0,04$) e na região perivascular ($r=0,84$; $p=0,002$).

5.10 Correlação da distribuição da expressão de células CD1a⁺ e CCL20⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical

A avaliação da correlação da distribuição da expressão de CD1a e CCL20 foi realizada em todas áreas de cada um dos grupos estudados. Os resultados da comparação apontaram correlação positiva na região epitelial nos grupos de NIC III ($r=0,75$; $p=0,001$). Nos grupos controle a correlação foi observada em todas regiões: epitelial ($r=0,69$; $p=0,02$), camada basal do

epitélio ($r=0,76$; $p=0,001$), córion ($r=0,95$; $p=0,001$) e perivascular ($r=0,75$; $p=0,02$).

5.11 Correlação da distribuição da expressão de células CCR6⁺ e CCL20⁺ nas diferentes fases de lesões precursoras de câncer cervical.

A avaliação da correlação da distribuição da expressão de CCL20 e CCR6 foi realizada em todas áreas de cada um dos grupos estudados. Os resultados da comparação apontaram correlação positiva na região epitelial dos grupos de NIC I ($r=0,58$; $p=0,01$), NIC II ($r=0,50$; $p=0,04$); NIC III ($r=0,96$; $p<0,01$). Na camada basal do epitélio a correlação foi comprovada nos grupos de NIC I ($r=0,98$; $p<0,001$), NIC II ($r=0,98$; $p<0,001$); NIC III ($r=0,95$ $p<0,01$). A região do córion apresentou correlação positiva nos grupos de NIC I ($r=0,92$; $p<0,01$), NIC II ($r=0,82$; $p<0,001$); NIC III ($r=0,70$; $p<0,02$). Entretanto, na região perivascular a correlação foi comprovada nos grupos de NIC II ($r=0,96$; $p<0,001$); NIC III ($r=0,92$; $p=0,01$) e controle ($r=0,83$; $p<0,01$).

6 DISCUSSÃO

Apesar da comprovação da presença do HPV, na maioria das amostras de neoplasia intraepitelial de baixo e alto graus, somente um percentual pequeno das mulheres desenvolve câncer (GALANI & CHRISTODOULOU, 2009). A busca de outros fatores, indutores da carcinogênese, que aliados à infecção viral pudessem contribuir com o processo de evolução dessas infecções para a malignidade (SHIELDS *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2015) tem sido alvo de inúmeros estudos. A condição social, os hábitos sexuais bem como os fatores genéticos e comportamentais surgem ao lado de outros, como o próprio sistema imunológico, como possíveis co-fatores (PATEL & CHIPLUNKAR, 2009).

Apesar dos inúmeros estudos em busca desses fatores, admite-se que a infecção persistente por HPVs de alto risco oncogênico seja o mais importante destes (SOUSA *et al.*, 2011). Em nossa pesquisa, realizamos a coleta de dados clínico comportamentais que aliados à infecção viral pudessem fornecer maior entendimento destes fatores. Os resultados sugerem o tabagismo como um importante fator de risco. Pesquisadores relatam que o muco cervical de fumantes apresenta constituintes e metabólitos do cigarro, e evidenciam que estes podem acarretar alterações no ciclo celular (GRITZ *et al.*, 2005; ALAM *et al.*, 2008; FONSECA-MOUTINHO, 2011). Corroborando estes achados, pesquisas evidenciam que apesar do tabagismo estar relacionado como fator de risco comportamental para o desenvolvimento de neoplasia cervical, o hábito de fumar é um fator independente para carcinogênese, sendo considerado o principal fator de risco para diversos tipos de câncer de cabeça e pescoço (GRITZ *et al.*, 2005; JEMAL *et al.*, 2011).

A interligação entre o HPV, agente infeccioso e carcinogênico, com o sistema imune de mucosa acarreta alterações funcionais de grande impacto para o controle celular (TOMMASINO *et al.*, 2003; PYEON *et al.*, 2007). O estudo de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana permitiu a comprovação da estreita função da resposta imune mediada pelas células T e dendríticas na ocorrência da carcinogênese associada ao HPV

(SZAREWSKI *et al.*, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2004; STANLEY, 2006). Portanto, compreender a resposta imunológica cervical induzida pelo HPV que leve ao controle das lesões, bem como aos mecanismos que tornam o ambiente favorável à progressão de lesões, e conseqüente malignidade, vem se tornando alvo para a busca de marcadores de prognóstico, novas vacinas e medicamentos. Em vista disso, o nosso trabalho teve como objetivo avaliar a ativação de linfócitos T, induzidas pelo HPV em lesões cervicais benignas e pre-malignas.

Nossos resultados mostraram não haver diferença significativa na distribuição das células CD45RA⁺ (*naive*) no epitélio entre os grupos com lesão e os controles. A nosso conhecimento, não identificamos trabalhos anteriores relatando o perfil destas células em fragmentos de colo uterino. Contudo, células de raspagem do colo uterino, de pacientes com NIC, apresentaram elevada frequência da população T CD45RA⁺ na região epitelial das participantes em que houve regressão da lesão (KOJIMA *et al.*, 2011). O resultado da presente pesquisa revelou aumento da população de células com fenótipo T CD45RA⁺ na região epitelial em pacientes com lesões pré-malignas (NIC III) em relação ao controle. Esta associação foi também identificada em participantes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, comprovando um aumento desta população, em sangue periférico, quando comparadas com o grupo de participantes saudáveis, sinalizando aumento da população de células *naive* em acordo com a gravidade das lesões (TURKSMA *et al.*, 2013). Este marcador é frequentemente identificado em populações celular de sangue periférico. Assim, Pita-Lopez e colaboradores (2014) relataram a redução da população de células com fenótipo T CD45RA⁺, no sangue periférico dos indivíduos com NIC I em relação ao grupo controle, associado a presença de infecção persistente pelo HPV. Outros estudos que revelem associação dos resultados em sangue periférico e no sítio da lesão são necessários.

Entre as distintas populações de células T, a população CD45RO⁺ revela um fenótipo de células ativadas de memória. A presença aumentada dessa população celular em conjunto com outros marcadores, do tipo CD4, CD8 e CD27 nos diferentes estágios de NIC, pode ser um indicativo de lesões persistentes, uma característica importante para a progressão de lesões pré-

malignas e consequente câncer cervical (RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Nossos resultados indicam a distribuição de células com esse fenótipo em toda a extensão do tecido cervical e, sugerem que essa população celular encontra-se mais frequente na região do córion em todos os grupos analisados, tendo distribuição marcante em pacientes com NIC III, sugerindo que o aumento das células com fenótipo CD45RO⁺ na região do córion pode ser indicativo de prognóstico mais grave. Um perfil semelhante foi descrito por Monnier-Benoit e colaboradores (2006) quando compararam o infiltrado de células CD45RO⁺ em participantes com diagnóstico de NIC I, NIC II/NIC III, NIC III e carcinoma invasivo. De modo interessante, Maluf e colaboradores (2008) realizaram um estudo longitudinal de voluntárias antes e após conização/histerectomia, e não comprovaram associação da recorrência de lesão com o aumento da população CD45RO⁺, indicando possivelmente que este fenótipo esteja associado ao agravamento das lesões cervicais, mas não à cura. Não realizamos a distinção de células TCD4⁺ ou CD8⁺ apresentando o fenótipo de memória, contudo em resultados prévios observamos que a população TCD8⁺ foi marcante em lesões de alto grau (FERNANDES *et al.*, 2013). Estes resultados podem ser comparados aos de Monnier-Benoit e colaboradores (2006), e sugerem que predominância de TCD4⁺ pode ser indicativo de regressão em lesões benignas (NIC I), enquanto a predominância de TCD8⁺ direciona para a gravidade das lesões. Em tecido intra-tumoral de pacientes com câncer cervical foi observado aumento de células Th17/CD45RO⁺, população celular com função crucial na resposta inflamatória, autoimunidade e em correlação com o câncer cervical (YU *et al.*, 2015). Nossos resultados em consonância com a literatura mostra uma associação com aumento da presença de células CD45RO⁺ e a carcinogênese. Contudo, este perfil não pode ser associado a outros tipos tumorais, como por exemplo o câncer de mama (YAJIMA *et al.*, 2015). Estudos *in situ* com marcações duplas/triplas poderiam identificar a localização das subpopulações de células T e seus estágios de maturação durante a evolução para câncer cervical.

A expressão da molécula CD1a em LCs denota a capacidade que estas células possuem de apresentar antígenos às células T. Uma marcante redução no número de LCs foi observada em áreas de infecções pelo HPV (GIANNINI *et al.*, MATTHEWS *et al.*, 2003), sendo compatível com os nossos

resultados. Nosso dados mostram uma associação positiva entre os diferentes graus de lesão e a diminuição de LCs, estando assim, diretamente relacionada à carcinogênese, como demonstrado por Caberg e colaboradores (2008) e Jiang & Xue (2015). Zimmermann e colaboradores (2012) mostraram que esta diminuição é responsável pelo agravamento das lesões cervicais e surgimento de câncer em pacientes HIV-positivas. A diminuição de LCs, foi observada em todas as áreas do tecido cervical, mas mais frequentemente encontrada na região do corion em pacientes infectadas pelo HPV. Esses resultados são conflitantes com os apresentados na pesquisa que teve como objetivo principal revelar a presença de populações de células dendríticas maduras (CD83⁺) e imaturas (CD1a⁺) nos diferentes estágios de lesão cervical (HAYATI & ZULKARNAEN, 2007). Nesse estudo a maior densidade de LCs foi comprovada na região da camada basal do epitélio, enquanto no córion apenas poucas células foram observadas. A mesma pesquisa também comprovou resultados semelhantes aos nossos, ao revelar que não houve diferença significativa no número de LCs entre os grupos controle e NIC III. Observamos uma elevada variância no número de LCs nos indivíduos controles, o que pode ter influenciado esta análise. Em relação ao câncer cervical foi demonstrado uma menor frequência de LCs CD1a⁺ em comparação aos pacientes com NIC III, bem como os indivíduos saudáveis (HAYATI & ZULKARNAEN, 2007; CABERG *et al.*, 2008; JIANG & XUE, 2015). A baixa frequência/depleção de LCs CD1a⁺ mostrou ser um potencial biomarcador para a carcinogênese cervical. A diminuição da expressão de e-caderina pelos queratinócitos infectados pode explicar a diminuição da migração desta célula, bem como sua fixação ao epitélio, onde ocorre a infecção pelo HPV (MATTHEWS *et al.*, 2003).

A quimiocina CCL20 constitutivamente expressa em uma ampla variedade de células e tecidos normais, sugere o envolvimento do eixo CCL20 e de seu receptor CCR6 em processos fisiológicos e patológicos (CHARBONNIER *et al.*, 1999; SHUTYSER *et al.*, 2003). CCL20 participa de modo importante na migração de subtipos de DCs, células B e células T para superfícies mucosas (SHUTYSER *et al.*, 2003; CRANE-GODREAU & WIRA, 2005). Observamos um decréscimo no número de células expressando esta quimiocina na região epitelial, sítio da infecção, em todos os grupos de SIL e

um marcante aumento na região do córion, associado ao agravamento das lesões. As oncoproteínas E6 e E7 de HPV de baixo (HPV 6 e 11) e alto risco (HPV 16) oncogênico podem influenciar a transcrição de CCL20 nos queratinócitos infectados em estudos *in vitro* (GUESS & McCANCE, 2005; CABERG *et al.*, 2008), indicando que o HPV possa estar modulando negativamente a expressão desta quimiocina no epitélio, bloqueando a migração de células inflamatórias, tais como as LCs (JIANG & XUE, 2015), expressando CCR6, para o sítio da lesão. Um elevado número de células CCL20⁺ foi também identificado na região do corion de pacientes com carcinoma *in situ* escamoso (WALCH-RUCKEIM *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* demonstram que queratinócitos infectados podem induzir uma potente expressão de CCL20 por fibroblastos estromais, o que possivelmente poderia explicar o aumento da frequência destas células nesta região (WALCH-RUCKEIM *et al.*, 2015). Da mesma forma, aumento na expressão de microRNA21, induzido por E6 e E7 de HPV16, pode levar a diminuição da expressão de CCL20 e a agressão tumoral e carcinogênese (YAO & LIN, 2012). Estes resultados corroboram a hipótese de que esta pode ser uma maneira do HPV evadir o sistema imune.

CCR6, o receptor da quimiocina CCL20, é expresso principalmente em queratinócitos normais, e é negativamente modulado após maturação das LCs (DIEU-NOSJEAN *et al.*, 2001). Acredita-se haver a participação de receptores de quimiocina no desenvolvimento de metástase (MULLER *et al.*, 2001; TAKANAMI, 2003).

Entretanto, poucos estudos descrevem a relação entre a expressão do receptor CCR6 e o câncer cervical. Na presente pesquisa, células CCR6⁺ foram raramente identificadas na região epitelial em todos os grupos com NIC, bem como no grupo controle. Contudo, uma significativa diminuição foi identificada no corion em pacientes com NIC II e III em relação ao grupo controle. Linfócitos Th17 intratumorais isolados de câncer cervical expressam em sua maioria o receptor CCR6, com perfil de células ativadas e são três vezes mais frequentes que em áreas não tumorais (YU *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* mostram que estas células migram para a lesão através do eixo CCR6/CCL20 (YU *et al.*, 2015), mostrando a importância deste eixo para o desenvolvimento do câncer cervical e poderia ser um alvo para aplicações

terapêuticas. Contudo, pouco é sabido sobre a migração celular nas lesões pre-malignas cervicais. Em câncer oral a presença de células CCR6⁺ foi identificada em IL-17⁺ FOXP3⁺ e parece estar relacionada a supressão de células CD4⁺ CD25⁻ *in vitro*. O eixo de interação CCR6/CCL20 tem sido bem estudado no câncer colorretal, onde foi comprovada associação com o desenvolvimento de metástase (GHADJAR *et al.*, 2009). A melhor caracterização deste eixo deve ser analisada nas infecções persistentes pelo HPV, nas lesões precursoras e conseqüentemente na evolução maligna para o câncer cervical, bem como sua ligação com HPVs de baixo e alto risco oncogênico.

Nosso estudo revela que células da resposta imunológica (Langerhans e linfócitos T), migram em direção à região epitelial onde ocorre a infecção viral, e conseqüente, os distintos graus de lesões cervicais. No entanto, elas margeiam a lesão, concentrando-se no córion. Isto pode corroborar com outras pesquisas, que indicam que o HPV possa influenciar no microambiente da lesão, alterando a expressão de quimiocinas e citocinas importantes no recrutamento de células inflamatórias no local de infecção. Ainda há muito o que ser estudado e elucidado sobre o papel do HPV na carcinogênese cervical e, posterior ativação da resposta imune, o que poderá contribuir para o desenho de uma vacina terapêutica que auxilie no controle das lesões cervicais associadas ao HPV.

7 PRINCIPAIS ACHADOS

✓ Nosso estudo sugere que a infecção pelo HPV influencia o microambiente das lesões cervicais de baixo grau;

✓ As células T *naïves* (CD45RA⁺) estão raramente presentes na cérvix uterina normal. Durante a infecção pelo HPV o perfil celular não se altera nas fases iniciais das lesões, principalmente no epitélio. Contudo, uma elevação pode ser vista em lesões de alto grau, sugerindo uma migração celular tardia;

✓ Há a presença de células ativadas (CD45RO⁺) na cérvix normal em todas as áreas estudadas. Essas células estão aumentadas no corion de lesões de alto grau, em especial no NIC III, dobrando de valor em relação ao colo uterino do grupo controle, demonstrando que em lesões de maior gravidade, o processo inflamatório é ativado, impedindo que células neoplásicas invadam o corion, caracterizando o carcinoma cervical invasivo;

✓ A distribuição de LCs diminui de acordo com a gravidade das lesões cervicais associadas à infecção pelo HPV, sugerindo que este vírus possa influenciar o microambiente da lesão, bloqueando a migração das LCs, e assim, no seu reconhecimento;

✓ A distribuição de células expressando CCL20 é aumentada no corion, contudo, diminuída na região epitelial em lesões de colo uterino quando comparado com o controle, sugerindo que a infecção pelo HPV pode alterar a expressão desta quimiocina pelos queratinócitos, influenciando negativamente a migração celular para o sítio da infecção;

✓ As células que expressam o receptor CCR6, principalmente linfócitos de memória e células dendríticas, são raras no epitélio, local da replicação viral, mas no córion nas lesões associadas com a infecção pelo HPV são encontradas em abundância, sugerindo que a quimiocina CCL20 possa estar influenciando a migração de células inflamatórias para o sítio de lesão.

8 CONCLUSÃO

Nosso trabalho sugere que a infecção pelo HPV modula negativamente a migração das células inflamatórias durante a evolução das lesões cervicais pre-malignas. Um dado que corrobora esta hipótese é a diminuição das LCs/CD1a⁺, principal célula apresentadora de antígenos no colo uterino, relacionada a gravidade das lesões. Estas células migram para a cervix através da quimiocina CCL20, constitutivamente expressa em queratinócitos. Evidenciamos uma diminuição desta quimiocina, logo influenciando diretamente a migração de LCs. De modo interessante as células inflamatórias presentes no córion expressam o receptor CCR6, mas não migram para o local da infecção, possivelmente pela diminuição de CCL20 pelos queratinócitos. Com o avanço da gravidade das lesões cervicais é possível observar que a frequência das subpopulações de células T *naives* e de memória está elevada, mostrando mais uma vez que a migração destas células para o sítio da infecção esta comprometido pela diminuição de CCL20. A análise do eixo CCL20/CCR6 poderá identificar a evolução para lesões mais graves e até mesmo o câncer cervical.

Estudos prospectivos e/ou de coorte podem auxiliar na validação destes marcadores para a indução da carcinogênese cervical e identificar potenciais biomarcadores ou mesmo alvos para terapia.

9 BIBLIOGRAFIA

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

ALAM, S.; CONWAY, M.J.; CHEN, H.S. et al. The cigarette smoke carcinogen benzo [a] pyrene enhances human papillomavirus synthesis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 2, p. 1053-1058, 2008.

ALTIN, J.G.; SLOAN, E.K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. **Immunology & Cell Biology**, v. 75, n. 5, 1997.

AMADOR-MOLINA, A.; HERNÁNDEZ-VALENCIA, J.F., LAMOYI, E. et al. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624-2642, 2013.

ANDERSON, A. C. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 5, p. 393-398, 2014.

ARREYGUE-GARCIA, N.A.; DANERI-NAVARRO, A.; TORO-ARREOLA, A. et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.

BABA, M.; IMAI, T.; NISHIMURA, M. et al. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 23, p. 14893-14898, 1997.

BAITSCH, L.; FUERTES-MARRACO, S.A.; LEGAT, A. et al. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. **Trends in immunology**, v. 33, n. 7, p. 364-372, 2012.

BARBAROUX, J. B.; KWAN, W. H., ALLAM, J. P. et al. Tumor necrosis factor- α -and IL-4-independent development of Langerhans cell-like dendritic

cells from M-CSF-conditioned precursors. **Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 1, p. 114-120, 2006.

BECKER, Y. Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells – a review. **Virus Genes**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2003.

BERARD, M.; TOUGH, D. F. Qualitative differences between naive and memory T cells. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 127-138, 2002.

BERMÚDEZ-MORALES, V. H.; GUTIERREZ, L.X.; ALCOCER-GONZALEZ J.M. et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer Investigation**, v. 26, n. 10, p. 1037-1043, 2008.

BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; VAN DOORSLAER, K. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010.

BLACK, A. P.; ARDEM-JONES, M. R.; KASPROWICZ, V. et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 6, p. 1485-1493, 2007.

BOLPETTI, A.; SILVA J.S.; VILLA, L.L. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

BOSCH, F.X.; BROKER, T.R.; FORMAN D. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, v. 31, p. H1-H31, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 176 p. : il. ISBN 978-85-334-2164-6.

BRYCESON, Y.T.; LONG, E.O. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 3, p. 344-352, 2008.

CABERG, J.H.; HUBERT, P.M.; BEGON, D.Y. et al. Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 7, p. 1441-1447, 2008.

CAMPBELL, J. J.; MURPHY, K.E.; KUNKEL, E.J. et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 877-884, 2001.

CAO, Y.; ZHOU, X.; HUANG, X. et al. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53834, 2013.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. et al. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 20-8, 2003.

CATROXO, M.H.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; PETRELLA, S. et al. Estudio Ultraestructural del Virus Papiloma Bovino Durante Brotes en Brasil. **International Journal of Morphology**, v. 31, n. 2, p. 777-784, 2013.

CHARBONNIER, A. S.; KOHRGRUBER, N.; KRIEHLER, E. et al. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal Langerhans cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 12, p. 1755-1768, 1999.

CHEN, K.J.; LIN, S.Z.; XIE, H.Y. et al. Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e24671, 2011.

CHOW, L.T.; BROKER, T.R.; STEINBERG, B.M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Apmis**, v. 118, n. 6-7, p. 422-449, 2010.

CONG, J.; RIMING, L.; WANG, X.; et al. Association between interleukin-17 gene polymorphisms and the risk of cervical cancer in a Chinese population. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, p. 9567, 2015.

CRANE-GODREAU, M. A.; WIRA, C. R. CCL20/macrophage inflammatory protein 3 α and tumor necrosis factor alpha production by primary uterine epithelial cells in response to treatment with lipopolysaccharide or Pam3Cys. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 476-484, 2005.

CULP, T.D.; CHRISTENSEN, N.D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 152-161, 2004.

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J.; GRIFFITHS, C.E. et al. Langerhans cell migration. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 25, n. 5, p. 413-418, 2000.

DE JONG, A.; VAN POELGEEST, M.I., VAN DER HULST, J.M. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5449-5455, 2004.

DELIGEOROGLU, E.; GIANNOULI, A.; ATHANASOPOULOS, N. et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, Article ID 540850, 9 pages, 2013.

DIEU-NOSJEAN, M. C.; ANTOINE, M.; DANIEL, C. et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 27, p. 4410-4417, 2008.

DIEU-NOSJEAN, M.C.; MASSACRIER, C.; HOMEY, B. et al. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans

cell precursors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 5, p. 705-718, 2000.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science**, v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. S1, p. 2-23, 2015.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, 30: F55–F70, 2012.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H. et al. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863-3890, 2015.

FAGIN, U.S.P.; GROSS, W.L.; LAMPRECHT, P. et al. Increased frequency of CCR4+ and CCR6+ memory T-cells including CCR7+ CD45RA med very early memory cells in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 2, p. 1, 2012.

FONSECA-MOUTINHO, J.A. Smoking and cervical cancer. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, 2011.

FRICK, V.O.; RUBIE, C.; KEILHOLZ, U. et al. Chemokine/chemokine receptor pair CCL20/CCR6 in human colorectal malignancy: An overview. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 833, 2016.

FRIDMAN, W. H.; PAGES, F.; SAUTES-FRIDMAN, C. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012.

FULLER, M. J.; ZAJAC, A. J. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 477-486, 2003.

GALANI, E.; CHRISTODOULOU, C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 11, p. 977-981, 2009.

GALON, J.; FRIDMAN, W. H.; PAGES, F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. **Cancer research**, v. 67, n. 5, p. 1883-1886, 2007.

GALON, J.; PAGÈS, F.; MARINCOLA, F. M. et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. **Journal of translational medicine**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012.

GARCIA-IGLESIAS, T.; DEL TORO-ARREOLA, A.; ALBARRAN-SOMOZA, B. et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 186, 2009.

GHADJAR, P.; RUBIE, C.; AEBERSOLD, D.M. et al. The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 4, p. 741-745, 2009.

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

GOLDBERG, M. V.; & DRAKE, C. G. LAG-3 in cancer immunotherapy. In: **Cancer Immunology and Immunotherapy**. Springer Berlin Heidelberg. p. 269-278, 2010.

GOLDEN-MASON, L.; PALMER, B. E.; KASSAM, N. et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. **Journal of virology**, v. 83, n. 18, p. 9122-9130, 2009.

GONÇALVES, M.A.; SOARES, E.G.; FERNANDES, A.P. et al. Langerhans' cell count and HLA class II profile in cervical intraepithelial neoplasia in the presence or absence of HIV infection. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 114, n. 2, p. 221-227, 2004.

GRITZ, E.R.; DRESLER, C.; SARNA, L. Smoking, the missing drug interaction in clinical trials: ignoring the obvious. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 10, p. 2287-2293, 2005.

GROSSO, J. F.; KELLEHER, C. C.; HARRIS, T. J. et al. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self-and tumor-tolerance systems. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3383-3392, 2007.

GUESS, J.C.; MCCANCE, D.J. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14852-14862, 2005.

HALAMA, N.; MICHEL, S.; KLOOR, M. et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. **Cancer research**, v. 71, n. 17, p. 5670-5677, 2011.

HAMMES, L.S.; TEKMAL, R.R.; NAUD, P. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression—clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 157-165, 2007.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAO, N.B.; LÜ, M.H.; FAN, Y.H. et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, vol. 2012, Article ID 948098, 11 pages, 2012.

HAYATI, A.R.; ZULKARNAEN, M. An immunohistochemical study of CD1a and CD83-positive infiltrating dendritic cell density in cervical neoplasia. **International Journal of Gynecologic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 83-88, 2007.

HE, J.; HU, Y.; HU, M. et al. Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

HIBMA, M.H. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. **The Open Virology Journal**, v. 6, n. 1, 2012.

HINKULA, M.; KAUPPILA, A.; NÄYHÄ, S. et al. Cause-specific mortality of grand multiparous women in Finland. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 4, p. 367-373, 2006.

HINKULA, M.; PUKKALA, E.; KYRÖNEN, P. et al. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 5, p. 1025-1029, 2004.

HUBERT, P.; BOUSARGHIN, L.; GREIMERS, R. et al. Production of large numbers of Langerhans' cells with intraepithelial migration ability in vitro. **Experimental Dermatology**, v. 14, n. 6, p. 469-477, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Vigilância e Análise de Situação da Coordenação de Prevenção e Vigilância do INCA/ Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JENSEN, K. E.; SCHMIEDEL, S.; NORRILD, B. et al. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 1, p. 234-239, 2013.

JIANG, B.; XUE, M. Correlation of E6 and E7 levels in high-risk HPV16 type cervical lesions with CCL20 and Langerhans cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 10473-10481, 2015.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell death & disease**, v. 6, n. 6, p. e1792, 2015.

JIMENEZ-PEREZ, M.; JAVE-SUAREZ, L.F., ORTIZ-LAZARENO, P.C. et al. Cervical cancer cell lines expressing NKG2D-ligands are able to down-modulate the NKG2D receptor on NKL cells with functional implications. **BMC Immunology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012.

KAHAN, S. M.; WHERRY, E. J.; ZAJAC, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. **Virology**, v. 479, p. 180-193, 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

Keir, M. E.; Butte, M. J.; Freeman, G. J. KEIR, Mary E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 677-704, 2008.

KIM, E. S.; KIM, J. E.; PATEL, M. A. et al. Immune checkpoint modulators: an emerging antiglioma armamentarium. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

KIRILOVSKY, A.; MARLIOT, F.; EL SISSY, C. et al. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. **International immunology**, p. dxw021, 2016.

KISIELOW, M.; KISIELOW, J.; CAPOFERRI-SOLLAMI, G. et al. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. **European journal of immunology**, v. 35, n. 7, p. 2081-2088, 2005.

KOJIMA, S.; KAWANA, K.; FUJII, T et al. Characterization of Gut-Derived Intraepithelial Lymphocyte (IEL) Residing in Human Papillomavirus (HPV)-Infected Intraepithelial Neoplastic Lesions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. 5, p. 435-443, 2011.

KONDO, T.; TAKATA, H.; TAKIGUCHI, M. Functional expression of chemokine receptor CCR6 on human effector memory CD8+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 54-65, 2007.

LE BORGNE, M.; ETCHART, N.; GOUBIER, A. et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 191-201, 2006.

LEBRE, M. C.; VAN DER AAR, A. M.; VAN BAARSEN, L. et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 2, p. 331-341, 2007.

LEE, A.; ERI, R.; LYONS, A. B. et al. CC chemokine ligand 20 and its cognate receptor CCR6 in mucosal T cell immunology and inflammatory bowel disease: odd couple or axis of evil?. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 194, 2013.

LEPIQUE, A.P.; DAGHASTANLI, K.R., CUCCOVIA, I.M. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 13, p. 4391-4400, 2009.

LI, B.; SEVERSON, E.; PIGNON, J. C. et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 174, 2016.

LIU, J.; Ke, F.; Xu, Z. et al. CCR6 is a prognostic marker for overall survival in patients with colorectal cancer, and its overexpression enhances metastasis in vivo. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. e101137, 2014.

LUHN, P.; WALKER, J.; SCHIFFMAN, M. et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 128, n. 2, p. 265-270, 2013.

MAÇON-LEMAÎTRE, L.; TRIEBEL, F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. **Immunology**, v. 115, n. 2, p. 170-178, 2005.

MALUF, P.J.; MICHELIN, M.A.; ETCHEBEHERE, R.M. et al. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 278, n. 6, p. 525-530, 2008.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

MARRACO, S. A.; NEUBERT, N. J.; VERDEIL, G. et al. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2015.

MATTHEWS, K.; LEONG, C.M.; BAXTER, L. et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8378-8385, 2003.

MEISELS, A.; FORTIN, R.; ROY, M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 33, n. 3, p. 198-200, 1978.

MELSHEIMER, P.; VINOKUROVA, S.; WENTZENSEN, N. et al. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 3059-3063, 2004.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 935-947, 2008.

MEZACHE, L.; PANICCIA, B.; NYINAWABERA, A. et al. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. **Modern Pathology**, 2015.

MILLER, C.J. HIV transmission: Migratory Langerhans cells are primary targets in vaginal HIV transmission. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 4, p. 269, 2007.

MIZUMOTO, N.; TAKASHIMA, A. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 5, p. 658-660, 2004.

MOERMAN-HERZOG, A.; NAKAGAWA, M. Early defensive mechanisms against human papillomavirus infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 8, p. 850-857, 2015.

MONGELOS, P.; MENDOZA, L.P.; RODRIGUEZ-RIVEROS, I. et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 39, p. 44-49, 2015.

MONNIER-BENOIT, S.; MAUNY, F.; RIETHMULLER, D. et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, v. 102, n. 1, p. 22-31, 2006.

MORSHER, K., POLZ-GRUSZKA, D.; SZYMANSKI, M. et al. Human Papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis. **Otolaryngologia Polska**, v. 68, n. 5, p. 213-219, 2014.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 460-460, 2008.

MÜLLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-56, 2001.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K.M. et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 78, n. 21, p. 11451-11460, 2004.

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

MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C. et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1093-1101, 2002.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679-691, 2009.

NICOL, A.F.; DE ANDRADE, C.V.; RUSSOMANO, F.B. et al. HPV vaccines: their pathology-based discovery, benefits, and adverse effects. **Ann Diagn Pathol**. v. 19, n. 6, p. 418-22, 2015.

OCAÑA GUZMÁN, A.R.; TORRE, L.; SADA, I. TIM-3 REGULATES DISTINCT FUNCTIONS IN MACROPHAGES. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 229, 2016.

ODORIZZI, P. M.; WHERRY, E. J. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 2957-2965, 2012.

OGINO, S.; GALON, J.; FUCHS, C. S. et al. Cancer immunology—analysis of host and tumor factors for personalized medicine. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 8, n. 12, p. 711-719, 2011.

OKAZAKI, T.; HONJO, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. **International immunology**, v. 19, n. 7, p. 813-824, 2007.

OUWEHAND, K.; SANTEGOETS, S.J.; BRUYNZEEL, D.P. et al. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 11, p. 3050-3059, 2008.

OUWEHAND, K.; SCHEPER, R.J., DE GRUIJL, T.D. et al. Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 7, p. 2026-2034, 2010.

PALEFSKY, J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 1, p. 52, 2009.

PATEL, S.; CHIPLUNKAR, S. Host immune responses to cervical cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 21, n. 1, p. 54-59, 2009.

PEÑA-CRUZ, V.; ITO, S.; DASCHER, C.C. et al. Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 3, p. 517-521, 2003.

PITA-LOPEZ, M.L.; ORTIZ-LAZARENO, P.C.; NAVARRO-MEZA, M. et al. CD28-, CD45RA null/dim and natural killer-like CD8+ T cells are increased in peripheral blood of women with low-grade cervical lesions. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

POLAK, M.E.; THIRDBOROUGH, S.M.; UNG, C.Y. et al. Distinct molecular signature of human skin Langerhans cells denotes critical differences in cutaneous dendritic cell immune regulation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 3, p. 695-703, 2014.

PRINCE, L.R.; WHYTE, M.K.; SABROE, I. et al. The role of TLRs in neutrophil activation. **Curr Opin Pharmacol**. 2011 Aug;11(4):397-403. doi: 0.1016/j.coph.2011.06.007. Epub 2011 Jul

PYEON, D.; NEWTON, M.A.; LAMBERT, P.F. et al. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus–positive and human papillomavirus–negative head/neck and cervical cancers. **Cancer Research**, v. 67, n. 10, p. 4605-4619, 2007.

QUINT, K.D.; GENDERS, R.E.; DE KONING, M.N. et al. Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. **The Journal of Pathology**, v. 235, n. 2, p. 342-354, 2015.

RAMOS, C.A.; NARALA, N.; VYAS, G.M. et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy of HPV-associated malignancies. **Journal of Immunotherapy**, v. 36, n. 1, p. 66, 2013.

REMENNICK, L.I. Induced abortion as cancer risk factor: a review of epidemiological evidence. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 44, n. 4, p. 259, 1990.

RIBEIRO, A.A.; COSTA, M.C.; ALVES, R.R. et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1, 2015.

RIELLA, L. V.; PATERSON, A. M.; SHARPE, A. H. et al. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 10, p. 2575-2587, 2012.

RODRÍGUEZ, A. C.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; HILDESHEIM, A. et al. Alterations of T-cell surface markers in older women with persistent human papillomavirus infection. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 3, p. 597-607, 2011.

ROMANI, N.; CLAUSEN, B. E.; STOITZNER, P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 120-141, 2010.

ROMANI, N.; TRIPP, C.H.; STOITZNER, P. Langerhans cells come in waves. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 766-768, 2012.

ROURA, E.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA, M. et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, p. 453-466, 2014.

ROY, I.; EVANS, D. B.; DWINELL, M. B. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. **Surgery**, v. 155, n. 6, p. 961, 2014.

SALLUSTO, F.; Lenig, D.; Forster, R. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

SANGHAVI, S. K.; REINHART, T. A. Increased expression of TLR3 in lymph nodes during simian immunodeficiency virus infection: implications for inflammation and immunodeficiency. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 8, p. 5314-5323, 2005.

SANSOM, D. M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?. **Immunology**, v. 101, n. 2, p. 169-177, 2000.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S.. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807-815, 2012.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 4, p. 553-560, 2013.

SCHILLER, J.T.; DAY, P.M.; KINES, R.C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1, p. S12-S17, 2010.

SCHUTYSER, E.; STRUYF, S.; VAN DAMME, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 5, p. 409-426, 2003.

SCHWARZ, T.F.; LEO, O. Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: improving upon nature. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 3, p. S1-S10, 2008.

SEGA, E. I.; LEVESON-GOWER, D. B.; FLOREK, M. et al. Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86551, 2014.

SERÉ, K.; BAEK, J.H.; OBER-BLÖBAUM, J. et al. Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 905-916, 2012.

SHIELDS, T.S.; BRINTON, L.A.; BURK, R.D. et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among US women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 10, p. 1574-1582, 2004.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MANTOVANI, A. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065-1073, 2009.

SOUSA, H.; SANTOS, A.M.; PINTO, D. et al. Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 1, p. 127-134, 2011.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, p. S16-S22, 2006.

STEELE, J.C.; MANN, C.H.; ROOKES, S. et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 2, p. 248-259, 2005.

SUTLU, T.; ALICI, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. **Journal of Internal Medicine**, v. 266, n. 2, p. 154-181, 2009.

SZAREWSKI, A.; MADDIX, P.; ROYSTON, P. et al. The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 108, n. 3, p. 295-303, 2001.

TAKANAMI, I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 105, n. 2, p. 186-189, 2003.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335-376, 2003.

TIEU, R.; AMANCHA, P. K.; VILLINGER, F. et al. TIM-3, a Possible Target for Immunotherapy in Cancer and Chronic Viral Infections. **Austin virology and retro virology**, v. 1, n. 2, 2014.

TOHYAMA, M.; SHIRAKARA, Y.; YAMASAKI, K. et al. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF- α regulated production of macrophage inflammatory protein 3 α /CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 27, n. 2, p. 130-139, 2001.

TOMMASINO, M.; ACCARDI, R.; CALDEIRA, S. et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. **Human Mutation**, v. 21, n. 3, p. 307-312, 2003.

TRIMBLE, C.L.; CLARK, R.A.; THOBURN, C. et al. Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T cells from dysplastic epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 11, p. 7107-7114, 2010.

TRISTÃO, W.; RIBEIRO, R.M.P.; OLIVEIRA, C.A. et al Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. **Braz J Otorhinolaryngol**, 78(4):66-70, 2012.

TURKSMA, A.W.; BONTKES, H.J.; VAN DEN HEUVEL, H. et al. Effector memory T-cell frequencies in relation to tumour stage, location and HPV status in HNSCC patients. **Oral Diseases**, v. 19, n. 6, p. 577-584, 2013.

UCHIMURA, N.S.; RIBALTA, J.; FOCCHI, J. et al. Influência do uso de anticoncepcionais hormonais orais sobre o número de células de Langerhans em mulheres com captura híbrida negativa para papilomavírus

humano. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 27, n. 12, p. 726-30, 2005.

UM, T.H.; LEE, E.H.; CHI, H.S. et al. Comparison of HPV genotyping assays and Hybrid Capture 2 for detection of high-risk HPV in cervical specimens. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 41, n. 1, p. 48-55, 2011.

VERDIJK, P.; DIJKMAN, R.; PLASMEIJER, E. I. et al. A lack of Birbeck granules in Langerhans cells is associated with a naturally occurring point mutation in the human Langerin gene. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 4, p. 714-717, 2005.

VILLABLANCA, E.J.; MORA, J.R. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 11, p. 2975-2980, 2008.

VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E. et al. Cancer genome landscapes. **science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.

WALCH-RÜCKHEIM, B.; MAVROVA, R.; HENNING, M. et al. Stromal Fibroblasts Induce CCL20 through IL6/C/EBP β to Support the Recruitment of Th17 Cells during Cervical Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 75, n. 24, p. 5248-5259, 2015.

WANG, C.; KANG, S.G.; LEE, J. et al. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 2, p. 173-183, 2009.

WANG, J.; XI, L.; HUNT, J. L. et al. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. **Cancer Research**, v. 64, n. 5, p. 1861-1866, 2004.

WHERRY, E. J.; BLATTMAN, J.N.; MURALI-KRISHNA, K. et al. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. **Journal of virology**, v. 77, n. 8, p. 4911-4927, 2003.

WILLIAMS, O.M.; HART, K.W.; WANG E.C.Y. et al. Analysis of CD4+ T-cell responses to human papillomavirus (HPV) type 11 L1 in healthy adults reveals a high degree of responsiveness and cross-reactivity with other HPV types. **Journal of Virology**, v. 76, n. 15, p. 7418-7429, 2002.

WINER, R.L.; HUGHES, J.P.; FENG, Q. et al. Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 4, p. 699-707, 2011.

WORKMAN, C. J.; VIGNALI, Dario A. A. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 688-695, 2005.

XI, L.F.; KOUTSKY, L. A.; CASTLE, P. E. et al. Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 12, p. 3490-3496, 2009.

YAJIMA, R.; YAJIMA, T.; FUJII, T. et al. Tumor-infiltrating CD45RO+ memory cells are associated with a favorable prognosis breast cancer. **Breast Cancer**, p. 1-7, 2015.

YANG, K.; PUEL, A.; ZHANG, S. et al. Human TLR-7,-8-, and-9-mediated induction of IFN- α/β and- λ is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 465-478, 2005.

YAO, T.; LIN, Z. MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 2, p. 248-260, 2012.

YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 474-481, 2010.

YU, Q.; LOU, X.; HE, Y. Preferential recruitment of Th17 cells to cervical cancer via CCR6-CCL20 pathway. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0120855, 2015.

ZAVALA, W. D.; DE SIMONE, D. S.; SACERDOTE, F. L. et al. Variation in Langerhans cell number and morphology between the upper and lower

regions of the human esophageal epithelium. **The Anatomical Record**, v. 268, n. 4, p. 360-364, 2002.

ZHANG, C.Y.; QI, Y.; LI, X.N. et al. The role of CCL20/CCR6 axis in recruiting Treg cells to tumor sites of NSCLC patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 69, p. 242-248, 2015.

ZHANG, Y.; MA, D.; ZHANG, Y. et al. The imbalance of Th17/Treg in patients with uterine cervical cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11, p. 894-900, 2011.

ZHONG, X.; BAI, C.; GAO, W. et al. Suppression of expression and function of negative immune regulator PD-1 by certain pattern recognition and cytokine receptor signals associated with immune system danger. **International immunology**, v. 16, n. 8, p. 1181-1188, 2004.

ZIMMERMANN, J.B.; GOBBI, H.; ALVES, M.J. et al. Langerhans cell density in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection in HIV-infected and HIV-noninfected Brazilian women. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 22, n. 8, p. 1291-1296, 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260-265, 2009.

10 ANEXOS

10.1 Calendário Vacinal 2015

CALENDÁRIO VACINAL 2015
RECOMENDAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA

	IDADE												
	Ao nascer	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses	7 meses	12 meses	15 meses	18 meses	4 a 6 anos	11 anos	14 a 16 anos
BCG ID ¹	■												
Hepatite B ²	■	■		■		■							
DTP/DTPa ³		■		■		■			■		■		
dT/dTpa ⁴													■
Hib ⁵		■		■		■			■				
VIP/VOP ⁶		■		■		■			■		■		
Pneumocócica conjugada ⁷		■		■		■		■					
Meningocócica C e A,C,W,Y conjugadas ⁸			■		■			■			■	■	
Meningocócica B recombinante ⁹			■		■		■	■					
Rotavírus ¹⁰		■		■		■							
Influenza ¹¹						■	■						
SCR/Varicela/SCRV ¹²								■	■				
Hepatite A ¹³								■		■			
Febre amarela ¹⁴	A partir dos 9 meses de idade												
HPV ¹⁵	Meninos e Meninas a partir dos 9 anos de idade												

10.2 Calendário Nacional de Vacinação 2016 - Recomendação

CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO 2016
RECOMENDAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA

	IDADE												
	Ao nascer	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses	7 meses	12 meses	15 meses	18 meses	4 anos	11 anos	14 anos
BCG ID ¹	●												
Hepatite B ²	●	●		●		●							
DTP/DTPa ³		●		●		●			●		●		
dT/dTpa ⁴													●
Hib ⁵		●		●		●			●				
VIP/VOP ⁶		●		●		●			●		●		
Pneumocócica conjugada ⁷		●		●		●		●					
Meningocócica C e A,C,W,Y conjugadas ⁸			●		●			●			●	●	
Meningocócica B recombinante ⁹			●		●		●	●					
Rotavírus ¹⁰		●		●		●							
Influenza ¹¹						●	●						
SCR/Varicela/SCRV ¹²								●	●				
Hepatite A ¹³								●		●			
Febre amarela ¹⁴	A partir dos 9 meses de idade												
HPV ¹⁵	Meninos e Meninas a partir dos 9 anos de idade												

10.3 Calendário Nacional de Vacinação 2016 – NOTA EXPLICATIVA

HPV - Existem duas vacinas disponíveis no Brasil contra o HPV (Papilomavírus humano). A vacina com os VLPs (partículas semelhantes aos vírus - “vírus-like particle”) dos tipos 16 e 18 que está indicada para meninas maiores de 9 anos de idade, adolescentes e mulheres, em três doses. A segunda dose deve ser feita um mês após a primeira e a terceira dose seis meses após a primeira. A vacina com os VLPs dos tipos 6, 11, 16 e 18 está indicada meninas e mulheres entre 9 e 45 anos e para meninos e homens entre 9 e 26 anos de idade, em três doses. A segunda dose deve ser feita dois meses após a primeira e a terceira dose 6 meses após a primeira. Um esquema alternativo de vacinação para indivíduos entre 9 e 13 anos de idade seria de duas doses, a segunda de 6 a 12 meses após a primeira. A vacina disponível no PNI, exclusivamente para o sexo feminino entre 9 e 13 anos de idade, é a vacina com os VLPs 6, 11, 16 e 18. A partir de 2016 o PNI modificou o esquema passando para duas doses, sendo que a menina recebe a segunda dose seis meses após a primeira, deixando de ser necessária a terceira dose. Os estudos recentes mostram que o esquema com duas doses apresenta uma resposta de anticorpos em meninas saudáveis de 9 a 14 anos de idade não inferior quando comparada com a resposta imune de mulheres de 15 a 25 anos que receberam três doses. As mulheres vivendo com HIV entre 9 a 26 anos de idade devem continuar recebendo o esquema de três doses.

10.4 Informações sobre a vacina utilizada pelo Ministério da Saúde



IDENTIFICAÇÃO DO MEDICAMENTO

GARDASIL®
vacina papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante)

APRESENTAÇÕES

GARDASIL® é uma suspensão injetável estéril para administração intramuscular. A vacina é apresentada em cartuchos com 10 frascos-ampolas de dose única ou 1 seringa preenchida.

USO INTRAMUSCULAR

USO ADULTO E PEDIÁTRICO (ENTRE 9 E 45 ANOS PARA MENINAS E MULHERES E ENTRE 9 E 26 ANOS PARA MENINOS E HOMENS)

COMPOSIÇÃO

Ingredientes ativos: cada dose de 0,5 mL da vacina quadrivalente contém aproximadamente 20 mcg de proteína L1 do HPV 6, 40 mcg de proteína L1 do HPV 11, 40 mcg de proteína L1 do HPV 16 e 20 mcg de proteína L1 do HPV 18.

Excipientes: alumínio (como o adjuvante sulfato hidroxifosfato de alumínio amorfo), cloreto de sódio, L-histidina, polissorbato 80, borato de sódio e água para injetáveis. O produto não contém conservantes ou antibióticos.

GARDASIL® vacina papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante)
Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda. Suspensão injetável

10.5 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 056/2011

CAAE 0031.0.009.008-11

1. Identificação:

Título do Projeto: "Alterações ultraestruturais induzidas pelo Papilomavírus Humano na cervix uterina e a participação das células de Langerhans nos diferentes estágios da infecção".

Pesquisadora Responsável: Maria da Glória Bonecini de Almeida.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 19/08/2011.

2. Sumário:

Visa a descrever o papel do HPV nas alterações celulares ocorridas durante a indução da carcinogênese e associá-las à presença de células de Langherans. Tem como objetivos específicos: 1) Descrever as alterações ultraestruturais induzidas pelo HPV na cervix uterina; 2) Identificar e quantificar as células de Langherans nas lesões intraepiteliais escamosas, com ênfase nas diferentes fases da infecção pelo papilomavírus. O trabalho será realizado nos Laboratórios de Morfologia e Morfogênese Viral do IOC-Fiocruz e de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do IPEC-Fiocruz com o objetivo de demonstrar o papel do HPV nas modificações estruturais dos queratinócitos e células apresentadoras de antígenos, principalmente a participação das Células de Langherans nos diferentes graus de lesão cervical induzida pelo HPV. Para este estudo, serão incluídas voluntárias atendidas no Setor de Patologia Cervical do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, Criança e Adolescente Fernando Figueira (IFF), Fiocruz, onde a sua maioria é soronegativa para o HIV, e está sob a coordenação do Dr. Fábio Russomano e aquelas em atendimento ambulatorial pelo Dr. Sergio Medrado. As pacientes que apresentarem lesões cervicais serão convidadas a participar do estudo no momento da consulta ginecológica. As pacientes que apresentarem lesões cervicais serão convidadas a participar do estudo no momento da consulta ginecológica. A coleta de um fragmento da cervix uterina será realizada neste momento, após assinatura e rubrica do TCLE. A amostra para utilização no estudo será retirada durante o procedimento de rotina para o exame histopatológico. Em caso de co-infecção com outras DST, o procedimento rotineiro no IFF e no consultório do Dr. Medrado é o tratamento destas doenças e posterior investigação para a etiologia das lesões cervicais. Assim, as pacientes voluntárias, independente de serem ou não incluídas na presente proposta, receberão toda assistência médica e aconselhamento quanto às DST. Serão incluídas 60 pacientes do sexo feminino, maiores de 18 anos e que apresentem alterações relacionadas à infecção pelo HPV, considerando-se a presença de neoplasia intraepitelial cervical: NIC-I (n=15), NIC-II (n=15), NIC-III (n=15) e câncer (n=15).

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa. Os procedimentos laboratoriais referentes à pesquisa utilizarão recursos dos respectivos Laboratórios: Laboratório de

"Alterações ultraestruturais induzidas pelo Papilomavírus Humano na cervix uterina e a participação das células de Langerhans nos diferentes estágios da infecção".

Morfologia e Morfogênese - IOC/Fiocruz e Laboratório de Imunologia e Imunogenética - IPEC/Fiocruz.

4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

5. Parecer: APROVADO.

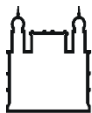
Data: 11 de novembro de 2011.

Assinatura do Coordenador:



Dr.^a Léa Camillo-Correia
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

10.6 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes HPV positivas atendidas no Ambulatório de Patologia Cervical do Instituto Fernandes Figueira



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA | FERNANDES FIGUEIRA

PROCESSO DE CONSENTIMENTO E DOCUMENTAÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PESQUISA

ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA CERVIX UTERINA E A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DA INFECÇÃO

Coordenadora: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida – INI / FIOCRUZ

Pesquisadora responsável: MS Maria Odete de Oliveira Carvalho

Colaborador: Dr Fábio Russomano – IFF / FIOCRUZ

PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

Cara Sr.^a/Srta.

Estamos convidando-a a participar de uma pesquisa sobre a infecção pelo HPV em mulheres infectadas por esse grupo viral. Esta é uma forma de conhecermos melhor a doença e aprender como tratá-la.

A infecção pelo HPV é muito comum em homens e mulheres e, geralmente, não causa lesões. Algumas vezes, porém, pode causar lesões que, caso não sejam tratadas podem piorar e chegar ao câncer. Para confirmar a presença de uma lesão causada por este vírus, é necessário fazer um exame chamado colposcopia, que é semelhante ao realizado no exame preventivo para doenças genitais, sendo que mais detalhado. O médico irá fazer o exame usando um aparelho que aumenta a imagem do colo uterino de modo a observá-lo com maior clareza. Caso o médico encontre uma lesão, será retirado um pequeno fragmento (biópsia)

do colo uterino para saber se é uma lesão pré-câncer e, caso isto seja confirmado pelo exame diagnóstico, poderá ser indicada a retirada da parte alterada, evitando que esta lesão aumente e chegue ao câncer.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, estou sendo informada que fui encaminhada ao meu médico ginecologista por apresentar em meu exame ginecológico preventivo de doenças genitais, a suspeita de uma lesão causada pelo HPV. Neste atendimento, será realizada uma colposcopia, exame semelhante ao exame preventivo, sendo que neste o médico fará o exame usando um aparelho que aumenta a imagem do colo uterino, possibilitando vê-lo como mais clareza. Caso o médico encontre alguma lesão, irá retirar um pequeno fragmento do colo uterino para saber se é uma lesão pré-câncer e, caso isto seja confirmado pela biópsia, será necessário retirar uma parte maior do colo, que é a parte alterada, para evitar que a lesão aumente e chegue ao câncer. Este é o acompanhamento normal para o diagnóstico e tratamento destas lesões para que haja a prevenção do câncer do colo do útero. Além disso, após o tratamento o ginecologista fará o acompanhamento para tratar novamente, caso surjam novas lesões.

A. PROCEDIMENTO

Ao concordar em participar deste estudo, a Sr^a irá:

a) Responder a um questionário sobre a sua profissão e ao seu ganho por mês. Além de, informar sobre a utilização de bebidas alcoólicas, drogas e relações sexuais.

b) Aceitar que uma pequena parte do pedacinho retirado na biópsia feita para a confirmação de seu diagnóstico seja enviada para o laboratório de Imunologia e Imunogenética do IPEC-FIOCRUZ que participam desta pesquisa.

c) Informar aos responsáveis pela pesquisa, que, se houver novas perguntas que necessitem utilizar o mesmo material coletado, este poderá ser utilizado em projetos futuros relacionados às infecções do HPV, desde que, haja uma nova justificativa perante o Comitê de Ética em Pesquisa.

B. TEMPO

Para participar desta pesquisa a Sr^a perderá apenas um pouco de tempo além do que seria considerado normal, para ler e assinar este Termo de Consentimento, responder ao questionário e coletar a amostra que será utilizada no estudo.

C. LOCAL DO ESTUDO

A colposcopia será realizada no ambulatório de Patologia Cervical, sob a responsabilidade do Dr Fábio Russomano no IFF. A histopatologia ocorrerá no no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Fernandes Figueira. Enquanto o estudo do material será feito no Laboratório de Imunologia Celular do Instituto Nacional de Infectologia, INI/FIOCRUZ.

D. RISCOS / DESCONFORTOS

a) Algumas das questões que constam do questionário podem ser constrangedoras, mas caso ache necessário, a entrevista poderá ser interrompida a qualquer momento.

b) A biópsia do colo uterino será realizada para diagnosticar qual o grau de lesão que tenho, para que, após seu resultado, os médicos possam decidir qual o melhor tratamento. Apenas a pequena parte que será retirada do material biopsiado é que servirá para a pesquisa e não fará falta para o meu diagnóstico.

E. TRATAMENTO E COMPENSAÇÃO POR DANOS

Não há risco de qualquer problema para a minha saúde pelo fato de ceder uma parte do pedacinho biopsiado para a pesquisa. Se tiver algum problema de saúde em decorrência da assistência no consultório médico, neste mesmo local será resolvido.

F. ALTERNATIVAS

Se decidir não participar desta pesquisa o tratamento médico que tenho direito, no Consultório do Dr Sérgio Medrado não será prejudicado. A necessidade de fazer biópsias ou tratamentos seria a mesma e o tempo de acompanhamento também seria o mesmo.

G. RESULTADOS DOS TESTES

Nesta consulta, assim como nas que se seguem, posso fazer todas as perguntas sobre as dúvidas que tenho sobre as infecções pelo HPV.

H. CUSTO PARA OS ENTREVISTADOS

Não haverá pagamento de nenhuma quantia de dinheiro, ou qualquer outro benefício monetário para a participação neste estudo ou para os tratamentos que porventura necessite. O custo de exames laboratoriais, conseqüentes ao estudo será coberto pela própria pesquisa.

I. CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS

Todas as informações aqui prestadas são confidenciais e constarão do prontuário e dos Questionários da pesquisa. Somente o Dr. Sérgio Medrado e a Dr^a Maria da Glória Bonecini de Almeida, e seus assistentes terão acesso a estas informações. As informações obtidas nesta pesquisa poderão ser discutidas com pesquisadores de outras Instituições, mas não haverá nenhuma referência a identificação fornecida pela Sr^a. Uma cópia deste consentimento deverá ser mantida com a Sr^a. O seu endereço e telefone serão anotados em folha separada, para facilitar contato, em casos de haver necessidade. No caso de haver qualquer dúvida, sobre a participação no estudo, favor telefonar para 3865 9531 ou 3865 9644 (Dra. Maria da Glória e Maria Odete).

Local e data: _____

Nome da Sr^a: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura: _____

Nome de alguma pessoa a ser contactada, caso a Sr^a não possa fornecer o seu endereço ou telefone no momento:

Nome: _____

Endereço: _____

Assinatura da paciente _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Este projeto está registrado no CEP/IFF e estará à sua disposição para qualquer dúvida e/ou esclarecimento, **através do telefone 021 2554 1730 ou e-mail cepiff@iff.fiocruz.br**.

O presente documento será emitido em duas vias, e uma destas caberá ao participante da pesquisa enquanto a outra será destinada ao pesquisador responsável.

10.7 Questionário

Estado civil.....Tem filhos?..... Quantos?

Abortos?.....Quantos?

Qual a sua idade atual?..... A Sr^a estuda?..... O quê?

Qual a sua profissão?

Qual a sua ocupação atual?

Qual a sua renda média mensal?.....

Qual o seu grau de instrução?.....

Utiliza anticoncepcional?

Com que idade teve seu primeiro relacionamento sexual?

Quantos parceiros sexuais você já teve?

Tem algum parceiro sexual atualmente?.....

Tem ou teve alguma doença sexualmente transmissível?

Qual (is)?Quando?.....

Utiliza bebidas alcoólicas?..... Consumo diário..... Consumo semanal.....

Você fuma?Quantos cigarros por dia?.....Há quanto tempo?.....

Utiliza medicamentos?Quais?

Utiliza droga ilícita?Quais?

Por favor, caso acredite possuir mais alguma informação que pode ser necessária para a pesquisa, mas que não foi mencionada pode escrevê-la aqui:

.....

.....

.....

¹ Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. 2001. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro. INCA. 2011.