

CACILDA TEZELLI JUNQUEIRA PADOVANI

**DETECÇÃO DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS
E SUAS CITOCINAS EM PACIENTES HPV INFECTADAS**

CAMPO GRANDE

2013

CACILDA TEZELLI JUNQUEIRA PADOVANI

**DETECÇÃO DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS
E SUAS CITOCINAS EM PACIENTES HPV INFECTADAS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Izaías Pereira da Costa.

CAMPO GRANDE

2013

Ao meu grande amor Silvio, eterno companheiro, agradeço de todo o meu coração o apoio e a compreensão diante da minha *presença-ausente*, necessária para a realização de mais esse projeto..... AMO VOCÊ!

Aos meus filhos Mateus e Gabriel!

Mateus, sua doçura ilumina minha vida!

Gabriel, menino forte ainda em meu ventre....

Contem sempre comigo! A mamãe ama vocês!

Aos meus pais, sempre presentes em minha vida!

O retorno de vocês trouxe conforto para o meu coração. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado vitalidade e coragem para iniciar dois projetos ao mesmo tempo... A arte de ser mãe, pois nesse período de doutorado, tive a oportunidade de gerar meus grandes tesouros, Mateus e Gabriel.... e ainda, iniciar o conhecimento em Imunologia, ciência que nos instiga a estudar cada vez mais....

À amiga Inês, pessoa muito especial, líder, companheira, educadora nata, que com seu perfil maternal, acolhe a todos com muito carinho e dedicação. Agradeço especialmente a você, que muito mais que minha co-orientadora, deu-me voto de confiança para trilharmos juntas no caminho da tão apaixonante Imunologia. Serei eternamente grata pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela paciência e pela amizade.

Ao Professor Dr. Izaías, meu orientador, minha gratidão pela confiança e ensinamentos.

À amiga Alda Maria Teixeira Ferreira, companheira de caminhada, capaz de tornar os nossos dias mais alegres. Gaúcha querida, obrigada pelo incentivo e contribuição na realização desse projeto.

À amiga Camila Mareti Bonin, agradeço-lhe imensamente por tudo, a sua participação foi essencial para a concretização desse trabalho. Serei eternamente grata pela sua colaboração. Saiba que pode contar sempre comigo para o que precisar.

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, minha gratidão por sua colaboração imprescindível na análise estatística deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro por sua valiosa colaboração no exame de qualificação.

À amiga Ana Paula Machado, pelo auxílio na finalização desse projeto. Sua coragem e determinação são admiráveis.

Aos alunos, Flávia Gatto de Almeida, Thiago Theodoro Martins Prata, Leandro Sobrinho Ávila e Larissa Zatorre Almeida, pela valiosa colaboração na realização deste projeto.

Às pacientes que participaram voluntariamente da pesquisa, fornecendo material necessário para a construção do conhecimento.

Ao Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande – MS pela parceria, essencial para a viabilidade deste projeto.

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

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos.

RESUMO

A infecção pelo Papilomavirus humano (HPV) é a principal causa do câncer cervical e suas lesões precursoras. A persistência viral tem sido considerada como fator de risco determinante para a progressão neoplásica e evidências sugerem que as células T regulatórias (Treg) desempenham importante papel na falha da eliminação viral, sendo capazes de exercerem função supressora sobre diversas células da resposta imune, através de contato célula-célula e secreção de citocinas. Este trabalho teve como objetivo detectar marcadores fenotípicos de células T regulatórias, bem como suas citocinas, IL-10 e TGF- β , no microambiente cervical de pacientes HPV-infectadas, para melhor compreender a resposta imune ao HPV. Cento e uma amostras de cérvix uterina emblocadas em parafina, previamente submetidas à avaliação histopatológica e à detecção de HPV-DNA, foram analisadas por técnica de imunohistoquímica quanto à coexpressão dos marcadores CD25/FOXP3 e CD4/TGF- β , e quanto à expressão de GITR e IL-10, em células presentes no estroma cervical. Os resultados mostram que existe um microambiente regulado negativamente, composto por elevada quantidade de células CD25⁺FOXP3⁺, células CD4⁺TGF- β ⁺, células IL-10⁺ e células GITR⁺ nas amostras classificadas como carcinoma, seguido daquelas designadas como lesões intraepiteliais cervicais de alto grau. Os elevados níveis de marcadores da população de células Treg e suas citocinas foram significativamente associados às lesões mais severas e à elevada carga viral, sugerindo que essas células imunorregulatórias podem ter forte envolvimento na manutenção do microambiente favorável à persistência viral e à progressão neoplásica. Nesse sentido, ressalta-se que um melhor entendimento sobre o papel exercido pelas células Treg na carcinogênese cervical de etiologia viral poderá contribuir para o avanço de estratégias terapêuticas e preventivas, incluindo a possível utilização dessas células como potenciais alvos terapêuticos e ainda como biomarcadores preditivos da progressão da doença cervical.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, resposta imune, células T regulatórias, imunohistoquímica.

ABSTRACT

The infection with human papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer and its precursor lesions. The viral persistence has been considered as the main risk factor for neoplastic progression and evidence suggests that regulatory T cells (Treg) play an important role in the failure of viral elimination, being able to exert suppressive function on various cells of the immune response through cell-cell contact and secretion of cytokines. This study aimed to detect phenotypic markers of regulatory T cells as well as their cytokines, IL-10 and TGF- β , in the cervical microenvironment of HPV-infected patients to better understand the immune response to HPV. One hundred and one samples of uterine cervix embedded in paraffin, previously subjected to histopathological evaluation and to HPV-DNA detection, were analyzed by immunohistochemistry technique as the co-expression of the markers CD25/FOXP3 and CD4/TGF- β , and regarding to the expression of GITR and IL-10 in cells present in the cervical stroma. The results show that there is a microenvironment negatively regulated composed by high amount of CD25⁺FOXP3⁺, CD4⁺TGF- β ⁺, IL-10⁺, GITR⁺ cells in the samples classified as carcinoma, followed by those designated as cervical high-grade intraepithelial lesions. The high levels of markers of Treg cell population and their cytokines were significantly associated to more severe lesions and to high viral load, suggesting that these immunoregulatory cells may have strong involvement in the maintenance of the microenvironment favorable to viral persistence and neoplastic progression. In that sense, it is noteworthy that a better understanding about the role played by Treg cells in the viral etiology cervical carcinogenesis may contribute to the advancement of the therapeutic and preventive strategies, including the possible use of these cells as potential therapeutic targets and also as predictive biomarkers of the progression of cervical disease.

Keywords: Human papillomavirus, immune response, regulatory T cells, immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média de idade de acordo com os achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=101).....	66
Tabela 2	Distribuição dos genótipos de HPV segundo os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	69
Tabela 3	Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a coexpressão de CD25/FOXP3 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).....	72
Tabela 4	Distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 e carga viral, em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).....	74
Tabela 5	Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a coexpressão de CD4/TGF- β em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).....	78
Tabela 6	Distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD4/TGF- β e carga viral em amostras de	

	biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).....	80
Tabela 7	Distribuição dos achados histopatológicos de acordo a expressão de IL-10 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).....	84
Tabela 8	Distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de IL-10 e carga viral em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).....	86
Tabela 9	Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a expressão de GITR em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).....	90
Tabela 10	Distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de GITR e carga viral em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore filogenética segundo a sequência da região L1 de 118 tipos de Papilomavírus humano. Os semicírculos externos identificam os gêneros de HPV; os semicírculos internos referem-se às espécies e, o número final de cada ramo identifica o tipo viral.....	25
Figura 2	Representação esquemática do genoma circular do HPV 16.....	26
Figura 3	Produtos gênicos do HPV e suas principais funções.....	27
Figura 4	Representação esquemática da patogênese do HPV.....	32
Figura 5	Características principais de células com propriedades regulatórias.....	44
Figura 6	Distribuição dos achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=101).....	65
Figura 7	Relação entre os achados histopatológicos e a carga viral em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=101).....	67
Figura 8	Frequência dos genótipos de HPV encontrados em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	68

Figura 9	Distribuição das amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer com infecção múltipla ou simples segundo os achados histopatológicos, Campo Grande – MS, 2012 (n=84).....	70
Figura 10	Distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).....	71
Figura 11	Distribuição da carga viral segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).....	73
Figura 12	Frequência da carga viral segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 e os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).....	75
Figura 13	Coexpressão de CD25/FOXP3 detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	76
Figura 14	Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a intensidade de coexpressão de CD4/TGF β em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).....	77

Figura 15	Distribuição da carga viral segundo a coexpressão de CD4/TGF β em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).....	79
Figura 16	Frequência da carga viral segundo a coexpressão de CD4/TGF- β e achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).....	81
Figura 17	Coexpressão de CD4/TGF- β detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	82
Figura 18	Distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de IL-10 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).....	83
Figura 19	Distribuição da carga viral segundo a expressão de IL-10 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).....	85
Figura 20	Frequência da carga viral segundo a expressão de IL-10 e achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).....	87

Figura 21	Expressão de IL-10 detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	88
Figura 22	Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a expressão de GITR em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).....	89
Figura 23	Distribuição da carga viral segundo a expressão de GITR em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).....	91
Figura 24	Frequência da carga viral segundo a expressão de GITR e achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).....	93
Figura 25	Expressão de GITR detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

χ^2 = Análise qui-quadrado

AIRE = *Autoimmune regulator gene*

APC = *Antigen-presenting cell*

aTreg = *Adaptive regulatory T cells*

CA = carcinoma

cAMP = Adenosina mono-fosfato cíclico

CD25 = *Alpha chain Receptor of the interleukin 2 - IL-2R α*

CFS = *Common fragile sites*

CTLA-4 = *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

CV = Carga viral

DNA= *Deoxyribonucleic acid*

DP = Desvio padrão

DST = Doenças sexualmente transmissíveis

FOXP3 = *Forkhead box protein p3*

GITR = *Glucocorticoid Induced TNF Receptor Family Related Protein*

GL = Grau de liberdade

HLA-DR = *Human leucocyte antigen*

HPV = *Human Papillomavirus*

HSIL = *High-grade squamous intraepithelial lesion*

HSPG = *Heparan sulfate proteoglycan*

IARC = *International agency for research on cancer*

IDO = *Indoleamine 2,3-dioxygenase*

I κ zf2 = *IKAROS family zinc finger 2 (Helios)*

IL = Interleucina

INF = *Interferon*

iNKT = Invariant natural killer T cells

IRF-1 = *Interferon regulatory factor*

iTreg = *Regulatory T cells induced*

KIRs = *Inhibitory receptors of NK*

LCR = *Long control region*

LMP-2 = *Low molecular weight protein 2*

LSIL = *Low-grade squamous intraepithelial lesions*

MCP 1 = *Human monocyte chemoattractant protein-1*

MHC I = *Major Histocompatibility Complex I*

MIP-3 alfa = *Macrophage inflammatory protein-3alpha*

mL = *mililitro*

mRNA = *messenger RNA*

NIC = *Neoplasia intraepithelial cervical*

NILM = *Negativo para lesão intraepitelial e malignidade*

NK = *Células Natural Killer*

Nrp1 = *Neurophilin-1*

nTreg = *Natural regulatory T cells*

p53 = *Proteína supressora de tumor p53*

PBS = *Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)*

PCR = *Polymerase chain reaction*

PD-1 = *Programmed cell death-1*

pRb = *Proteína do retinoblastoma*

RT-PCR = *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

RFLP= *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA = *Ribonucleic acid*

RQ-PCR = *Real-Time Quantitative Polymerase Chain*

SIL = *Squamous intraepithelial lesion*

Síndrome IPEX = *Immunodeficiency, poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*

TAP-1 = *Antigen processing subunit 1*

TCR = *T cell receptor*

TGF- β = *Transforming growth factor- β*

Th1 = Células T helper do tipo 1

Th2 = Células T helper do tipo 2

TLRs = *Toll-like Receptors*

TNFR-2 = *Tumor necrosis factor receptor-2*

Treg = Células T regulatórias

VLP = *Virus like particles*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Breve histórico	19
2.2 Epidemiologia da infecção por HPV	21
2.3 Papilomavírus humano: principais características taxonômicas, estruturais e biológicas	24
2.4 Patogenia da infecção por Papilomavírus humano na cérvix uterina	28
2.5 Diagnóstico da infecção por Papilomavírus humano	34
2.6 Imunoprofilaxia da infecção por HPV	37
2.7 Resposta imune ao Papilomavírus humano	38
2.8 Células Imunorregulatórias	43
2.8.1 Células T regulatórias (Treg)	45
2.9 Caracterização das células T regulatórias	48
2.9.1 FOXP3 (<i>Forkhead box P3</i>)	49
2.9.2 GITR (<i>Glucocorticoid Induced TNF Receptor Family Related Protein</i>)....	50
2.9.3 CD25 (<i>Alpha chain receptor of the interleukin 2 - IL-2Rα</i>)	51
2.9.4 Interleucina-10	51
2.9.5 TGF- β (<i>Transforming growth factor-β</i>)	52
2.10 Regulação da resposta imune pelas células Treg e sua relação com o HPV	52
2.11 Utilização terapêutica das células T regulatórias	54
3 OBJETIVOS	56
3.1 Geral	56
3.2 Específicos	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Caracterização do estudo	57
4.2 Local da pesquisa	57
4.3 Sujeitos da pesquisa	57
4.4 Obtenção das amostras	58
4.5 Análise histopatológica	58
4.6 Detecção de DNA-HPV, tipagem e determinação da carga viral	59

4.7 Análise imunohistoquímica.....	59
<u>4.7.1 Imunohistoquímica de marcação simples.....</u>	<u>59</u>
<u>4.7.2 Imunohistoquímica de dupla marcação.....</u>	<u>61</u>
4.8 Leitura das lâminas imunomarcadas.....	63
4.9 Análise estatística	63
4.10 Aspectos éticos.....	64
5 RESULTADOS.....	65
5.1 Análise histopatológica e de carga viral	65
5.2 Genotipagem	67
5.3 Análise imunohistoquímica.....	71
<u>5.3.1 Coexpressão dos marcadores CD25/FOXP3.....</u>	<u>71</u>
<u>5.3.2 Coexpressão dos marcadores CD4/TGF-β</u>	<u>77</u>
<u>5.3.3 Expressão de IL-10</u>	<u>83</u>
<u>5.3.4 Expressão de GITR.....</u>	<u>89</u>
6 DISCUSSÃO	95
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
8 CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS.....	121
APÊNDICE.....	161
ANEXO	163

1 INTRODUÇÃO

A infecção da cérvix uterina pelo Papilomavírus humano (HPV) é comum e, na maioria das vezes, regride de forma espontânea. O ciclo infectivo do HPV ocorre no epitélio estratificado escamoso e requer células basais ou parabasais, dado que a replicação viral acompanha o programa de diferenciação progressiva dessas células. O acesso direto à zona metaplásica ou a presença de microtraumas na superfície epitelial permite que o vírus infecte essas células e passem a codificar pequenos níveis de proteínas virais que, na maioria dos casos, são reconhecidos pelo sistema imune local, gerando imunidade protetora (BURCHELL *et al.*, 2006; DOORBAR, 2005; HORVATH *et al.*, 2010; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012; MOSCICKI *et al.*, 2006; SANCLEMENTE; GILL, 2002; SCHIFFMAN; KJAER, 2003). Entretanto, a infecção viral pode persistir, desencadeando anormalidades citológicas que comprometem o arranjo uniforme do tecido epitelial, sendo classificadas em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), as quais incluem a neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I), atipia colocitótica e condiloma; e, as lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), que compreendem as NICs de graus II e III/*carcinoma in situ* (BULKMANS *et al.*, 2004; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; SOLOMON *et al.*, 2002).

A história natural da infecção pelo HPV sugere que diversos fatores estão relacionados com o desenvolvimento do câncer e a persistência viral tem sido considerada como o principal fator de risco, a qual, por sua vez, se estabelece muito provavelmente devido a uma resposta imune deficiente. Outros fatores também têm sido associados à progressão neoplásica, destacando-se a presença de tipos de HPV de alto risco oncogênico e a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro (CUZICK *et al.*, 2003; FRANCO *et al.*, 1999; GIULIANO *et al.*, 2002a; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; KOSHIOL; LINDSAY, *et al.*, 2008; MUNOZ *et al.*, 2004).

Estudos recentes sugerem que as células T regulatórias (Treg) desempenham importante papel na falha da eliminação viral, bem como na supressão das respostas antitumorais, exercendo sua função supressora mediante contato célula-célula e através da secreção das citocinas inibitórias, tais como, IL-10

e TGF- β . Tem sido proposto que as Treg são capazes de desencadear a anergia e a apoptose de diversas células da imunidade local, dentre elas, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, Natural Killer e macrófagos, essenciais para a depuração dos antígenos virais e tumorais (BOEHMER, 2005; COLEMAN *et al.*, 1994; CRUVINEL *et al.*, 2008).

Uma vez que a infecção pelo HPV restringe-se ao epitélio, torna-se de fundamental importância compreender os mecanismos imunológicos envolvidos no microambiente tecidual infectado (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; KONYA *et al.*, 2001). As intervenções terapêuticas vigentes viabilizam a aquisição do material necessário à pesquisa da imunidade local, pois incluem a excisão cirúrgica das lesões. No entanto, estudos envolvendo a resposta imune no sítio da infecção ainda são escassos.

Dado que as células T regulatórias têm sido alvo de inúmeras pesquisas envolvendo doenças infecciosas, autoimunes e transplantes e, diante do conhecimento, ainda incipiente, sobre o papel dessas células na indução da carcinogênese cervical associada ao HPV, sobretudo no microambiente infectado, este estudo teve como objetivo detectar marcadores de células Treg, bem como suas citocinas supressoras em lesões cervicais HPV-induzidas, para melhor compreender a resposta imune no sítio da infecção, contribuindo, dessa forma, para o delineamento de estratégias terapêuticas e preventivas mais adequadas, incluindo a possível utilização das Treg como alvo em terapias imunomoduladoras e como biomarcadores de progressão tumoral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve histórico

Verrugas genitais são conhecidas desde a antiguidade e descritas por escritores gregos e romanos (BAFVERSTEDT, 1967). Lesões genitais descritas por Lanfranc podem configurar relatos de verrugas genitais (LANFRANC, 1306 *apud* ORIEL, 1971). Em 1867, Virchow descreveu massas com pequenas elevações na superfície, semelhantes à couve-flor, denominando-as “condiloma”, que foram divididos em dois tipos: acuminado, sob a forma de papilas pontiagudas ou grânulos, e plano, na forma úmida. A relação entre as verrugas genitais e as epiteliais foi primeiramente postulada por Gémy, por observar similaridade histológica entre as lesões (GEMY, 1893 *apud* ORIEL, 1971) e em seguida experimentos envolvendo inoculações de extratos de verrugas penianas na pele em outras partes do corpo, resultaram no desenvolvimento de verrugas planas nos sítios de inoculação, fortalecendo tal relação. Vários estudos, utilizando essa técnica bem sucedida foram realizados e demonstraram então o caráter contagioso, as vias de transmissão, o período de incubação e a etiologia comum às verrugas vulgares e condilomas (CIUFFO, 1907; GOODMAN; GREENWOOD, 1934; KINGERY, 1919; LICHT, 1984; SERRA, 1908; WILE; WAELSCH, 1918).

Diversos autores observaram a ocorrência de verrugas em humanos, bovinos, cães, coelhos, porcos, cavalos, dentre outros, relatando que o agente causador das lesões possuía especificidade quanto ao tecido e à espécie animal infectada (HURSTN, 1933; KIDD, 1938; PARISH, 1961; SHOPPE; COOK; OLSON, 1951). Foi demonstrado, também, o desenvolvimento de imunidade e a persistência ou regressão espontânea das lesões (RULISON, 1942). As lesões papilomatosas na cérvix uterina foram por algum tempo associadas à gravidez, que aumentaria a susceptibilidade à inflamação aguda e crônica (SURAN; MEISTER, 1948; WOLFE, 1950). Entretanto, observações posteriores mostraram que a frequente associação da presença de verrugas com a gravidez refletia o fato de que muitas mulheres só se submetiam aos exames ginecológicos durante a gestação (MARSH, 1952).

A verdadeira etiologia dos condilomas foi confirmada em 1949, através da microscopia eletrônica, com a observação de partículas virais no núcleo de células

epiteliais em verrugas cutâneas (STRAUSS *et al.*, 1949), sendo mais tarde relacionadas ao Papilomavírus humano, classificado no grupo papova (DUNN; OGILVE, 1968; MELNICK, 1962). Melnick (1962) sugeriu o termo papova ao agrupar as duas primeiras letras das palavras papiloma (verrugas do coelho e do homem), polioma (do rato) e vacuolizante (de células do símio). Nesse grupo, foram incluídos os papilomavírus canino, bovino, humano e outros que se caracterizaram por ter dupla cadeia de DNA, produzirem infecções latentes ou crônicas em seus hospedeiros naturais e transformarem células normais em neoplásicas (VILLA, 1998).

Em seguida, diversos estudos determinaram o período de latência viral, a existência de diferentes tipos e subtipos de Papilomavírus humano, iniciaram os estudos da resposta imune associada ao Papilomavírus e sugeriram o possível papel desse vírus como agente etiológico do câncer cervical (GISSMANN; ROWSON; MAHY, 1967; ZUR HAUSEN, 1976; ZUR HAUSEN *et al.*, 1974; ZUR HAUSEN, 1976, 1977). Na década de 80, novos tipos virais foram caracterizados, dentre eles HPV 16 e HPV 18, encontrados nos casos com neoplasias cervicais (BOSHART *et al.*, 1984; DURST *et al.*, 1983).

Posteriormente, surgiram evidências que permitiram a compreensão inicial da eventual transformação celular ocasionada pelo potencial oncogênico do HPV, demonstrando a perda da função da proteína supressora de tumor pRb (proteína do retinoblastoma) após interação com a oncoproteína viral E7 e, a degradação da proteína supressora de tumor p53 induzida pelo oncogene viral E6 (DE VILLIERS, 1994; DYSON *et al.*, 1989; SCHEFFNER *et al.*, 1990; ZUR HAUSEN). Desde então, muitos estudos epidemiológicos foram realizados para consolidar a relação causal do HPV com a neoplasia cervical (BOSCH 1992; BOSCH *et al.*, 1995; BOSCH; MUNOZ, 2002; MUNOZ *et al.*, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 1993; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

2.2 Epidemiologia da infecção por HPV

O Papilomavírus humano é um vírus de distribuição universal, acometendo homens e mulheres, independente de raça e classe social. Sua transmissão ocorre através do contato entre duas superfícies – pele/pele, pele/mucosa e mucosa/mucosa (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005), onde se faz necessária a presença de microabrasões no epitélio para o acesso do vírus às células basais (BURCHELL *et al.*, 2006). O contato sexual consiste na principal forma de transmissão do HPV no trato anogenital (PLETT-TORRES *et al.*, 2007), o que permite que a infecção-doença por HPV seja classificada como uma das principais doenças sexualmente transmissíveis (DST) de etiologia viral comum entre as mulheres (KOUSTSKY, 1997).

Observa-se maior prevalência de infecção entre indivíduos mais jovens no período de maior atividade sexual (de SANJOSÉ, 2007). A idade tem sido considerada como um fator de risco importante, já que evidências apontam que a prevalência da infecção é maior na faixa etária mais jovem, de 20 a 24 anos (ALEIXO NETO, 1991; VILLA, 1998). A vulnerabilidade das mulheres mais jovens para a aquisição do HPV pode ser explicada pela ausência de imunidade específica por falta de exposição prévia ao vírus, enquanto que mulheres com mais idade têm maior probabilidade de terem sido infectadas pelo HPV, eliminado o vírus no passado e desenvolvido memória imunológica, reduzindo assim o risco de uma nova infecção (DESAI *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2012; KRAMER *et al.*, 2010; VACARELLA *et al.*, 2010).

Sanjosé e colaboradores (2007) mostraram na meta-análise, realizada através de revisão sistemática das publicações de várias regiões do mundo, que a distribuição da infecção por HPV ocorre de forma bimodal, com o primeiro pico em mulheres mais jovens que 34 anos, seguido de um declínio no número de casos na faixa etária de 35 a 44 anos, apresentando o segundo pico de prevalência da infecção em mulheres com idade superior a 45 anos. Esse padrão de distribuição da infecção foi observado em todas as regiões do mundo, exceto na Ásia, onde a prevalência após o primeiro pico continuou em declínio.

O risco de infecção por HPV pode estar aumentado diante da presença de cofatores, como tabagismo, uso de contraceptivos orais, paridade, coinfeção por outros agentes sexualmente transmissíveis, atividade sexual precoce, imunossupressão e maior susceptibilidade do hospedeiro (ALEIXO NETO, 1991; BURCHELL *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2004; MOSCICKI *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2009).

Cerca de 90% das infecções por HPV irá regredir espontaneamente em um período de 24 meses, enquanto que uma minoria poderá progredir para o câncer cervical (MOSCICKI *et al.*, 2006; SHIFFMAN; KJAER, 2003). Evidências apontam que a ocorrência da neoplasia cervical e de suas lesões precursoras tem como causa principal a infecção por certos tipos de HPV (MUÑOZ *et al.*, 1992; VAN DEN BRULE *et al.*, 1991). Aproximadamente 99% dos casos de carcinoma uterino apresentam positividade para o HPV (WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Estudos epidemiológicos mostram que a detecção do HPV está associada ao risco 10 vezes maior de desenvolver lesões intraepiteliais cervicais (KOUTSKY *et al.*, 1992). A progressão da infecção, por sua vez, está associada a diversos fatores, como a persistência do HPV, a presença de tipos de alto risco oncogênico, a alta carga viral, a integração do DNA viral na célula e falha na resposta imunológica do hospedeiro (BEUTNER; TYRING, 1997; CHAOUKI *et al.*, 1998; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012; MCCANCE, 1994; MOLLING *et al.*, 2007).

A prevalência mundial estimada do HPV em mulheres sem alterações citológicas foi de 10,4% (de SANJOSÉ *et al.*, 2007), enquanto no Brasil foi estimada em 17% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Estudos mostram taxas de prevalência oscilantes em mulheres assintomáticas, como visto na revisão de Trottier & Franco (2006) que detectou uma taxa de variação de 2% a 44%. Uma pesquisa multicêntrica, realizada pela *International agency for research on cancer* (IARC) encontrou prevalência de 1,4% na Espanha e 25,6% na Nigéria (CLIFFORD *et al.*, 2005b). Na Grécia, a prevalência foi de 23,6% (KROUPIS *et al.*, 2007) e, na Itália esse percentual caiu para 14,48% (AGAROSI *et al.*, 2009). Na Colômbia, foi estimada em 14,9% (MOLANO *et al.*, 2002a), na Argentina em 17,7% (MATOS *et al.*, 2003) e no Paraguai em 20% (ROLON *et al.*, 2000). Na Bolívia, entretanto, este percentual caiu para 5,9% (CERVANTES *et al.*, 2003). Variações nas taxas de

prevalência podem ser justificadas por diversos fatores, dentre eles, diferenças geográficas, idade das populações estudadas, assim como utilização de ensaios moleculares de detecção de HPV com diferenças na sensibilidade (BOSCH, 2003).

A prevalência de infecção por HPV aumenta consideravelmente na vigência de anormalidades citológicas na cérvix uterina. Estudos em mulheres com lesões cervicais de baixo grau mostram elevadas taxas, como aquelas detectadas na África (59,1%) e na América do Norte (80,1%) (CLIFFORD *et al.*, 2005a). O HPV-DNA esteve presente em 100% das mulheres com lesões neoplásicas e pré-neoplásicas na Espanha (IBANEZ *et al.*, 2012) e em 69,3% dos casos com neoplasias na China (CHAO *et al.*, 2012; DAI *et al.*, 2006). Estudos que avaliaram a prevalência mundial de HPV-DNA em amostras de carcinoma cervical invasivo encontraram taxas de 92,9% (BOSCH *et al.*, 1995) e 99,7% (BOSCH *et al.*, 1995; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Quanto à presença dos tipos oncogênicos de maior prevalência, observa-se que o HPV-16 foi encontrado em 70% dos casos de câncer cervical na Alemanha e em 80% no Reino Unido (MACCANCE; CAMPION; CLARKSON, 1985; WAGNER *et al.*, 1984). No norte da África, a positividade de HPV-DNA foi de 92% em casos de câncer invasivo, sendo que os tipos mais prevalentes foram o 16 (67,7%), seguido do 18 (8,1%) (CHAOUKI *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos (EUA), os tipos 16 e 18 estiveram presentes em 70% das lesões neoplásicas de cérvix uterina (MCCANCE, 1994). No Brasil, 69,4% dos casos com carcinoma cervical foram atribuídos aos tipos HPV 16 e 18 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). O estudo de caso-controle realizado no Brasil detectou-se HPV-DNA em 84% dos casos com câncer cervical, com 53,8% da positividade atribuída ao tipo 16, seguido do tipo 18 com 8,6% (ELUF-NETO, 1994). Tozetti e colaboradores (2006), na cidade de Campo Grande-MS, detectaram 93,9% de positividade para HPV-DNA em amostras cervicais com alterações histopatológicas de pacientes com suspeita clínica de infecção. Outro estudo, recentemente realizado também nesta mesma cidade, estimou uma prevalência de 28,9% de infecção por HPV em amostras cervicais de mulheres jovens, com predomínio de tipos de alto risco oncogênico (HPV 16, 31, 33 e 45) (ALMEIDA, 2013).

O câncer cervical é o terceiro mais comum entre as mulheres, com uma estimativa de 530.000 casos novos e 275.000 óbitos no ano de 2008. Desses óbitos,

mais de 85% ocorreram nos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). No Brasil, o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais frequente entre mulheres, classificando-se também em segundo lugar entre mulheres na faixa etária de 15 a 44 anos. Estima-se que cerca de 14,1% das mulheres são infectadas por HPV e, 70,7% dos cânceres cervicais invasivos são atribuídos aos tipos de HPV 16 e 18 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Dados do Ministério da Saúde mostram uma estimativa de 17.540 casos novos de carcinoma de cérvix uterina para o ano de 2013, com as seguintes incidências estimadas por região: Centro-oeste (28/100.000); Norte (24/100.000); Nordeste (18/100.000); Sudeste (15/100.000) e Sul (14/100.000) (BRASIL, 2012). No Mato Grosso do Sul estimou-se a incidência de 430 casos de câncer cervical e desses, 140 foram estimados para a cidade de Campo Grande (BRASIL, 2012).

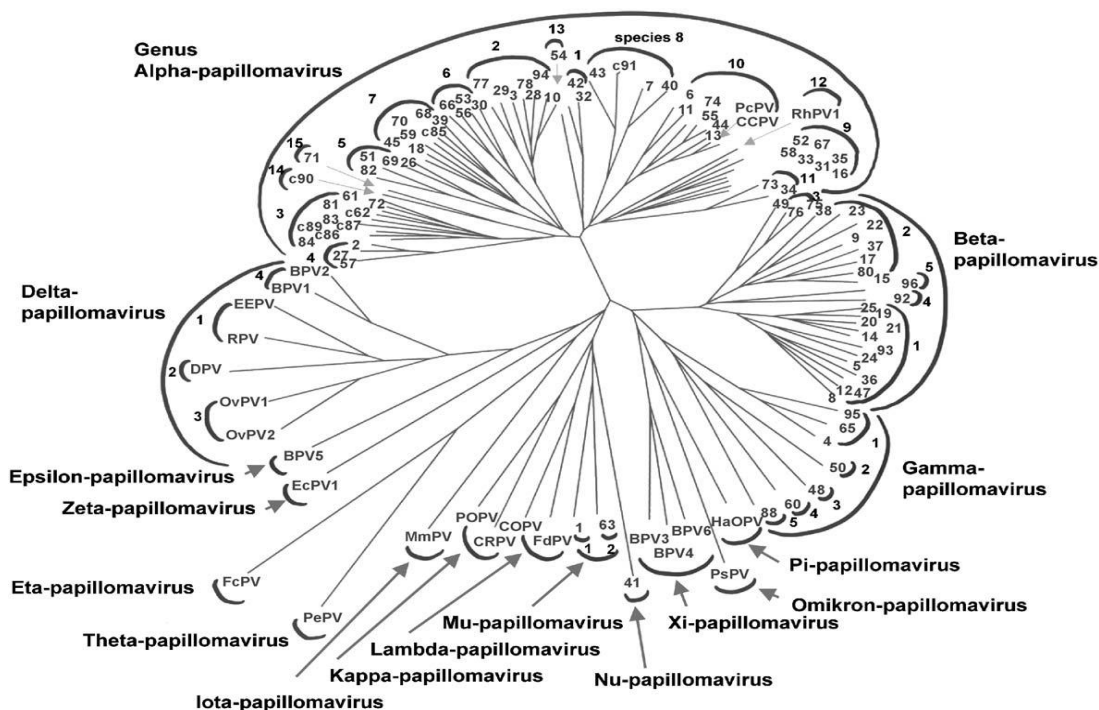
Uma recente revisão sistemática de mais de 30.000 casos de carcinoma cervical invasivo em todo o mundo, em associação aos dados obtidos de outro estudo que incluiu 10.500 casos de câncer cervical, estimou consistentemente que os tipos 16 e 18 estão associados a 70% das neoplasias cervicais, seguidos dos tipos 45, 33, 31, 52, 58 e 35, os quais juntamente com os tipos HPV 16 e 18, associam-se a 90% do total dos casos de câncer de colo uterino no mundo (LI, *et al.*, 2011; de SANJOSÉ, *et al.*, 2010). Diante das evidências, já está bem estabelecido que a infecção por certos tipos de HPV é o maior fator de risco na etiologia do carcinoma cervical, o que faz desse vírus uma causa necessária para a progressão neoplásica.

2.3 Papilomavírus humano: principais características taxonômicas, estruturais e biológicas

Os Papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae*, que inclui 16 diferentes gêneros, classificando-se no gênero *alpha* aqueles vírus associados com o desenvolvimento de lesões neoplásicas nas mucosas de humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; DE VILLIERS *et al.*, 2004). Na Figura 1 está representada a árvore filogenética contendo 118 tipos de Papilomavírus.

Atualmente são conhecidos mais de 230 tipos de Papilomavírus, aproximadamente 100 que infectam humanos já tiveram seu genoma completamente isolado e metade desses infecta o trato genital (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Figura 1 – Árvore filogenética segundo a sequência da região L1 de 118 tipos de Papilomavírus humano. Os semicírculos externos identificam os gêneros de HPV; os semicírculos internos referem-se às espécies, e o número final de cada ramo identifica o tipo viral.

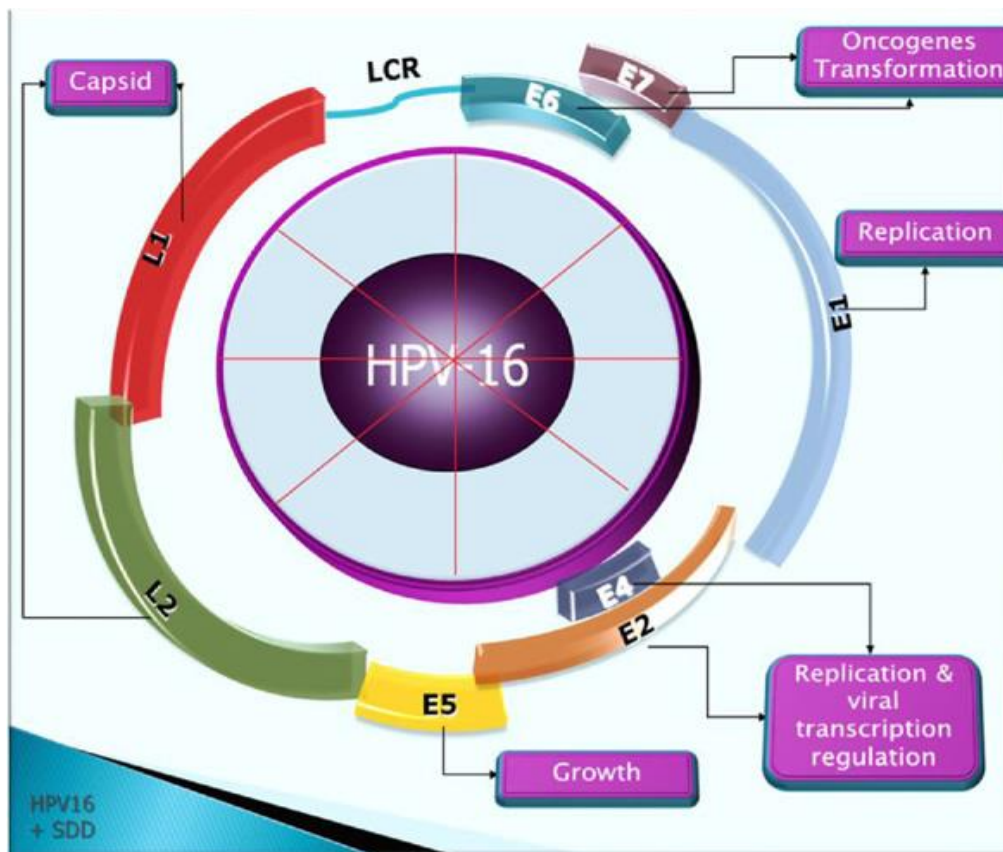


Fonte: De Villiers *et al.*, 2004.

Os Papilomavírus são pequenas partículas icosaédricas não envelopadas de aproximadamente 50-60nm contendo uma dupla fita circular de DNA, com aproximadamente 7000-8000 pares de bases (HOWLEY, 1996; ZUR HAUSEN, 1982). Seu genoma apresenta as seguintes regiões: região longa de controle (LCR), responsável por regular a expressão e replicação gênicas; região *early*, que codifica proteínas necessárias à replicação viral e ao processo de imortalização celular para os HPV altamente oncogênicos e, ainda a região *late*, que codifica proteínas estruturais integrantes do capsídeo viral. Esta última região é composta pelos genes

L1 e L2, sendo que L1 é amplamente utilizado para a identificação de novos tipos de Papilomavírus, por ser o mais conservado (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática do genoma circular do HPV 16.



Fonte: ESCOBAR OSPINA; PERDOMO, 2013.

A Figura 3 mostra as principais funções dos produtos gênicos do Papilomavírus humano.

Figura 3 – Produtos gênicos do HPV e suas principais funções.

Produto gênico	Principais funções
E1	Possui atividade de DNA helicase, sendo importante no processo de replicação viral.
E2	Regula positivamente ou negativamente a expressão de outros produtos gênicos virais dependendo do sítio de ligação na LCR; recruta E1 para a origem de replicação, aumentando a replicação viral; atua na transferência do genoma viral para as células filhas durante a divisão celular
E4	Proteína viral mais abundante e sua função pouco elucidada. Tem sido relacionada com a amplificação do DNA viral e sua liberação.
E5	Classifica-se como uma oncoproteína, relacionando-se com o aumento do fator de crescimento e à evasão imunológica.
E6	Oncoproteína que interage e inativa a proteína supressora de tumor p53 do hospedeiro, suprimindo a apoptose e contribuindo para a imortalização celular e replicação viral.
E7	Oncoproteína que se complexa com proteína pRb, inativando suas funções supressoras de tumor.
L1 e L2	Proteínas constituintes do capsídeo viral.

Fonte: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007.

O Papilomavírus humano pode ser classificado segundo a sua afinidade por diferentes tecidos, como mucosotrópicos, diante de uma maior afinidade por mucosas, e epidermotrópicos, quando da afinidade aumentada pela pele (BRENTJENS *et al.*, 2002). São classificados ainda de acordo com a sua

capacidade em causar neoplasias, como de alto risco oncogênico, com destaque para os tipos 16 e 18; e, de baixo risco oncogênico, com maior relevância para os tipos 6 e 11 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007). Os tipos de baixo risco oncogênico (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81) são associados à presença de lesões benignas, causando condiloma acuminado e verrugas vulgares. Já os de alto risco oncogênico (HPV 16, 18, 26, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 59, 66, 68, 72 e 81) estão presentes em neoplasias e suas lesões precursoras (BOSCH *et al.*, 2002; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

No trato anogenital, infecta células basais e parabasais do epitélio escamoso, levando à infecção latente ou ativa/produtiva, sendo que na primeira praticamente não são observados os efeitos citopáticos do vírus e o epitélio é aparentemente normal (MCCANCE, 1994). Já a infecção produtiva pode se apresentar na forma clínica (condiloma acuminado e carcinoma invasivo) ou subclínica (NIC - neoplasia intraepitelial cervical de baixo e alto grau). No trato genital feminino, as lesões intra-epiteliais ocorrem com grande frequência nas células epiteliais metaplásicas imaturas da zona de transformação, região localizada entre o epitélio escamoso da exocérvice e o epitélio colunar do canal endocervical (MCCANCE, 1994).

2.4 Patogenia da infecção por Papilomavírus humano na cérvice uterina

O ciclo infectivo do HPV ocorre no epitélio estratificado escamoso e requer células basais ou parabasais, uma vez que acompanha o programa de diferenciação progressiva dessas células. O acesso à célula basal se dá através de microtraumas na superfície epitelial, ou diretamente na zona metaplásica (junção escamo-colunar) (DOOBAR, 2005; HORVATH *et al.*, 2010; SANCLEMENTE, GILL, 2002).

A entrada do vírus na célula basal depende da ligação de L1 ao HSPG (*Heparan sulfate proteoglycan*), presente na membrana basal ou na superfície celular, que se segue com a exposição de L2, a qual se liga à membrana da célula, expondo o sítio de ligação de L1 para interação com seu receptor celular, a qual ativa o mecanismo de endocitose viral mediada por receptor. O tráfego intracelular do HPV contido na vesícula endossômica até o núcleo da célula, assim como o modo de liberação do seu genoma viral no compartimento nuclear ainda não estão

bem elucidados, entretanto, evidências mostram que L2 tem importante papel, uma vez que tem sido detectada no núcleo da célula hospedeira (SAPP, DAY, 2009). O genoma viral replica-se de forma episomal, separado do DNA do hospedeiro, as proteínas E1 e E2 são transcritas, iniciando-se a síntese do DNA viral (DE GEEST *et al.*, 1993).

O genoma viral pode ainda integrar-se ao DNA da célula hospedeira, fenômeno que pode acontecer aleatoriamente, mas que parece ocorrer com maior frequência em sítios frágeis comuns (CFS), altamente instáveis, presentes na região E2 do genoma viral, que quando rompidos levam ao bloqueio do controle transcricional exercido por essa região, permitindo o aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7 (CANNIZZARO *et al.*, 1988; CHOO; PAN; HAN, 1987; THORLAND *et al.*, 2003). A elevada expressão dessas proteínas oncogênicas leva à imortalização da célula hospedeira, alteração do ciclo e da programação de diferenciação celular, além do acúmulo de defeitos mitóticos (BAKER *et al.*, 1987; BEDELL; JONES; LAIMINS, 1987; ZUR HAUSEN, 2002).

O ciclo replicativo do HPV acompanha a diferenciação das células basais e à medida em que essas se dividem, o DNA viral é distribuído igualmente entre as células filhas, as quais migram em direção à superfície tornando-se cada vez mais diferenciadas (Figura 4). Sugere-se que a persistência viral justifique-se pela manutenção extra-cromossomal do HPV no núcleo das células basais, pelo número reduzido de proteínas virais E1 e E2 nessas células e poucas cópias do genoma viral naquelas em divisão, determinando a infecção latente, pobre resposta imune e correta segregação do genoma viral durante a mitose (DE GEEST *et al.*, 1993; LING PEH, 2002). A transcrição do RNA viral e a amplificação do DNA aumentam significativamente nas células em diferenciação da camada média e, a formação do capsídeo viral acontece na camada mais superficial, com a liberação das partículas virais recém-formadas (CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010; DOOBAR, 2005).

Os Papilomavírus não são líticos e não são liberados antes que as células infectadas atinjam a camada epitelial mais superficial, resultando no comprometimento da detecção viral pelo sistema imune, fato que é corroborado pela capacidade que esse vírus tem de impedir a devida apresentação de seus epítomos às células da resposta imune nas camadas inferiores (ASHRAFI *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2002; MATTHEWS *et al.*, 2003).

Considerando a cinética de produção das proteínas virais, observa-se primeiramente a expressão de E1 e E2 nas células basais, necessárias à manutenção do genoma na forma episomal. As proteínas oncogênicas E6 e E7 também podem ser encontradas nesse momento, porém, em baixas concentrações (DE GEEST *et al.*, 1993; DOOBAR, 2005; STANLEY *et al.*, 1989). Em seguida, a expressão de E6 e E7 aumenta, estimulando a progressão do ciclo celular e retardando a diferenciação terminal normal das células nas camadas suprabasais (SHERMAN *et al.*, 1997). Ainda nessa fase, as proteínas E4 e E5 também são expressas, contribuindo para a manutenção das cópias episomais em baixos níveis. Posteriormente, a expressão das proteínas precoces E1, E2, E4 e E5 se eleva para dar início à replicação gênica, mediante a ligação de E2 à região regulatória e o recrutamento de E1 para a origem de replicação, resultando no aumento de cópias do genoma viral (MIDDLETON *et al.*, 2003). Já nas camadas mais superficiais, a proteína L1 é produzida e em seguida L2, permitindo o empacotamento da partícula infecciosa e finalizando a síntese viral (DOOBAR, 2005; FLORIN *et al.*, 2002).

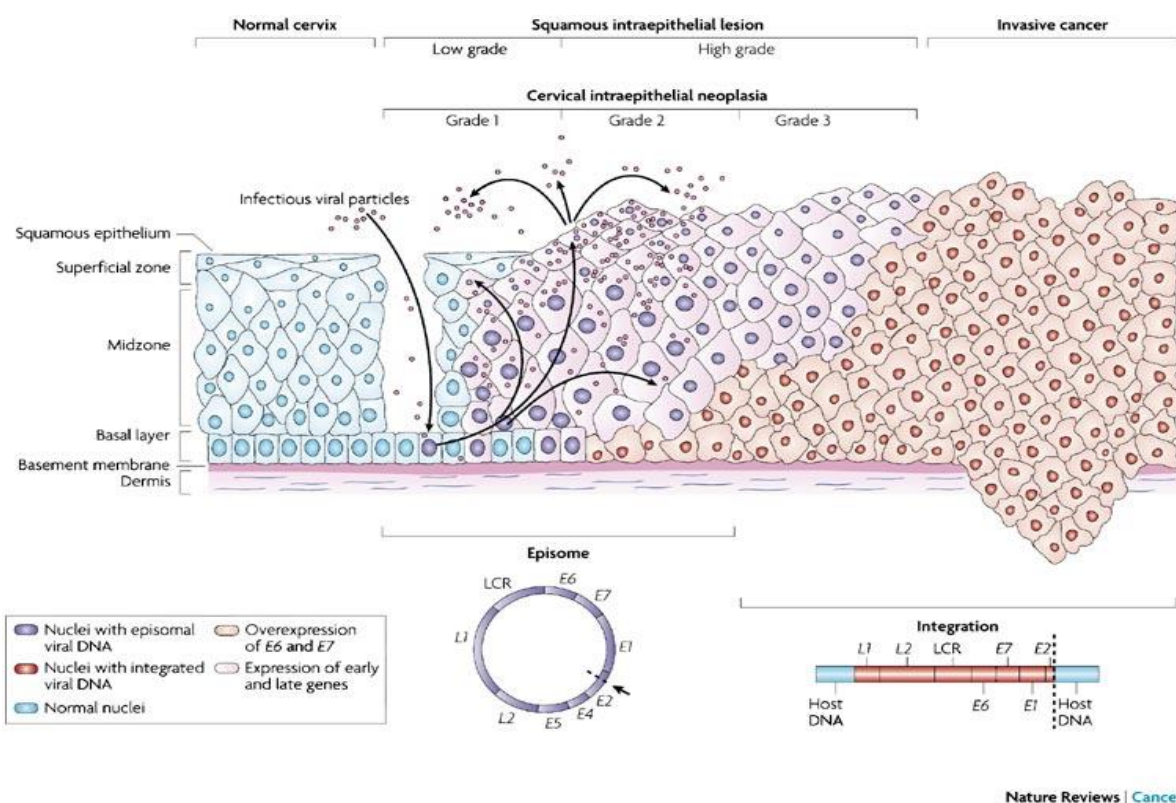
De uma forma geral, os papilomavírus seguem o ciclo produtivo previamente descrito, entretanto, a análise comparativa dos tipos virais por De Villiers e colaboradores (2004) mostrou que somente as regiões E1 e L1 do genoma são altamente conservadas, o que reflete diferenças na organização do ciclo viral entre os tipos e estratégias diversas para assegurar uma infecção produtiva (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Nas células basais recém-infectadas, o genoma viral pode permanecer com baixo número de cópias episomais, expressando somente as proteínas virais precoces e caracterizando então, um estado não produtivo da infecção, o que justifica a persistência viral por muitos anos, configurando um pré-requisito para o desenvolvimento do câncer e suas lesões precursoras (BRENNAN; SYRJANEN, 2003). Já o estado produtivo da infecção inicia-se quando as células filhas derivadas das células basais iniciam a diferenciação, possibilitando a síntese viral (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). Durante uma infecção latente, o padrão de expressão viral nas células basais é similar ao de uma infecção produtiva, sugerindo que nessa fase E6 e E7 não são essenciais (ZHANG *et al.*, 1999).

Na maioria dos casos, a infecção é eliminada pelo sistema imune, no entanto, as lesões podem persistir e em algumas situações alguns tipos virais podem levar ao desenvolvimento de carcinoma, como consequência de um ciclo viral incompleto (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). A persistência é incomum, quando comparada ao *clearance* viral e pode ser definida como a detecção de um mesmo tipo viral por duas vezes em um certo intervalo de tempo, que tem sido previsto variar de 6 meses a 1 ano, embora ainda não haja um consenso, tendo em vista que o tempo de duração da infecção para os HPV de alto risco oncogênico tende a ser maior, implicando na patogênese de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; FRANCO *et al.*, 1999; GIULIANO *et al.*, 2002a; MUNOZ *et al.*, 2004). Outros aspectos da infecção podem contribuir para a progressão da doença, como o tipo de HPV infectante, a carga viral e a presença concomitante de outras enfermidades. Sabe-se, que a presença do HPV 16 e a alta carga viral estão claramente associadas com a presença de doença (CUZICK *et al.*, 2003).

São observadas divergências no comportamento dos diferentes tipos virais, como exemplo, naqueles considerados de alto risco oncogênico, tal como o HPV 16. As oncoproteínas E6 e E7 ao interagirem com p53 e pRb, desencadeiam um aumento na frequência de mutações e rearranjos cromossômicos, contribuindo para a transformação maligna; enquanto as mesmas oncoproteínas nos HPV de baixo risco oncogênico apresentam menor afinidade por essas proteínas supressoras de tumor, ligando-se a elas com menor avidéz, o que inviabiliza a degradação das mesmas (BRENNAN; SYRJANEN, 2003; CLASSON; HARLOW, 2002; HECK *et al.*, 1992; MUNGER; HOWLEY, 2002; SCHEFFNER *et al.*, 1990).

Figura 4 – Representação esquemática da patogênese do HPV



Fonte: WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007

As lesões cervicais observadas resultam da habilidade que os diferentes tipos de HPV possuem em interferir na proliferação e estabilidade genômica da célula hospedeira. As etapas que contemplam a transformação da cérvix normal até o câncer já estão bem esclarecidas e baseado nas constatações, com o intuito de se garantir a reprodutibilidade na observação das anormalidades citológicas e histopatológicas foi estabelecida, no ano de 1991, uma uniformização da nomenclatura dos achados citológicos, conhecida como Sistema Bethesda, sendo revisada no ano de 2001, a qual incluiu o termo lesão intraepitelial escamosa (SIL), subdividida em: “lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL)” e “lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL)”. As LSIL contemplam a neoplasia intraepitelial cervical de grau I (NIC I) ou displasia leve, atipia colocitótica e condiloma. As HSIL compreendem NIC II (neoplasia intraepitelial cervical de grau II), NIC III (neoplasia intraepitelial cervical de grau III) ou displasias moderada e grave/ carcinoma *in situ* (Figura 4). A terminologia NIC é especialmente auxiliar para se permitir correlacionar os achados citológicos e histopatológicos e pode ser

substituída por SIL ou ainda ser utilizada como um descritor adicional (BULKMANS *et al.*, 2004; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; SOLOMON *et al.*, 2002).

As neoplasias intraepiteliais cervicais recebem a sua terminologia de acordo com o tamanho e localização no tecido lesado. Nas classificadas como NIC I, as células das camadas basais e parabasais apresentam poucas atipias citológicas, com arranjo uniforme sobre a membrana e pouco desorganizadas, ocupando o terço inferior do epitélio. As alterações citológicas observadas nas células diferenciadas incluem binucleação, cavitação citoplasmática perinuclear e atipia nuclear. A interação da proteína viral E4 à citoqueratina leva ao colapso da matriz de citoqueratina, resultando em um halo perinuclear, alteração que em combinação com a atipia nuclear é referida como coilocitose ou atipia coilocítica (KOSS; DURFEE, 1955), característica de infecções produtivas por HPV (DOORBAR *et al.*, 1991).

As NIC classificadas como de alto grau - NIC II e NIC III – apresentam atipias celulares mais pronunciadas em comparação com as NIC I, com maior grau de desorganização e perda da polaridade celular, sendo que a extensão de células indiferenciadas ultrapassa o terço inferior do epitélio. As alterações celulares encontradas incluem condensação nuclear, elevado pleomorfismo, células com aumento nuclear e cromatina mais condensada, membrana nuclear mais proeminente. Naquelas consideradas como NIC II, as células basais atípicas e as figuras de mitose ocupam os dois terços inferiores do epitélio; enquanto que, nas consideradas NIC III, as figuras mitóticas e as células basais atípicas ocupam toda a extensão do epitélio (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; RICHART, 1987).

Em contraste com as lesões de baixo grau, a expressão aumentada dos oncogenes virais E6 e E7 nas lesões de alto grau acontece precocemente nas células basais, onde a capacidade de divisão e diferenciação ainda está preservada, conferindo maior risco de aquisição de erros genéticos sobre influências de agentes mutagênicos e ou predisposição genética para que se desenvolva a transformação (MUNGER, 2001; STOLER, 2000, 2003).

A infecção viral de células comprometidas com a diferenciação glandular, na maioria das vezes, resulta em infecção abortiva ou latente e raramente se tem a

desregulação viral. O HPV18 parece ser mais suscetível à indução da proliferação neoplásica em células glandulares quando comparado ao HPV16 (STOLER, 2003).

2.5 Diagnóstico da infecção por Papilomavírus humano

A detecção da infecção por Papilomavírus humano pode se dar por técnicas não-moleculares, classificadas também como indiretas, uma vez que não detectam o HPV, mas sim as alterações causadas pela infecção viral, como o câncer cervical e suas lesões precursoras (NIC). São elas: inspeção visual, colposcopia, citologia e histopatologia. Esses métodos são menos sensíveis e por se basearem na detecção de aspectos morfológicos são classificados como métodos sugestivos de infecção (COPE *et al.*, 1997; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007, LIE *et al.*, 1997).

A inspeção visual pode ser realizada utilizando-se o ácido acético que permite a visualização de epitélios acetobranco na cérvix uterina, resultantes de uma relação núcleo-citoplasma aumentada, que pode ser indicativa de metaplasia escamosa imatura, infecção por HPV e lesões pré-neoplásicas. O lugol, capaz de marcar o glicogênio presente em células epiteliais escamosas, também pode ser utilizado e a interpretação de áreas com alterações celulares se dá através da pouca marcação ou ainda inexistente por tal reagente. Já a colposcopia tem por objetivo visualizar a zona de transformação e possíveis áreas com anormalidades, podendo também ser necessária a utilização dos reagentes supracitados diante de lesões subclínicas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2005). A citologia e a histopatologia também detectam alterações morfológicas, com destaque para a observação da coilocitose como sinal de infecção por HPV, ressaltando que a presença dessa alteração pode ficar comprometida no exame histopatológico, uma vez que o processo de fixação ou falha na rehidratação pode resultar na formação de falsos halos perinucleares (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Sabe-se que mulheres aparentemente sem alterações pelos métodos indiretos de diagnóstico da infecção por HPV, podem estar infectadas e, considerando que, cerca de 10% daquelas com infecção persistente poderão desenvolver lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, justifica-se a necessidade da

realização de métodos moleculares, capazes de detectar o genoma viral, com o objetivo de prevenir a progressão para o câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007, RAMAEL *et al.*, 1999).

Métodos moleculares, também denominados como diretos, são utilizados para detecção do HPV, sendo classificados em: métodos que amplificam alvos (DNA ou mRNA), que incluem técnicas de PCR (*Polymerase chain reaction*), as quais utilizam primers consenso ou tipo-específicos; e, ainda, métodos que amplificam sinais (DNA), que incluem técnicas de hibridização, como Captura Híbrida II (HC II – Teste Digene[®], Qiagen, Duesseldorf, Alemanha), hibridização *in situ*, *southern/northern blots*, *dot blots* e sequenciamento por hibridização (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Duas técnicas têm sido amplamente utilizadas, a Captura Híbrida IITM e a PCR (*Polymerase chain reaction*). A primeira utiliza dois coquetéis de sondas de RNA, permitindo a identificação de dois grupos virais: A – baixo risco oncogênico (HPV 6, 11, 42, 43 e 44); e B – alto risco oncogênico (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Esta técnica permite quantificar a carga viral, no entanto, não permite identificar o tipo viral específico nem infecção por mais de um tipo viral (SCHIFFMAN *et al.*, 1995; SWYGART, 1997). Ressalta-se que a detecção de um tipo particular de HPV tem sido útil no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias intraepiteliais cervicais e do câncer cervical (LOMBARD *et al.*, 1998). Para tanto, a introdução de métodos baseados na PCR tem sido implementados a fim de se superar a limitação apresentada pela captura híbrida.

A PCR utiliza *primers* consenso que são direcionados para a região altamente conservada do gene L1, com maior utilização dos sistemas MY 09/11 (MANOS *et al.*, 1994) e a sua versão modificada PGMY 09/11 (GRAVITT *et al.*, 2000). A PCR mostrou-se mais eficiente na detecção do HPV-DNA quando comparada à técnica de hibridização (COUTLEE *et al.*, 2002; GRAVITT *et al.*, 2000; KORNEGAY *et al.*, 2001) e tem sido considerada promissora em vários aspectos, uma vez que pode ser utilizada para diversos fins, como a detecção, genotipagem, quantificação viral e sequenciamento do DNA (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; GRAVITT *et al.*, 2000; JACOBS *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 1998). A PCR aplicada à genotipagem utiliza primers tipo-específicos, sendo baseada no polimorfismo das regiões E6 e E7, útil na caracterização do tipo viral em infecções simples e múltiplas

(CLAVEL *et al.*, 1998; HUBBARD, 2003; KADO *et al.*, 2001; WALBOOMERS *et al.*, 1999). A importância de se diagnosticar infecções múltiplas por HPV se justifica por evidências que demonstram a sua associação com maior risco de persistência viral e de câncer cervical (HO *et al.*, 1998; KJAER *et al.*, 2005; TROTTIER *et al.*, 2006), além de permitir a realização de estudos que avaliem a possível vantagem competitiva que alguns tipos de HPV de alto risco tenham em relação a outros (BECKER *et al.*, 1994; MERIKUKKA *et al.*, 2011).

A PCR pode ainda ser complementada pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e envolve a produção de padrões de digestão do material derivado da amplificação por PCR através da utilização de enzimas de restrição, possibilitando a classificação de praticamente todos os HPV mucosotrópicos, com elevado nível de sensibilidade e confiabilidade (KADO *et al.*, 2001; LUNGU; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1992; MEYER *et al.*, 1995; NOBRE; ALMEIDA; MARTINS, 2008; NOBRE *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2006).

A RQ-PCR (*Real-Time Quantitative Polymerase Chain*) é um método de amplificação de sequência alvo de elevada sensibilidade, que permite determinar a carga viral (cópias/célula) (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; HEID *et al.*, 1996; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007). Esse método acumula as características de alta sensibilidade analítica e clínica, sendo validada pela Organização Mundial da Saúde para aplicação na prática clínica, uma vez que evidências apontam a forte associação entre a elevada carga viral de tipos de HPV altamente oncogênicos e o maior risco de desenvolvimento de neoplasias cervicais (JOSEFFSON *et al.*, 1999; SWAN *et al.*, 1997; VAN DUIN *et al.*, 2002; YLITALO *et al.*, 2000b).

A associação da RQ-PCR com o teste citológico tem sido indicada como a forma mais eficaz de se reduzir a incidência de câncer cervical e suas lesões precursoras em mulheres, sobretudo naquelas que já apresentam lesões cervicais de baixo grau (HULA *et al.*, 2013).

2.6 Imunoprofilaxia da infecção por HPV

Atualmente, estão disponíveis duas vacinas profiláticas para a infecção por HPV, as quais foram desenvolvidas através de métodos recombinantes capazes de gerar partículas semelhantes a vírus (*virus like particles* – VLP) a partir da expressão da proteína L1 do capsídeo viral por diferentes vetores de expressão (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012; LOWY; SCHILLER, 1998; MCNEIL, 1997; MUNOZ; BOSCH, 1996; STELLER; SCHILLER, 1996, STOLER *et al.*, 2000). Uma das vacinas é bivalente (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica), composta por antígenos VLP para HPV 16 e 18 e, a outra é quadrivalente (Gardasil®, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, EEUU), contendo antígenos VLP para os tipos 16, 18, 6 e 11. Ambas foram desenvolvidas somente para fins profiláticos da infecção e doença HPV-induzida, demonstrando uma eficácia superior a 90% na prevenção de lesões de alto grau entre mulheres com 15-26 anos que não apresentaram evidências de infecção recente ou passada. Uma nova vacina tem sido desenvolvida pela Merck & Co., Inc., contendo antígenos dos tipos HPV 6, 11 e sete oncogênicos (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) responsáveis por 90% dos casos de câncer uterino, e encontra-se em testes de eficácia e segurança (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A Organização Mundial da Saúde recomenda que a vacinação seja feita em período anterior ao início das atividades sexuais, para que se tenha uma maior efetividade, uma vez que evidências mostram que a maioria das infecções por HPV é adquirida logo após o início da vida sexual ativa. O programa vacinal prevê três doses ao longo de seis meses em meninas de 9 a 13 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Em algumas regiões do Brasil, a vacinação já é fornecida por iniciativa dos poderes públicos estaduais ou municipais, como por exemplo, no Distrito Federal e no Rio de Janeiro, e recentemente foi aprovada a incorporação da vacina para o HPV no programa de vacinação nacional, com previsão de sua inclusão no calendário do ano de 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2.7 Resposta imune ao Papilomavírus humano

A maioria das infecções causadas pelo HPV regride de forma espontânea em dois anos, entretanto sob certas circunstâncias, cerca de 10% persistem, resultando no desenvolvimento de lesões cervicais e possível progressão neoplásica (SCHIFFMAN; CASTLE *et al.*, 2007; STERN *et al.*, 2000). A história natural da infecção pelo HPV sugere que diversos fatores estão relacionados com o desenvolvimento do câncer e, a persistência viral tem sido considerada como o principal fator de risco, a qual, por sua vez, se estabelece muito provavelmente devido à resposta imune deficiente (KOSHIOL *et al.*, 2008; MUÑOZ, 2000).

O HPV utiliza de uma série de mecanismos que impedem a sua detecção pelo sistema imune, como por exemplo, a baixa viremia, a replicação não-citolítica em células que já estão destinadas à morte celular natural, o poder supressivo das oncoproteínas E6 e E7 sobre a produção de INF- γ , a modulação da apresentação antigênica, o mimetismo molecular com proteínas do hospedeiro, dentre outros (HASAN *et al.*, 2007; KANODIA *et al.*, 2007; STANLEY, 2010). Tais mecanismos evasivos justificam a pouca ou nenhuma resposta inflamatória e, o que se observa é que diante de infecções virais que cursem com inflamação, a presença de cofatores como, tabagismo, paridade, uso de contraceptivos orais, coinfeção por outras DST e múltiplos parceiros, pode estar relacionada (CASTLE; GIULIANO, 2003).

Tanto a resposta inata quanto a adaptativa desenvolvem importante papel na proteção ao Papilomavírus. Embora a resposta imune humoral ao HPV já esteja bem caracterizada (BHAT *et al.*, 2011), destacando-se a importância de anticorpos neutralizantes na prevenção à infecção, enfatiza-se o melhor entendimento da imunidade mediada por células, devido ao seu papel determinante na evolução de uma infecção viral inicial, na regressão de lesões HPV-induzidas e na prevenção de infecções recorrentes (KANODIA *et al.*, 2007; KONYA; DILLNER, 2001; MELIEF *et al.*, 2002; STERN *et al.*, 2000). Diversos estudos mostram que hospedeiros com deficiência da imunidade celular desenvolvem com maior frequência lesões associadas ao HPV, como aqueles que apontaram que a deficiência generalizada de células T estava associada à maior incidência de neoplasia anogenital e ao risco relativo aumentado para o câncer cervical de 5,4 (intervalo de confiança de 95%, 3.9–7.2) (FRISCH *et al.*, 2000; TINDLE; FRAZER, 1994).

Uma vez que a infecção por HPV é restrita ao epitélio, o *clearance* viral deve ser realizado pelos componentes da imunidade local. O que se observa é que mesmo em indivíduos imunocompetentes, o Papilomavírus pode persistir por vários meses antes da ativação da resposta imune, a qual tem sido detectada somente na fase tardia da infecção, quando a carga dos antígenos virais aumenta (KONYA *et al.*, 2001). A soroconversão, com presença de pequenas concentrações de anticorpos neutralizantes contra a proteína viral L1, tem sido observada após 8 a 9 meses da detecção do genoma do HPV 16 em somente 50-70% das mulheres com infecções genitais naturais (CARTER *et al.*, 2000).

A falha do sistema imune em reconhecer o vírus tem sido explicada pela natureza do ciclo replicativo do HPV, o qual está ligado aos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro, e baixos níveis das proteínas virais precoces, restritas ao compartimento nuclear, são expressos nas células basais e parabasais, levando a uma exposição insuficiente de antígenos virais às células efectoras da eliminação viral, incluindo os linfócitos T citotóxicos (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007). Embora já se tenha observado o potencial imunogênico de E5, E6 e E7, quando administradas como vacinas (CAMPO *et al.*, 1993; KIRNBAUER *et al.*, 1996; TINDLE, 1996), nota-se que, durante a infecção natural, a baixa expressão dessas proteínas tende a causar tolerância ou anergia de células T, sugerindo que essas se encontram abaixo do limiar necessário para a ativação celular (O' BRIEN; SAVERIA; CAMPO, 2002; VIOLA; LAZANVECHIA, 1996). De fato, em camundongos transgênicos para E6 e E7 de HPV16, a expressão dessas proteínas sem inflamação resultou em tolerância (DOAN *et al.*, 2000).

A presença de linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) é essencial para a eliminação viral e tem sido demonstrada em estudos que avaliam os componentes da resposta imune no microambiente tecidual infectado no decorrer da regressão das lesões, como por exemplo, aquele que detectou aumento na população de macrófagos, células NK, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em verrugas genitais que regrediram naturalmente (COLEMAN *et al.*, 1994); ou ainda, outro que observou que um padrão de expressão de citocinas do tipo Th1, definido como positividade para INF- γ /TNF e negatividade para IL-4, precedia o *clearance* viral (SCOTT; STITES *et al.*, 1999).

Observa-se que a imunidade inata possui um papel limitado na resposta do hospedeiro frente à infecção pelo Papilomavírus. O HPV é capaz de ativar os *Toll*-

like Receptors (TLRs) presentes nas células apresentadoras de antígenos (APCs), no entanto, a eliminação ou persistência viral é determinada pela quantidade e tipo de APC presente na resposta, observando uma imunidade mais efetiva quando da participação de células dendríticas ativadas ou maduras. A persistência viral tem sido associada à deficiência de moléculas co-estimulatórias nas APCs, resultando em uma resposta de célula TCD8⁺ mais tolerogênica do que citotóxica. Sabe-se da importância dos TLR para o aumento da expressão dessas moléculas co-estimuladoras e evidências mostram o mecanismo evasivo utilizado pelo HPV ao induzir, através de E6 e E7, a regulação negativa na expressão de TLR9 (FAUSCH; DA SILVA; KAST, 2003; HASAN *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2004). Observações clínicas mostram que as células de Langerhans estão diminuídas no sítio de infecção do HPV, o que pode ser justificado pelo impedimento da ligação dessas aos queratinócitos, devido ao bloqueio físico exercido pela interação entre *E-cadherin* e E6 do HPV 16 na superfície celular, ou ainda pela diminuição ou ausência de expressão de diversas moléculas de adesão mediada por E6, tanto nos queratinócitos quanto nas células de Langerhans, evento que tem sido observado em biópsias de lesões pré-malignas e malignas (CONNOR *et al.*, 1999; HUBERT *et al.*, 2005; LEHTINEN *et al.*, 1993; MOTA *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 1993). Diante de poucas APCs no ambiente infectado, seria de se esperar que outras fossem recrutadas para o local, no entanto, nota-se que os queratinócitos que contêm E6/E7 expressam níveis diminuídos de MIP-3 alfa (*macrophage inflammatory protein-3 alpha*), considerado como o principal fator quimiotático de precursores de células de Langerhans, comprometendo a migração de novas células (GUESS; MCCANCE, 2005).

As proteínas virais precoces de tipos de HPV oncogênicos podem ainda interferir na via de processamento e apresentação antigênica por moléculas de classe I do *Major Histocompatibility Complex I* (MHC I), levando ao comprometimento da resposta adquirida mediada por linfócitos T citotóxicos. Observa-se que células tumorais induzidas por Papilomavírus exibem perda de MHC I (BONTKES *et al.*, 1998; BRADY *et al.*, 2000). A diminuição na expressão e no transporte da molécula de MHC de classe I à superfície celular tem sido relatada, como observado no estudo que detectou que a proteína E7 do HPV16 e do HPV18 inibe o promotor da cadeia α da molécula de MHC I, e ainda a habilidade dessa

mesma proteína do HPV18 de inibir os promotores que regulam a expressão de TAP-1 (*antigen processing subunit 1*), responsável pelo transporte do peptídeo viral ao interior do retículo endoplasmático; assim como, de LMP-2 (*low molecular weight protein 2*), subunidade do proteassoma importante na degradação proteica. A habilidade de E7 em sub-regular esses promotores pode estar relacionada a sua atividade oncogênica (GEORGOPOULOS; PROFFITT; BLAIR, 2000). Outros estudos mostraram que a proteína E5 também sub-regula a expressão e o transporte de MHC I à superfície celular (ASHRAFI *et al.*, 2002; DIMAIO; MATTON, 2001; FACCINI *et al.*, 1996; PENNIE *et al.*, 1993; SCHAPIRO *et al.*, 2000), tendo sido proposto que E5 poderia também afetar a apresentação via MHC de classe II, essencial à ativação de células T CD4, impedindo a degradação e desligamento da cadeia invariante da molécula de MHC II e por consequência o acesso do peptídeo antigênico a essa molécula (ZHANG *et al.*, 2003). Evidências mostram que as células apresentadoras de antígenos são alvos do papilomavírus, os quais exercem efeitos supressivos mediados por E5 e E7 sobre as propriedades funcionais das mesmas (FRAZER *et al.*, 1999).

As células *Natural Killer* (NK) também representam, juntamente com os interferons, a primeira linha de defesa do organismo contra infecções virais, apresentando uma eficiência aumentada, de 20 a 100 vezes quando comparada ao linfócito T citotóxico, na habilidade de matar células infectadas na presença de INF- α e INF- β . Seria de se esperar que a diminuição de moléculas de MHC de classe I resultasse na capacidade citolítica aumentada das NK, no entanto, observa-se também uma fraca resposta anti-viral por essas células, justificada pelo fato de que a diminuição de moléculas de MHC classe I é seletiva, sendo mantida a produção daquelas responsáveis pela ligação aos receptores inibitórios de NK (KIRs), como HLA-C e HLA-E (ASHRAFI *et al.*, 2002). A supressão das vias do interferon pelo HPV também diminui a suscetibilidade das células infectadas à morte por NK (O'BRIEN; SAVERIA; CAMPO, 2002).

A produção de interferons do tipo I (alfa e beta), em células infectadas por vírus, é uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro, uma vez que esses mediadores são capazes de interferir na replicação viral, além de ativar e atrair, para o sítio da infecção, células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos, NK e células dendríticas (KANODIA *et al.*, 2007; SEN, 2001). O papilomavírus utiliza de

diversos mecanismos para escapar da via dos interferons, como o efeito observado pela proteína E7 em restringir a atividade inibitória do interferon- α (INF- α) sobre a replicação viral (BARNARD; PAYNE; MCMILLAN, 2000), ou ainda, aquele que, mediante a interação física entre E7 e o fator regulatório de interferon (IRF-1) é capaz de inibir a transcrição do interferon- β (INF- β) (PARK *et al.*, 2000). A literatura mostra também que a proteína E6 do HPV16 inibe a via dos interferons, sub-regulando genes responsivos ao INF (NEES *et al.*, 2001). Essa habilidade de inibir a via dos interferons pode ser uma característica limitada a certos tipos virais, como visto no estudo que demonstrou que indivíduos infectados por HPV 11 foram sensíveis ao tratamento com INF- α , em contraste com aqueles infectados por HPV 6 (GARCIA-MILLIAN *et al.*, 1999). Observa-se também que os INF tipo I não são capazes de inibir a transcrição de E6/E7 dos tipos HPV 16, 18 e 33, enquanto que o INF- γ é dotado de tal habilidade (WOODWORTH *et al.*, 1992).

A inibição da produção de citocinas e quimiocinas também é observada nas infecções por Papilomavírus. Observa-se, por exemplo, a regulação negativa de MCP I (*Human monocyte chemoattractant protein-1*), quimioatrativa para células T, NK e monócitos (LEONARD; YOSHIMURA, 1990); e de IL-8 (Interleucina-8), ativadora e quimioatraente para neutrófilos, basófilos e células T (HUANG; MCCANCE, 2002). A expressão de IL-18 também encontra-se diminuída por influência da E6 do HPV 16, comprometendo diversas funções exercidas por essa citocina, tais como: estímulo da expressão de genes associados com a inflamação, estímulo da resposta Th1 por indução da produção de INF- γ (CHO *et al.*, 2001), potencialização da atividade citotóxica e da produção de INF- γ por células NK (MAITKAINEN *et al.*, 2001).

Outros componentes, inclusive inerentes ao hospedeiro, podem estar envolvidos com a persistência do HPV e o desenvolvimento de neoplasias. Recentemente, as células T regulatórias (Treg) têm se destacado e evidências mostram a sua possível associação com a falha na eliminação viral. Pouco se sabe ainda sobre a presença, distribuição e função dessas células no microambiente infectado. Assim, espera-se alcançar nível de compreensão e controle da resposta imune que permita diferentes abordagens, como por exemplo, inibindo sua ação nas neoplasias e lesões precursoras, nas quais se deseja resposta imune mais vigorosa.

2.8 Células Imunorregulatórias

As células com propriedades regulatórias são fundamentais na modulação das respostas imunológicas a diversos componentes provenientes de patógenos, tumores, aloantígenos, autoantígenos e alérgenos (CRUVINEL *et al.*, 2008). Desempenham a sua função através de propriedades básicas como, a capacidade de produção de componentes imunossupressores, como IL-10 (interleucina-10) e TGF- β (*transforming growth factor- β*), além da habilidade de induzir a supressão mediada por contato célula-célula de diferentes tipos celulares na resposta imune (CRUVINEL *et al.*, 2008; VON BOEHMER, 2005). A ação contato-dependente pode ser explicada pelas altas concentrações do componente supressor cAMP citoplasmático que é transportado às células T efetoras através das *gap junctions* (BOPP *et al.*, 2007) ou ainda pela liberação de granzimas e perforinas (GONDEK *et al.*, 2005; GROSSMAN *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2006).

Vários subtipos celulares exibem características regulatórias, conforme descrito na Figura 5.

Figura 5 - Características principais de células com propriedades regulatórias

CÉLULAS REGULATÓRIAS	CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS
Treg FOXP3 ⁺ (LI <i>et al.</i> , 2013)	Linfócitos T CD4 ⁺ com elevada expressão de CD25, de origem tímica ou induzidas na periferia; supressão contato-dependente e secreção de fatores de supressão.
Th3 (FARIA; WEINER, 2005)	Linfócitos T CD4 ⁺ induzidos de origem periférica; supressão mediante síntese de TGF-β.
TR1 (RONCAROLO <i>et al.</i> , 2006)	Linfócitos T CD4 ⁺ induzidos de origem periférica; supressão mediante síntese de IL-10.
LT CD8 ⁺ CD28 ⁻ (CHANG <i>et al.</i> , 2002)	Linfócitos T CD8 ⁺ CD28 ⁻ capazes de inibir a atividade co-estimulatória das APCs; supressão mediante contato.
LT CD8 ⁺ Qa1 ⁺ (CHANG, <i>et al.</i> , 2002; LU; WERNECK; CANTOR, 2006)	Linfócitos T CD8 ⁺ com supressão mediada por interação do receptor Qa1 com indução de apoptose do alvo.
NK/T (KRONENBERG, 2005; SHARIF <i>et al.</i> , 2002)	Coexpressam marcadores de linhagem T e NK. Supressão através de síntese de citocinas regulatórias.
LT γδ (HAYDAY; TIGELAAR, 2003)	Linfócitos CD3 ⁺ CD4 ⁺ TCR γδ com poder supressor sob diferentes populações mediante liberação de fatores solúveis.
LT CD4 ⁻ CD8 ⁻ (ZHANG <i>et al.</i> , 2000)	Supressão de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ através de citotoxicidade e indução da apoptose.
LB CD1 ⁺ (MIZOGUCHI <i>et al.</i> , 2002)	Atividade regulatória mediada pela produção de fatores supressores como a IL-10.

Atualmente, as células T regulatórias (Treg) têm se destacado e são alvos de pesquisas que investigam sua geração e função como reguladoras das respostas imunes fisiológicas, além da sua participação em diversas enfermidades, como: doenças alérgicas, infecciosas, neoplásicas, autoimunes e no estudo da imunidade aos transplantes, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos imunopatogênicos envolvidos e também colaborar para o estabelecimento de terapêuticas imunorregulatórias que permitam reprogramar o sistema imune (AFZALI *et al.*, 2007; BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007; DEMENGOT *et al.*, 2006; KHAZAIE; VON BOEHMER, 2006). Evidências mostram que as Treg são células extremamente versáteis e adaptáveis às mais variadas situações encontradas, sendo caracterizadas por alguns autores como “as maiores mestres da regulação imunológica” (TANG; BLUESTONE, 2008).

Diferentes abordagens têm permitido inibir a atuação das Treg nas neoplasias e doenças infecciosas, no sentido de se obter resposta imune mais vigorosa; o contrário também é observado, com o objetivo de intensificar a atuação dessas células em doenças que cursem com a resposta imune exacerbada, como, nas doenças autoimunes, alérgicas e na rejeição aos transplantes. Evidências em neoplasias humanas apontam o forte envolvimento das Treg com a progressão neoplásica, sendo consideradas como fator preditivo de mau prognóstico quando presentes em elevada densidade no microambiente tumoral (DELEEUW *et al.*, 2012).

2.8.1 Células T regulatórias (Treg)

As Treg representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizada pela expressão da molécula CD25 (receptor da cadeia alfa da interleucina 2 - IL-2R α) em elevada quantidade e do fator de transcrição FOXP3 (*Forkhead box protein p3*). As Treg induzem a supressão de várias células da resposta imune, dentre elas, células T efectoras, mastócitos, células dendríticas e células B, através do bloqueio da ativação e função dessas, mostrando-se importantes no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não-próprios (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007; SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008; XIAOHONG *et al.*, 2013).

Atualmente as Treg têm sido descritas em duas principais subpopulações: naturais (nTreg) e induzidas ou adaptativas (iTreg ou aTreg), as quais compartilham muitas características fenotípicas e funcionais (SONG, GUO, ZHENG, 2012)

2.8.1.1 Células T regulatórias naturais

Foram primeiramente descritas por Sakaguchi e seus colaboradores (SAKAGUCHI *et al.*, 1995) e em seguida por SHEVACH (SHEVACH, 1998). Essas células são potencialmente capazes de suprimir a ativação, a proliferação e a função efetora dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, células NK, NK/T, linfócitos B e células dendríticas (SOJKA, HUANG, FOWELL, 2008; VON BOEHMER, 2005). Estão envolvidas com a manutenção da autotolerância e com a homeostasia do sistema imunológico (BAECHER-ALLAN; HAFLER, 2005), cuja relação foi demonstrada pela consequência fatal observada em camundongos deficientes de IL-2, CD25 ou FOXP3, ou ainda através da depleção dessas células em camundongos adultos normais (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; KHATTRI *et al.*, 2003). Em humanos, tal associação foi estabelecida em indivíduos com mutações no gene FOXP3 que desenvolveram doenças autoimunes em múltiplos órgãos, com consequências fatais (GAMBINERI; TORGERSON; OCHS, 2003).

As Treg naturais são comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos nos tecidos periféricos e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos (SAKAGUCHI, 2000, 2004; SHEVACH, 2000). O efeito supressivo dessas células pode ser mediado por contato e ainda por secreção de fatores inibitórios. A ação contato-dependente envolve o transporte de altas concentrações do componente supressor cAMP às células T efetoras através das *gap junctions* (BOPP *et al.*, 2007) ou ainda pela liberação de granzimas e perforinas (GONDEK *et al.*, 2005; GROSSMAN *et al.*, 2004; QIN HY *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2006). Evidências mostram que as Treg naturais conseguem suprimir e ou matar as células da resposta adquirida com efeito similar ao das células NK (LIKUNI *et al.*, 2009; WU; XU, 2010; ZHAO *et al.*, 2006).

As Treg naturais são produzidas naturalmente nos corpúsculos de Hassal no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras. O

estímulo para o desenvolvimento das Tregs FOXP3⁺ naturais ocorre durante a timopoiese normal e ainda é pouco conhecido, porém, acredita-se que estas células possam ser geradas mediante a expressão de antígenos próprios dependentes do AIRE (gene regulador autoimune) por células epiteliais medulares tímicas, seguido do reconhecimento antigênico por receptores (TCR) de alta afinidade. (CUROTTA DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; MALCHOW *et al.*, 2013; PICCIRILLO, 2008).

As nTreg representam 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas, são caracterizadas pela expressão constitutiva das moléculas FOXP3, GITR (receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide) e altos níveis de CD25, sendo geralmente denominadas como CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg ou ainda CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (BOER *et al.*, 2007; CRUVINEL *et al.*, 2008; SAKAGUCHI, 2005; YAGI *et al.*, 2004). A identificação fenotípica das nTreg em ensaios que avaliam a sua função supressora sofre modificações, uma vez que nesses casos, as células devem permanecer viáveis e por isso, a detecção de marcador nuclear FOXP3 fica impossibilitada. Tem sido demonstrado que a definição mais real para as nTreg nesses ensaios dá-se através da detecção de células CD4⁺CD25⁺CD127⁻/low (YU *et al.*, 2012).

As Treg naturais são descritas como as mais prevalentes em vários tipos de tumores e investigações sugerem que o ambiente tumoral recruta as Treg timoderivadas pré-existentes reativas a antígenos próprios AIRE-dependentes associados ao órgão de origem do câncer (MALCHOW *et al.*, 2013).

2.8.1.2 Células T regulatórias induzidas

As Tregs denominadas induzidas (iTreg) ou adaptativas (aTreg) são geradas na periferia após estímulos antigênicos; sob condições ditas tolerogênicas, como, concentrações de antígeno pouco imunogênicas e por estímulos de alérgenos provenientes da microbiota intestinal ou alimentos; e, ainda em tecidos cronicamente inflamados (BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007; CUROTTA DE LAFAILLE *et al.*, 2008; CUROTTA DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; TAAMS *et al.*, 2006).

O microambiente pode influenciar no desenvolvimento das Treg induzidas, no entanto, o entendimento sobre o seu papel na geração dessas células *in vivo* ainda permanece incompleto. Já está clara a necessidade do estímulo antigênico via TCR

e das citocinas TGF- β e IL-2 para a geração das iTreg, uma vez que esses elementos induzem a expressão da proteína FOXP3, fundamental no desenvolvimento e atividade das células Treg (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; XIAOHONG LIN *et al.*, 2013).

As Treg induzidas exercem sua função principalmente através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (JONULEIT; SCHMITT, 2003; SAKAGUCHI, 2006). Evidências mostram que essas células também podem desempenhar sua função através de efeito citotóxico mediado por granzimas e perforinas (GROSSMAN *et al.*, 2004; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Vários tipos de Tregs adaptativas têm sido descritos, classificando-se como iTreg FOXP3⁺ e outras duas subpopulações, TR1 produtoras de IL-10 (RONCAROLO *et al.*, 2006) e, Th3 produtoras de TGF- β (FARIA; WEINER, 2005), sendo as duas últimas derivadas de células CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ submetidas ao estímulo de TGF- β e IL-2 (HORWITZ; ZHENG; GRAY, 2008; OKAMURA *et al.*, 2012; ZHENG, 2012; ZHOU *et al.*, 2010).

2.9 Caracterização das células T regulatórias

A caracterização e a função das células T regulatórias têm sido traçadas por um crescente número de moléculas e processos descritos. Entretanto, o uso seguro e eficaz das Treg no campo da imunoterapia requer ainda a existência de métodos confiáveis de detecção, inclusive no que diz respeito à subpopulação a que pertencem.

Tanto as Treg naturais quanto as Treg induzidas apresentam como marcadores fenotípicos canônicos, as moléculas CD25, FOXP3, GITR e CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) (XIAOHONG LIN *et al.*, 2013). Entretanto, pesquisas mostram que as Treg naturais exibem maior expressão de *neurophilin-1* (Nrp1), PD-1 (*programmed cell death-1*), Helios (Ikzf2) e CD73 quando comparadas às Treg induzidas (YADAV *et al.*, 2012). Thornton *et al.* (2010) demonstraram que a expressão de Helios, um membro da família de fatores de transcrição Ikaros relacionado com o desenvolvimento e homeostasia linfocitária, é capaz de diferenciar nTreg de iTreg, concluindo que 70% da população de células T regulatórias periféricas é composta por nTreg timo-derivadas, capazes de

expressar esse marcador, diferente das Treg induzidas que não o expressam (THORNTON *et al.*, 2010).

A consideração mais consensual é de que, com exceção dos marcadores Helios e *neurophilin-1*, nenhuma das outras moléculas citadas pode fornecer individualmente a especificidade necessária para distinguir as nTreg das iTreg (XIAOHONG LIN *et al.*, 2013).

Outros marcadores de células T regulatórias também têm sido descritos, tais como: TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*), HLA-DR (*human leucocyte antigen*), CD27, Fas, CD62L e os receptores de quimiocinas CCR6, CCR7, CCR8 e CD103 (BACCHETTA, GAMBINERI, RONCAROLO, 2007). Entretanto, nenhum destes marcadores é exclusivo desta subpopulação celular, uma vez que refletem também o estado de ativação do linfócito T (GUPTA; SHANG; SUN, 2008).

Segue abaixo uma breve descrição dos marcadores fenotípicos e citocinas supressoras utilizados para a detecção das células T regulatórias no presente estudo.

2.9.1 FOXP3 (*Forkhead box P3*)

A descoberta da proteína FOXP3 permitiu avanços na identificação das células T regulatórias, classificando-se como um fator de transcrição que atua em regiões reguladoras específicas do DNA, aumentando ou diminuindo a transcrição de genes específicos (RUDENSKY, 2011; TORGERSON; OCHS, 2007). Essa proteína contém 431 aminoácidos, codificada pelo gene FOXP3, localizado no braço curto do cromossomo X em humanos e composto por 11 éxons, cuja expressão ocorre predominantemente nas células do timo, baço, linfonodos e particularmente nas células T CD4⁺CD25⁺ (TORGERSON; OCHS, 2007; YAGI *et al.*, 2004).

O fator FOXP3 é membro integrante da subfamília P das proteínas FOX (*forkhead box*), componentes de uma família de fatores de transcrição que contêm um domínio ligante de DNA altamente preservado denominado *forkhead/winged-helix*, cuja denominação se deve a sua forma de dupla-asa, semelhante a uma borboleta (COFFER; BURGERING, 2004; CAMPBELL; ZIEGLER, 2007; TORGERSON; OCHS, 2007).

Estudos mostram que o FOXP3 tem papel crucial no desenvolvimento e função das Tregs e também demonstram sua habilidade em regular moléculas

intracelulares relacionadas às respostas de células T efetoras (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; RUDENSKY, 2011; YAGI *et al.*, 2004). A identificação da mutação do tipo *frameshift* no gene FOXP3 mostrou a importância do fator de transcrição FOXP3 nas células Treg, a qual foi responsável pela geração do fenótipo de camundongos *scurfy*, uma linhagem mutante recessiva ligada ao X, que apresenta distúrbios auto-imunes graves com depleção completa de Tregs e óbito precoce (BRUNKOW *et al.*, 2001; TORGERSON; OCHS, 2007). Em humanos, a deleção do FOXP3 tem sido observada nos pacientes com a síndrome IPEX (*Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), caracterizada clinicamente por múltiplas doenças autoimunes, apresentando diarreia, eczema, diabetes com destruição das glândulas endócrinas, insulinite e tireoidite, a qual acomete meninos e culmina com óbito precoce em torno dos 2 anos de idade (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007; GAMBINERI; TORGERSON; OCHS, 2003; TORGERSON; OCHS, 2007).

2.9.2 GITR (*Glucocorticoid Induced TNF Receptor Family Related Protein*)

A proteína GITR (*Glucocorticoid Induced TNF Receptor Family Related Protein*), composta por 228 aminoácidos e de localização transmembrânica, é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (TNFRS) e codificada pelo gene GITR (*glucocorticoid induced TNF receptor Family gene*), originalmente descoberta em células T murinas tratadas com dexametasona, sendo capaz de inibir a apoptose induzida pelo receptor de célula T (NOCENTINI *et al.*, 1997). Pesquisas mostram que o GITR possui forte envolvimento com o controle da sobrevivência e diferenciação de vários tipos celulares, incluindo os linfócitos (MACEWAN, 2002; NOCENTINI; RICCARDI, 2005; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003; YOUNES; KADIN, 2003).

O GITR foi recentemente considerado como a segunda molécula característica de células CD25⁺CD4⁺ Tregulatórias (BUSHELL; WOOD, 2007) e a sua expressão é fortemente associada à expressão concomitante de FOXP3 (DE BOER *et al.*, 2007; ONNO *et al.*, 2007). Linfócitos T ativados também expressam GITR e seu papel está envolvido com a regulação negativa, levando à hiporresponsividade dessas células (BUSHELL; WOOD, 2007; RONCHETTI *et al.*, 2002). Outros linfócitos T (CD25⁻CD4⁺, CD8⁺), células dendríticas, células B e

macrófagos também expressam o GITR, porém em baixos níveis (MCHUGH *et al.*, 2002; SHIMIZU *et al.*, 2002). Estudos mostram que células T CD4⁺ produzem INF, IL-4, IL-2, mas não TGF- β , enquanto que células CD4⁺CD25⁺GITR⁺ e CD4⁺CD25⁻GITR⁺ produzem quantidade menor de INF e IL-4 e elevados níveis de IL-10 e TGF- β (SHIMIZU *et al.*, 2002; URAUSHIHARA *et al.*, 2003). A importância do GITR na regulação negativa desempenhada por células T regulatórias tem sido demonstrada em diversos estudos (MCHUGH *et al.*, 2002; NEGRINI *et al.*, 2006; SAKAGUCHI, 2004; SHIMIZU *et al.*, 2002; URAUSHIHARA *et al.*, 2003).

2.9.3 CD25 (*Alpha chain receptor of the interleukin 2 - IL-2R α*)

A expressão constitutiva de altos níveis do marcador CD25 (receptor da cadeia alfa da interleucina 2 - IL-2R α) é uma característica fundamental da grande maioria das células Treg FOXP3⁺ (SAKAGUCHI *et al.*, 1995, THORNTON; SHEVACH, 1998). Evidências mostram que a molécula CD25 é indispensável para a geração e manutenção das células Treg naturais CD4⁺ (ALMEIDA *et al.*, 2002, MALEK *et al.*, 2002), o que faz da IL-2 um fator de crescimento e de sobrevivência para tais células (KUNIYASU *et al.*, 2000). Em outros LT, como os LThelper, essenciais na eliminação do HPV, a alta expressão de CD25 só acontece quando tais células encontram-se ativadas (BALESTIERI, 2006).

2.9.4 Interleucina-10

A interleucina-10 (IL-10), primeiramente chamada de fator inibitório da síntese de citocinas, foi a primeira citocina identificada com habilidade de bloquear a resposta imune através da inibição da produção de várias citocinas, regulando a proliferação e diferenciação de muitos tipos celulares, tais como células B, células T, Natural Killer, células apresentadoras de antígenos, mastócitos e granulócitos (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE *et al.*, 1990, 2001; ZDANOV, 2004). A IL-10 humana consiste em um homodímero de 36 kDa, sendo que cada uma das duas cadeias polipeptídicas são compostas por 160 aminoácidos (WINDSOR *et al.*, 1993).

Diante das evidências que mostram suas funções imunomoduladoras, a IL-10 tem sido descrita uma forte candidata para aplicações terapêuticas no tratamento de

inflamações crônicas e agudas, autoimunidade, câncer e doenças infecciosas (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003).

2.9.5 TGF- β (Transforming growth factor- β)

O *transforming growth factor- β* faz parte de uma família de fatores de crescimento que controla um grande número de respostas celulares, possuindo importante papel no desenvolvimento e na homeostasia de diversos tecidos em humanos. A superfamília TGF- β é composta por um grupo de proteínas, que conjugam a característica de terem estrutura dimérica com 25 kDa. Foram identificadas em humanos três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, as quais desempenham sua função através das mesmas vias de sinalização intracelular, sendo a primeira isoforma a mais prevalente (CHEIFETZ *et al.*, 1987; KUBICZKOVA *et al.*, 2012; MITTL *et al.*, 1996).

Essa citocina é um elemento chave na inibição da proliferação e diferenciação celular, agindo como um agente supressor de tumor, entretanto, em células tumorais, a mesma perde seu potencial anti-proliferativo, passando a desempenhar um papel de fator oncogênico (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; KUBICZKOVA *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 1985; TUCKER *et al.*, 1984).

O envolvimento do TGF- β na regulação negativa da resposta imune é evidenciado em estudos que mostram sua forte atividade indutora da transcrição do FOXP3 (FANTINI *et al.*, 2004; JOSEFOWICZ; RUDENSKY; 2009). É visto também em ensaios de neutralização do TGF- β *in vivo*, em que se observa a inibição da diferenciação de células Treg induzidas FOXP3⁺ antígeno-específicas (MUCIDA *et al.*, 2005).

2.10 Regulação da resposta imune pelas células Treg e sua relação com o HPV

Os linfócitos T CD4⁺ exercem papel chave na resposta imune, coordenando a eliminação do patógeno. A diferenciação dessas células em linfócitos T helper efetores, ocorre mediante a apresentação antigênica por células apresentadoras de antígenos profissionais, capazes de expressar moléculas coestimulatórias, seguido do reconhecimento antigênico via receptor de linfócito T (TCR). As características adquiridas dos linfócitos T helper são fortemente influenciadas por citocinas

presentes no microambiente e o comprometimento com determinado perfil possibilitará o recrutamento de componentes necessários à eliminação específica do patógeno nos diferentes sítios. Já bem elucidada, a imunidade aos vírus se desencadeia mediante o comprometimento com o perfil Th1 e secreção das citocinas INF- γ e IL-2 (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Em paralelo, estão as células T regulatórias, estabelecendo a tolerância periférica e limitando a eficácia e magnitude das respostas mediadas pelas células T efetoras, com o objetivo de impedir uma resposta imune excessiva aos patógenos e de prevenir respostas inapropriadas contra autoantígenos e antígenos não-próprios considerados inócuos (SAKAGUCHI *et al.*, 2006).

Em contrapartida, a atuação das Treg pode resultar no controle insuficiente do patógeno, permitindo a sua persistência e levando à cronicidade do dano tecidual. Evidências mostram que em lesões HPV-induzidas, inclusive naquelas ocasionadas por HPV de baixo risco oncogênico, as Treg encontram-se em quantidade elevada, favorecendo a persistência viral. Observa-se que à medida que a lesão progride, a densidade de células Treg no microambiente infectado também aumenta (CAO *et al.*, 2008).

Muitos fatores podem favorecer o acúmulo de Treg no sítio da infecção por HPV, dentre eles: o dano tecidual desencadeado pela infecção viral que resulta na liberação de ligantes endógenos de *Toll-like receptors* (tais como, *heat shock proteins*, *b-defensins*), o que ativa a indução de Treg; antígenos próprios mimetizam antígenos virais, podendo se ligar ao TCR de células T regulatórias HPV-específicas; citocinas (IL-10 e TGF- β) secretadas em resposta à infecção por HPV podem colaborar para a indução de Treg; e, ainda a sugestão de que CCR4 guia as Treg para o sítio de apresentação antigênica nos órgãos linfoides periféricos e tecidos inflamados, levando à atenuação da resposta efetora de células T, inclusive ao HPV (CAO *et al.*, 2008; IELLEM *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2005; ROUSE *et al.*, 2006).

2.11 Utilização terapêutica das células T regulatórias

As células T regulatórias têm sido consideradas como promissoras no campo da imunoterapia para diversas doenças, possuindo importante atividade supressora em condições inflamatórias, sendo capazes de evitar o dano tecidual (CHEN; KONKEL, 2010; GRAY, 2008; ZHOU *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2013; TAAMS *et al.*, 2006). A utilização terapêutica dessas células tem sido considerada nas doenças infecciosas, alérgicas, neoplásicas, autoimunes e no campo da imunologia dos transplantes (AFZALI *et al.*, 2007; DEMENGEOT *et al.*, 2006; KHAZAIE; VON BOEHMER, 2006).

Sabe-se, entretanto, que embora as Treg sejam capazes de suprimir células T reativas a aloantígenos, elas podem também proteger tumores da vigilância imunológica do hospedeiro, fazendo das mesmas fortes candidatas para monitoramento da evolução de doenças, além de possíveis alvos terapêuticos, embora seu uso seguro e eficaz ainda requeira a obtenção de métodos confiáveis de identificação (COHEN *et al.*, 2010; HOFFMANN *et al.*, 2010; LODDENKEMPER *et al.*, 2009). Nesse sentido, a pesquisa das células T regulatórias em cada um desses grupos nosológicos tem o propósito de melhor compreender a imunopatogenia das doenças e propor perspectivas terapêuticas imunorregulatórias.

No que se refere ao tratamento de lesões HPV-induzidas observa-se que vários procedimentos têm sido utilizados incluindo, crioterapia, excisão cirúrgica, eletrocauterização e terapia a laser (BEUTNER; FERENCZY, 1997). Entretanto, tais métodos têm sido associados com elevadas taxas de recorrência, principalmente nos casos em que o HPV possa estar causando infecção latente em epitélio aparentemente normal externo à área de tratamento (FERENCZY *et al.*, 1985). Como alternativa, a imunoterapia pode ser promissora ao contemplar estratégias que aumentem a resposta específica ao HPV e que diminuam a supressão no microambiente infectado, tendo como possíveis alvos as células Treg para um tratamento eficaz. Nesse sentido, tem sido proposto que uma boa estratégia para o tratamento envolvendo as Treg seria realizar aplicação direta na lesão de um agente capaz de eliminar seletivamente essas células (IKEZAWA *et al.*, 2005; ONIZUKA *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2005).

Diante das evidências que mostram o forte envolvimento das células T regulatórias no desenvolvimento do câncer cervical de etiologia viral e com o objetivo de melhor compreender a resposta do hospedeiro ao HPV, a doença cervical e o possível papel das células T regulatórias presentes nas lesões cervicais HPV-induzidas, este estudo se propôs a detectar os marcadores fenotípicos e citocinas secretadas mais característicos dessa subpopulação celular com forte atividade supressiva.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Detectar marcadores fenotípicos de células T regulatórias e suas citocinas em pacientes infectadas pelo Papilomavírus humano (HPV).

3.2 Específicos

- Identificar a coexpressão dos marcadores CD25/FOXP3 e CD4/TGF- β em células presentes no estroma de cérvix uterina.
- Identificar a expressão de IL-10 e GITR em células presentes no estroma de cérvix uterina.
- Analisar a frequência de intensidade de expressão dos marcadores identificados dentre os achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina e de carga viral do HPV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Este estudo caracterizou-se como pesquisa descritiva observacional, de corte transversal, baseada na identificação de marcadores característicos de células T regulatórias, através da detecção por imunohistoquímica da coexpressão de CD25/FOXP3 e CD4/TGF- β ; assim como, da expressão de GITR e IL-10, em amostras de cérvix uterina de pacientes infectadas por HPV.

4.2 Local da pesquisa

As amostras incluídas neste trabalho foram coletadas no Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande - MS, o qual trata-se de laboratório de referência para o Estado e credenciado ao Sistema Único de Saúde.

A execução das reações de imunohistoquímica e a fotodocumentação das lâminas imunomarcadas, por sistema de captura de imagem, foram realizadas nos laboratórios de Imunologia Básica e de Captura de Imagem, respectivamente, ambos pertencentes ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS).

4.3 Sujeitos da pesquisa

O presente estudo foi realizado com amostras obtidas de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande – MS. Tais amostras contemplaram todas aquelas coletadas por esse laboratório no período de junho de 2010 a junho de 2011, caracterizando-se como uma amostragem obtida de forma não probabilística por conveniência, e que respeitassem os seguintes critérios para inclusão neste estudo:

- a) Ser proveniente de paciente com idade igual ou superior a 18 anos;
- b) Possuir resultado para a pesquisa de DNA-HPV, inclusive carga viral e genotipagem;
- c) Possuir resultado histopatológico para o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo uterino. As amostras obtidas de pacientes

negativas para DNA de HPV e Negativas para Lesão Intraepitelial e Malignidade (NILM) foram utilizadas como controles.

4.4 Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas através da conização em consultórios e ou clínicas especializadas, sob indicação de médico responsável pelo acompanhamento das pacientes e o material encaminhado ao Centro de Prevenção ao Câncer em solução conservante. Após as pacientes terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), parte do material fixado em formol e embocado em parafina foi cedido à pesquisa. Ressalta-se que foi obtida de cada paciente uma amostra de biópsia de cérvix uterina.

4.5 Análise histopatológica

Os exames histopatológicos foram realizados pela coloração de hematoxilina eosina e a leitura por patologista especializado. A classificação histopatológica foi realizada utilizando a normatização do Sistema Bethesda, 2001 (IARC, 2007):

- NILM: Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade
- NIC I: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I
- NIC II: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II
- NIC III: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III
- CA: Câncer cervical invasivo

Para as análises dos dados, as lesões foram agrupadas de acordo com a classificação da lesão intraepitelial escamosa (SIL), em Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL), compreendendo as classificadas como NIC I e Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau (HSIL) para aquelas classificadas como NICII e NICIII. Um terceiro grupo foi composto pelas amostras diagnosticadas carcinoma.

4.6 Detecção de DNA-HPV, tipagem e determinação da carga viral

A detecção e a quantificação do HPV foram realizadas pela técnica de RQ-PCR (*Real-Time Quantitative Polymerase Chain*) utilizando o kit *SuperScript III Platinum TwoStepqRT PCR with Sybr Green*, de acordo com as orientações do fabricante. A tipagem viral foi executada por PCR convencional seguida de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de acordo com Bernard *et al*, (1994). A extração automatizada de DNA (Magna Pure LC[®] Roche) seguiu as orientações do fabricante e os *primers* utilizados foram aqueles descritos por Payan *et al.*, (2007). A reação foi processada no equipamento *Light Cycler* e os resultados foram avaliados pelo aumento da fluorescência do SYBR *green* e análise das curvas de *Melting*. Em todos os casos foram utilizados controles negativos e positivos para garantir a qualidade dos resultados obtidos. Tais análises foram realizadas no Laboratório Centro de Genomas em São Paulo – SP.

Para fins de análise dos dados, a carga viral foi classificada nos seguintes níveis: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL) e CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

4.7 Análise imunohistoquímica

4.7.1 Imunohistoquímica de marcação simples

Essa técnica foi utilizada para a identificação da IL-10 e do marcador GTR presentes em células do estroma de cérvix uterina.

A partir das biópsias emblocadas em parafina, foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, para em seguida serem aplicados sobre lâminas de vidro limpas e previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). As lâminas com os cortes foram levadas à estufa a 60°C por 24 horas para melhor adesão do tecido e 30 minutos imersas no xilol a 60°C para desparafinização. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em uma sequência de banhos de etanol (100% por três vezes; 95%, 80% e 50% por uma vez), os cortes submetidos à recuperação antigênica, por calor úmido, com tampão Tris 10mM EDTA 1mM, permanecendo sob alta pressão por 3 minutos. Após o resfriamento, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena em dois

banhos de 10 minutos com peróxido de hidrogênio 10 volumes. Posteriormente, os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e deixados por 10 minutos em salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4.

Os anticorpos primários monoclonais anti-IL-10 (Invitrogen, clone 945A2A5/cód.AHC9102) e anti-GITR (*R&Dsystems*, goat IgG/cód. AF689) foram diluídos na proporção 1:50 em PBS com 1% de albumina. Em cada uma das lâminas foram adicionados cerca de 100µL do anticorpo diluído para então serem incubadas em câmara úmida a 37°C por 1 hora e 20 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com jato de PBS e colocadas em banho de tampão PBS por 5 minutos.

Para detecção do anticorpo primário foi utilizado o sistema LSAB+ Sys HRP® (Dako cód. K0690), aplicando-se inicialmente sobre as lâminas o anticorpo secundário biotilado, seguido de incubação a 37°C por 40 minutos e lavagem em PBS por 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se à aplicação do complexo estreptoavidina/biotina e nova incubação a 37°C por 40 minutos. Após incubação, as mesmas foram novamente lavadas com jato de PBS e colocadas em banho de tampão PBS por 5 minutos.

Por fim, o cromógeno líquido diaminobenzidina (DAB-EasyPath) foi aplicado sobre as lâminas, as mesmas incubadas por 10 minutos a 37°C e submetidas à lavagem com jato e banho em água destilada por 5 minutos para a interrupção da reação.

As lâminas foram então contra coradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, água amoniacal e em água destilada. Em seguida, foram desidratadas em uma sequência de banhos de etanol (50% e 95% uma vez; e, 100% três vezes), e por último em xilol. A montagem ocorreu em lâminula de vidro com Entelan® (Merck).

Como controle interno da reação, foram utilizados cortes de tonsila humana, sendo que, como controle positivo seguiu-se a metodologia acima descrita, enquanto que para o controle negativo, a mesma metodologia foi utilizada, suprimindo-se a etapa da adição do anticorpo primário, aplicando apenas o tampão PBS com 1% de albumina.

4.7.2 Imunohistoquímica de dupla marcação

A reação de imunohistoquímica de dupla marcação foi desenvolvida utilizando o sistema Vectastain® ABC de marcação de múltiplos antígenos. Essa técnica foi empregada para identificar a coexpressão dos marcadores CD25/FOXP3 e CD4/TGF- β , em células presentes no estroma das de cérvix uterina. Ressalta-se que a técnica abaixo descrita foi realizada individualmente para cada dupla de marcadores.

Os cortes histológicos fixados em lâminas de vidro, segundo procedimento descrito anteriormente, foram levados à estufa a 60°C por 24 horas para melhor adesão do tecido e colocadas em xilol por 30 minutos a 60°C para desparafinização. Em seguida, foram hidratados em uma sequência de banhos de etanol (100% por três vezes de 30 segundos, 95%, 80% e 50% por uma vez de 30 segundos) e submetidos à recuperação antigênica, em calor úmido, com tampão Tris 10mM EDTA 1mM, permanecendo sob alta pressão por 3 minutos e meio para a dupla marcação CD25/FOXP3 e, por 4 minutos para a dupla marcação CD4/TGF- β .

Após o resfriamento, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando água oxigenada 10 volumes, em dois banhos de 10 minutos cada. Os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e deixados por 10 minutos em salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4.

Na sequência, foi realizado o bloqueio da biotina endógena, utilizando o kit de bloqueio Avidina/BiotinaVector®. Para isso, aplicou-se sobre as lâminas a solução de avidina, incubando-as por 15 minutos a 37°C, em seguida, as mesmas foram lavadas rapidamente em PBS e procedeu-se a aplicação da solução de biotina, seguida de incubação por 15 minutos a 37°C. Na sequência, as lâminas foram enxaguadas e mantidas em dois banhos de PBS por 2 minutos cada. Em seguida, aplicou-se a solução de bloqueio de proteínas Vector® sobre as lâminas, incubando-as por 20 minutos a 37°C e posteriormente foram deixadas em banho de PBS por 5 minutos.

Os anticorpos primários monoclonais *anti-human* IL-2R/CD25 (eBioscience, clone: B-B10) e anti-CD4 (*Invitrogen*, clone 1F6, cat: 182282) foram diluídos nas proporções 1:50 e 1:100 respectivamente, em PBS com 1% de albumina. Em seguida, foram aplicados cerca de 100 μ l dos anticorpos sobre cada uma das lâminas e as mesmas incubadas a 37°C por 40 minutos para a marcação por anti-

CD25 e 1 hora para anti-CD4. Após a incubação do primeiro anticorpo da dupla marcação, as lâminas foram retiradas da estufa e mantidas em geladeira a 7°C *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com um jato de PBS e mantidas em banho, neste tampão por 5 minutos para então, após secas, aplicar sobre as mesmas duas gotas do anticorpo secundário biotinilado Vectastain® e incubá-las por 30 minutos a 37°C. Na sequência, as lâminas foram lavadas com um jato de PBS e deixadas em tampão por 5 minutos e em seguida, submetidas à aplicação do complexo ABC Vectastain® e incubação por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se nova sequência de lavagem e banho em PBS. Para finalizar a marcação dos anticorpos anti-CD25 e anti-CD4 foi adicionado sobre as lâminas o substrato enzimático DAB niquelado (DAB-Ni) Vector®, seguido de incubação a 37°C por 20 minutos e interrupção da reação com banho de 5 minutos em água destilada.

Finalizada a primeira marcação, procedeu-se à preparação das lâminas para a segunda marcação, através de bloqueio da biotina endógena e de proteínas, conforme descrito anteriormente.

Os anticorpos da segunda marcação, anti-FOXP3 (*eBioscience*, 236A/E7) e anti-TGF-β (*Spring Bioscience*, clone AF246-NAEF02, ref: E11264) foram, então, diluídos nas proporções 1:50 e 1:25, respectivamente, adicionados às lâminas para posterior incubação das mesmas por 30 minutos a 37°C, seguido de lavagem e banho em PBS por 5 minutos.

Posteriormente, foram aplicadas sobre as lâminas duas gotas do anticorpo secundário biotinilado Vectastain®, seguido de nova incubação por 30 minutos a 37°C, lavagem e imersão em PBS por 5 minutos. Na sequência, procedeu-se à aplicação do complexo ABC Vectastain®, incubação por 30 minutos a 37°C, lavagem e imersão por 5 minutos em PBS.

Adicionou-se às lâminas o substrato enzimático NovaRED® Vector para a marcação do FOXP3 e o substrato DAB Vector para o TGF-β, para em seguida incubá-las por 15 minutos a 37°C e por 20 minutos a 37°C, respectivamente. A reação de coloração foi interrompida com um banho de 5 minutos em água destilada.

As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris, seguido de lavagem em água corrente, água amoniacal e água destilada. Em seguida, as

mesmas foram passadas em banhos de etanol (50%, 95% uma vez e 100% três vezes) para a desidratação, mergulhadas em xilol e montadas em lâminula com Entelan® (Merck).

Como controle interno da reação, foram utilizados cortes de tonsila humana, sendo que, para o controle positivo seguiu-se a metodologia acima descrita, enquanto que para o controle negativo, a mesma metodologia foi utilizada, suprimindo-se a etapa da adição do anticorpo primário, aplicando apenas o tampão PBS com 1% de albumina.

4.8 Leitura das lâminas imunomarcadas

A leitura foi realizada no estroma cervical considerando apenas as células imunomarcadas com características morfológicas indicativas de linfócitos. As amostras foram consideradas positivas para a presença de coexpressão quando apresentam perfil de duplo-positividade para os marcadores, ou seja, quando da observação de colorações diferentes na mesma célula e associação destas com a localização dos marcadores em membrana e citoplasma (CD4/TGF- β) ou em membrana e núcleo (CD25/FOXP3).

A quantificação das células imunomarcadas foi realizada de forma subjetiva, avaliando-se 10 campos aleatórios e classificando-os em zero, um (*low*) e dois (*high*), de acordo com a quantidade de células coradas, correspondentes a: ausência, pequena e grande quantidade de células coradas, respectivamente.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 10X e 40X, por dois observadores independentes, previamente calibrados (Kappa = 0,9). Os casos de leitura discordante foram analisados concomitantemente pelos observadores, a fim de se produzir um consenso.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi desenvolvida utilizando os programas estatísticos SPSS versão 17.0 para Windows e BioEstat versão 5.0 para Windows. Para a comparação das médias de idade de acordo com os achados histopatológicos, foi utilizada a análise de variância, modelo linear univariável com Teste de Duncan. A análise de frequência entre os achados histopatológicos e a carga viral de acordo

com a intensidade de expressão dos marcadores estudados foi realizada pelos testes de Qui-quadrado (tabelas de contingência e partição individual).

4.10 Aspectos éticos

O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – CEP/UFMS sob o protocolo 1628 de 20 de maio de 2010 (Anexo A).

Todos os participantes do estudo foram informados a respeito dos objetivos do projeto e forneceram sua autorização por escrito, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

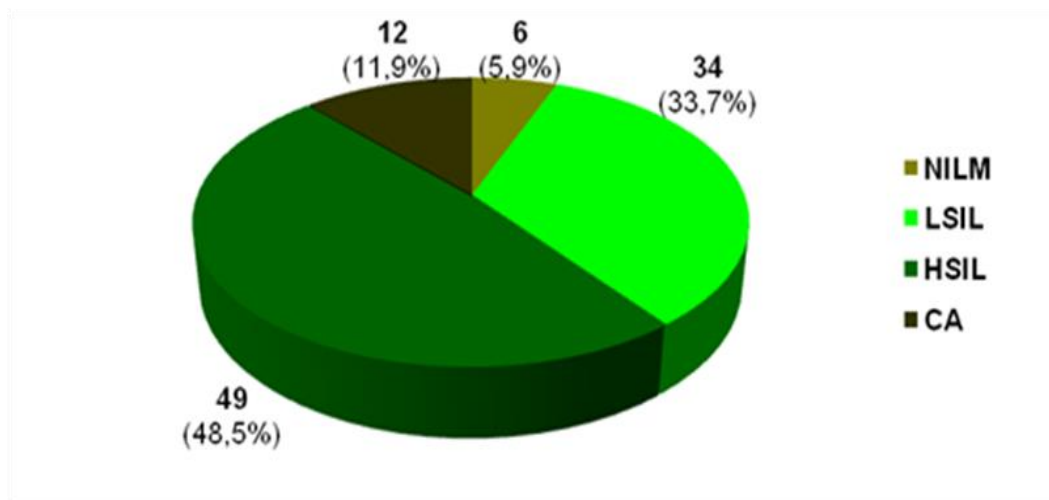
5 RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica e de carga viral

Para este estudo foram utilizadas 101 biópsias de cérvix uterina provenientes de 101 pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande, no período de junho de 2010 a junho de 2011. A idade das pacientes participantes do estudo variou de 18 a 71 anos, com idade média de $36,51 \pm 13,6$ anos.

Na Figura 6, observa-se a distribuição das amostras segundo os achados histopatológicos.

Figura 6 – Distribuição dos achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=101).



Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma.

Na Tabela 1, observa-se a média de idade de acordo com os achados histopatológicos ($p=0,003$), com diferenças significantes entre os grupos: NILM vs HSIL ($p=0,013$); NILM vs LSIL ($p=0,003$); CA vs HSIL ($p=0,029$) e CA vs LSIL ($p=0,006$).

Tabela 1. Média de idade de acordo com os achados histopatológicos em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 ($n=101$).

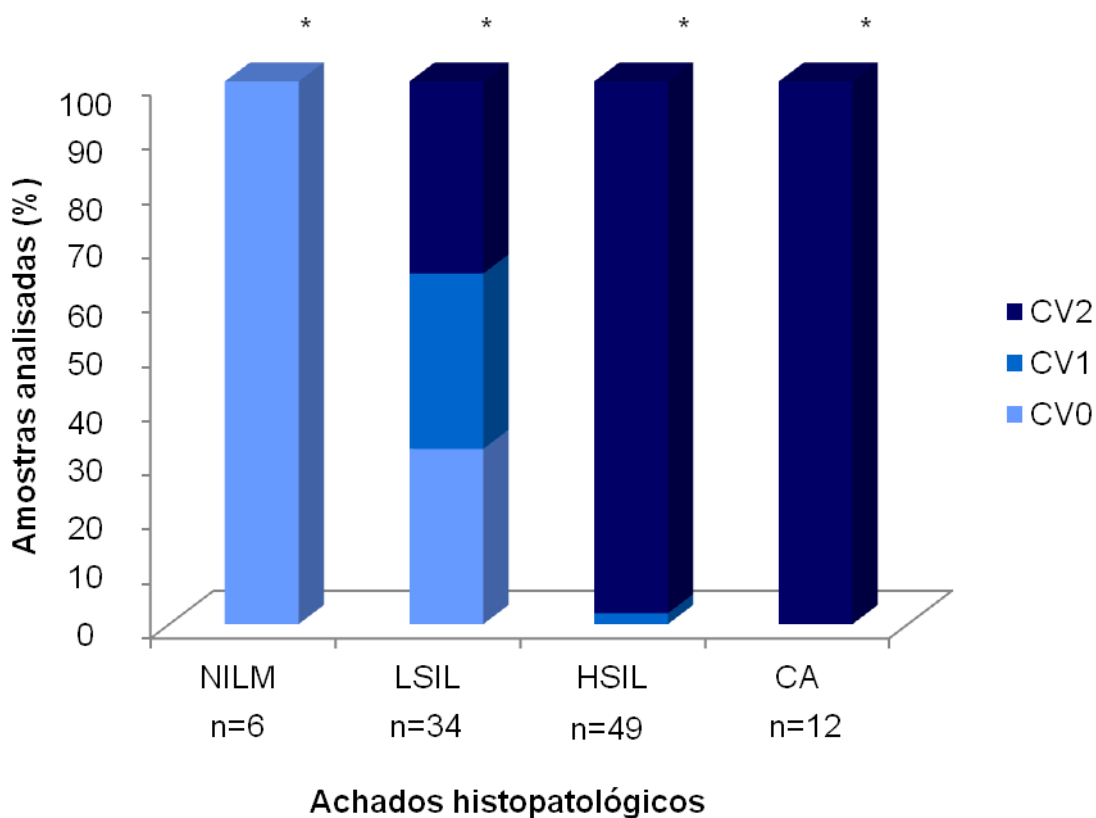
MÉDIA DE IDADE ANOS $\pm$ DP (faixa etária)	ACHADO HISTOPATOLÓGICO	N
49,66 $\pm$ 6,02 (43-57)	NILM	6
32,4 $\pm$ 12,64 (18-68)	LSIL	34
35,54 $\pm$ 13,86 (18-71)	HSIL	49
44,75 $\pm$ 11,05 (26-69)	CA	12

Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma.

A análise por RQ-PCR mostrou que dentre as 101 amostras analisadas, 84 (83,2%) foram positivas para HPV-DNA. A carga viral média obtida de DNA-HPV foi 66.546 ± 52.853 , variando de 1050 a 250.000 cópias virais/mL. A classificação das amostras segundo a carga viral resultou em 17 (16,83%) amostras classificadas em CV0; 12 (11,88%) CV1; e, 72 (71,28%) como CV2.

Todas as amostras com carcinoma ($n=12$) e 97,9% ($n=48$) daquelas designadas como HSIL tiveram a carga viral entre ≥ 10.000 e 250.000 cópias virais/mL, correspondendo a 83,3% daquelas classificadas como CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL). Todas as amostras NILM ($n=6$) e 33,3% ($n=11$) das amostras LSIL foram negativas para HPV-DNA (CV0) e quanto às amostras LSIL positivas para HPV-DNA, a carga viral se distribuiu uniformemente entre os níveis CV1 e CV2. Houve significância estatística entre a carga viral e os achados histopatológicos ($\chi^2= 74,65$; GL= 6; $p<0,001$) (Figura 7).

Figura 7 - Relação entre os achados histopatológicos e a carga viral em biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=101).



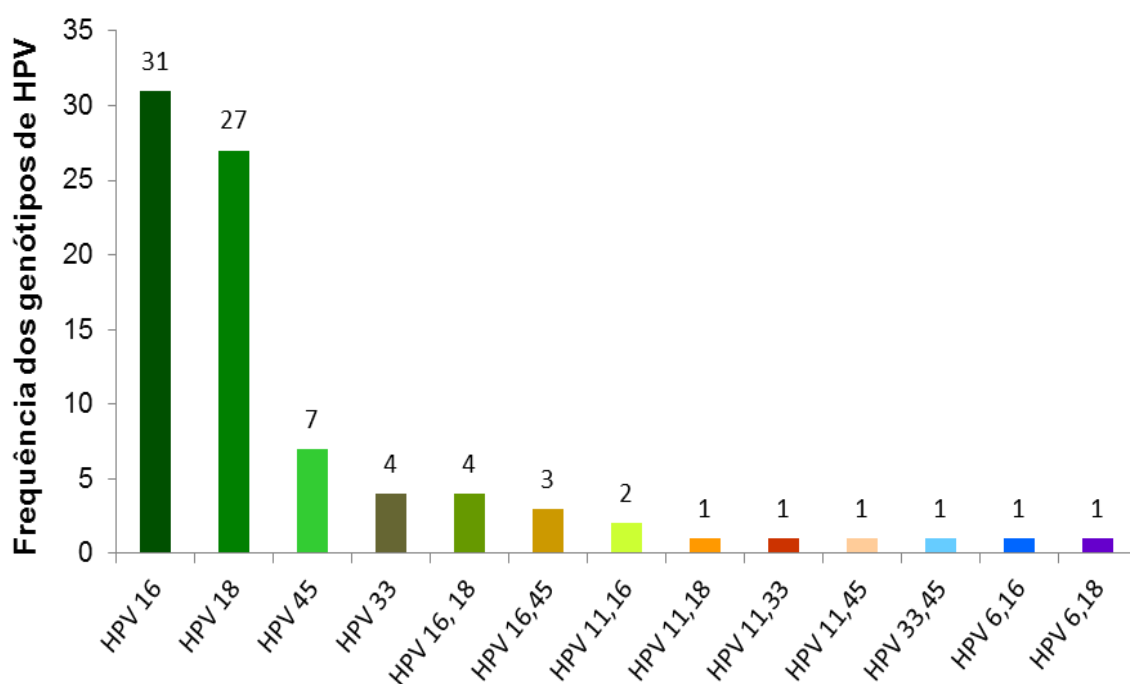
Nota: **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL). (* χ^2 :74,65; GL:6; $p<0,001$)

5.2 Genotipagem

Os tipos virais detectados nas amostras HPV positivas (n=84) em ordem decrescente de frequência foram: HPV16 (n=41, 48,8%), HPV18 (n=33, 39,3%), HPV45 (n=12, 14,3%), HPV33 (n=6, 7,1%), HPV11 (n=5, 5,9%) e HPV6 (n=2, 2,4%). Do total de amostras positivas, 82,1% (n=69) tinha apenas um tipo viral, com maior frequência atribuída ao HPV16 (31/69, 44,9%), seguido do HPV18 (27/69, 39,1%). Infecções múltiplas (n=15, 17,9%), por mais de um tipo viral, foram também detectadas, sempre causadas por dois tipos virais, com predomínio do HPV16 (10/15, 66,6%).

Na Figura 8, observa-se a frequência dos genótipos encontrados nas amostras positivas para HPV-DNA. Tipos de alto risco oncogênico (HPV16, HPV18, HPV33 e HPV45) foram observados em todas as infecções simples, por apenas um tipo viral, enquanto que tipos de baixo risco oncogênico (HPV6 e HPV11) foram encontrados em 7/15 (46,7%) com infecções múltiplas (Figura 8).

Figura 8 – Frequência dos genótipos de HPV encontrados em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012. (n=84).



Na Tabela 2, observa-se a distribuição dos genótipos de HPV segundo os achados histopatológicos nas amostras analisadas. Os HPV16 e HPV18 foram encontrados, em infecções simples, entre achados histopatológicos LSIL, HSIL e CA; enquanto que o HPV33 e o HPV45 foram observados, tanto em infecções simples como múltiplas, entre as amostras LSIL e HSIL. Nos casos classificados como carcinoma, foram encontrados apenas os HPV16 e HPV18, de alto risco oncogênico, sendo estes dois tipos, também responsáveis por 85,7% (n=42) das infecções em amostras classificadas como HSIL (Tabela 2).

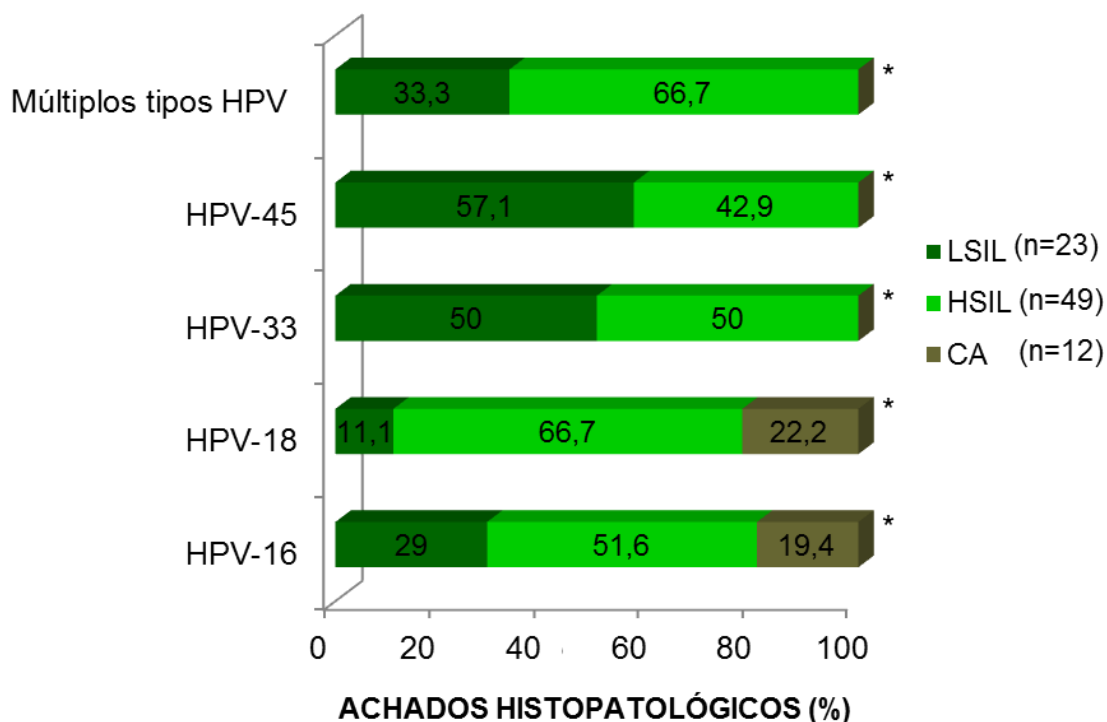
Tabela 2 – Distribuição dos genótipos de HPV segundo os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=84).

Genótipos	LSIL		HSIL		CA	
	N	%	n	%	N	%
HPV 16	9	39,2	16	32,7	6	50
HPV 18	3	13,1	18	36,8	6	50
HPV 33	2	8,7	2	4,2	-	-
HPV 45	4	17,5	3	6,1	-	-
HPV 11 e 16	1	4,3	1	2	-	-
HPV 11 e 18	1	4,3	-	-	-	-
HPV 11 e 33	-	-	1	2	-	-
HPV 11 e 45	-	-	1	2	-	-
HPV 16 e 18	1	4,3	3	6,1	-	-
HPV 16 e 45	-	-	3	6,1	-	-
HPV 33 e 45	1	4,3	-	-	-	-
HPV 6 e 16	1	4,3	-	-	-	-
HPV 6 e 18	-	-	1	2	-	-
Total	23	100	49	100	12	100

Nota: **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma.

Na Figura 9, observa-se a distribuição das amostras com infecção simples e múltiplas segundo os achados histopatológicos.

Figura 9 - Distribuição das amostras de biópsias de cérvix uterina com infecção simples ou múltipla de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer segundo os achados histopatológicos, Campo Grande – MS, 2012 (n=84).



Nota: **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. (* $p=0,043$; $\chi^2=15,945$; GL=8). Múltiplos tipos de HPV correspondem à associação dos genótipos: HPV11 e 16, HPV11 e 18, HPV11 e 33, HPV11 e 45, HPV16 e 18, HPV16 e 45, HPV33 e 45, HPV6 e 16, HPV6 e 18.

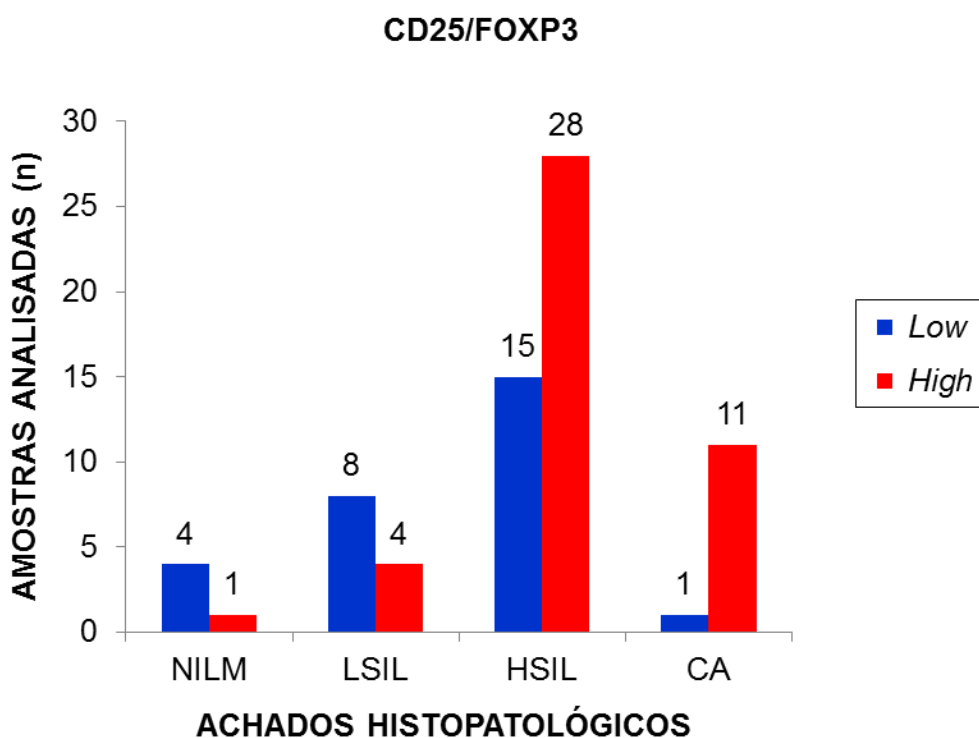
5.3 Análise imunohistoquímica

Segue abaixo a descrição dos resultados da análise imunohistoquímica, ressaltando-se a existência de diferenças quanto ao número amostral entre as marcações histológicas, tendo em vista a escassez de material das amostras obtidas.

5.3.1 Coexpressão dos marcadores CD25/FOXP3

Foram analisadas 72 amostras quanto à coexpressão dos marcadores CD25/FOXP3. Os resultados dessa análise, considerando os diferentes achados histopatológicos, podem ser observados na figura 10 e na tabela 3.

Figura 10 - Distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).



Nota: **Low**: pequena quantidade de células imunomarcadas; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD25/FOXP3; **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. ($\chi^2 = 12,456$; GL = 3; $p = 0,006$).

Na Tabela 3, observa-se predomínio de grande quantidade de células marcadas (*high*) para coexpressão de CD25/FOXP3 entre as amostras classificadas como carcinoma (91,6%), seguidas daquelas designadas como HSIL (65,2%). A análise de contingência entre achados histopatológicos e a coexpressão de CD25/FOXP3 obteve resultado estatisticamente significativo ($\chi^2= 12,456$; GL= 3; $p= 0,006$) (Tabela 3).

A análise pelo teste de Qui-quadrado, utilizando-se da partição individual, mostrou significância estatística quanto à intensidade de coexpressão de CD25/FOXP3 entre: NILM vs CA, NILM vs HSIL, CA vs LSIL e HSIL vs LSIL (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a coexpressão de CD25/FOXP3 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).

	ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS			
	NILM	LSIL	HSIL	CA
CD25/FOXP3				
Low (n=28)	4 (80%)	8 (66,7%)	15 (34,8%)	1 (8,4%)
High (n=44)	1 (20%)	4 (33,3%)	28 (65,2%)	11 (91,6%)
Total	5 (100%)	12 (100%)	43 (100%)	12 (100%)

Nota: **Low**: pequena quantidade de células imunomarcadas; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD25/FOXP3. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. ($\chi^2= 12,456$; GL= 3; $p= 0,006$).

NILM vs CA: $\chi^2= 87.314$; GL= 1; $p= 0,0031$

NILM vs HSIL: $\chi^2= 38.124$; GL= 1; $p= 0,0509$

NILM vs LSIL: $\chi^2= 0,3022$; GL= 1; $p= 0,5825$

CA vs HSIL: $\chi^2= 32.060$; GL= 1; $p= 0,0734$

CA vs LSIL: $\chi^2= 87.111$; GL= 1; $p= 0,0032$

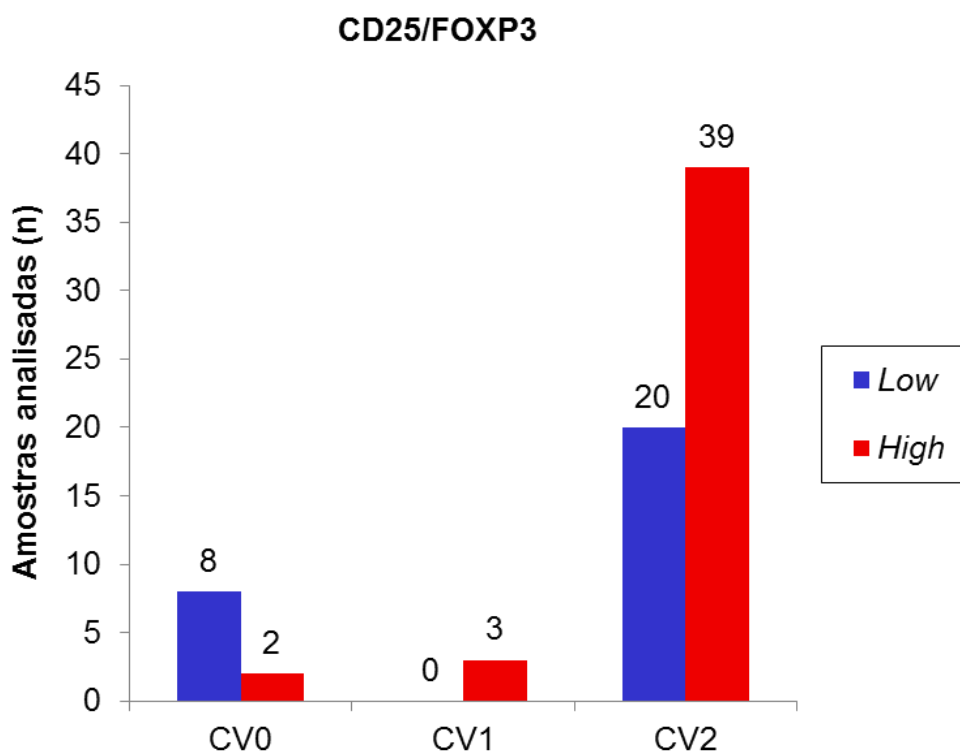
HSIL vs LSIL: $\chi^2= 38.951$; GL= 1; $p= 0,0484$

Entre o total de amostras analisadas (n=72), observa-se que 61,1% (44/72) das amostras foram positivas para coexpressão de CD25/FOXP3 com grande quantidade (*high*) de células imunomarcadas (Tabela 3).

Na Figura 11, demonstra-se a distribuição da carga viral segundo a coexpressão de CD25/FOXP3, com resultado da análise de contingência estatisticamente significativa ($\chi^2= 9,639$; GL= 2; $p= 0,008$).

Observa-se que entre as amostras negativas para HPV-DNA, somente 20% (2/10), apresentaram grande quantidade (*high*) de células imunomarcadas para a coexpressão de CD25/FOXP3. Entre as amostras HPV-positivas, todas aquelas classificadas como CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL) e 66,1% (39/59) daquelas designadas como CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL) apresentaram grande quantidade (*high*) de células imunomarcadas para coexpressão de CD25/FOXP3 (Figura 11).

Figura 11 - Distribuição da carga viral segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).



Nota: **Low**: pequena quantidade de células imunomarcadas; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD25/FOXP3. **CV - Carga Viral**: **CV0** (negativo para DNA-HPV); **CV1** (1050 a <10.000 cópias virais/mL); **CV2** (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL). ($\chi^2= 9,639$; GL= 2; $p= 0,008$).

Na Tabela 4, observa-se a distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 e a carga viral. Do total de amostras analisadas, 61,1% (44/72) apresentou grande quantidade (*high*) de células coexpressando CD25/FOXP3, distribuídas predominantemente entre as amostras classificadas como HSIL (28/44; 63,6%), seguido daquelas designadas como carcinoma (11/44; 25%) (Tabela 4).

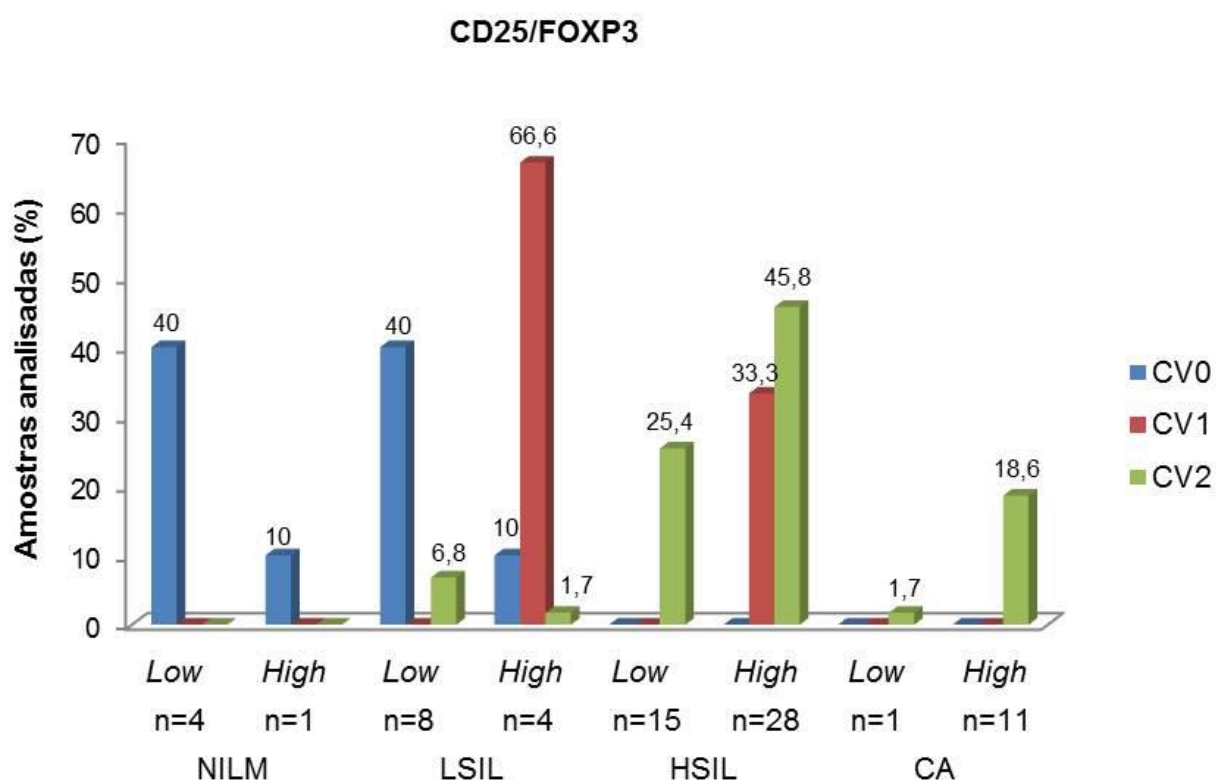
Tabela 4 - Distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 e carga viral, em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).

	NILM		LSIL		HSIL		CA	
	CD25/FOXP3		CD25/FOXP3		CD25/FOXP3		CD25/FOXP3	
	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
CV0	4	1	4	1	0	0	0	0
CV1	0	0	0	2	0	1	0	0
CV2	0	0	4	1	15	27	1	11
Total	4	1	8	4	15	28	1	11

Nota: **Low**: pequena quantidade de células imunomarcadas; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD25/FOXP3. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 12, observa-se a frequência da carga viral segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 e os achados histopatológicos. Houve predomínio (38/59; 64,4%) de amostras com carga viral CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL) entre as amostras designadas como HSIL e CA que apresentaram grande quantidade (*high*) de células coexpressando CD25/FOXP3.

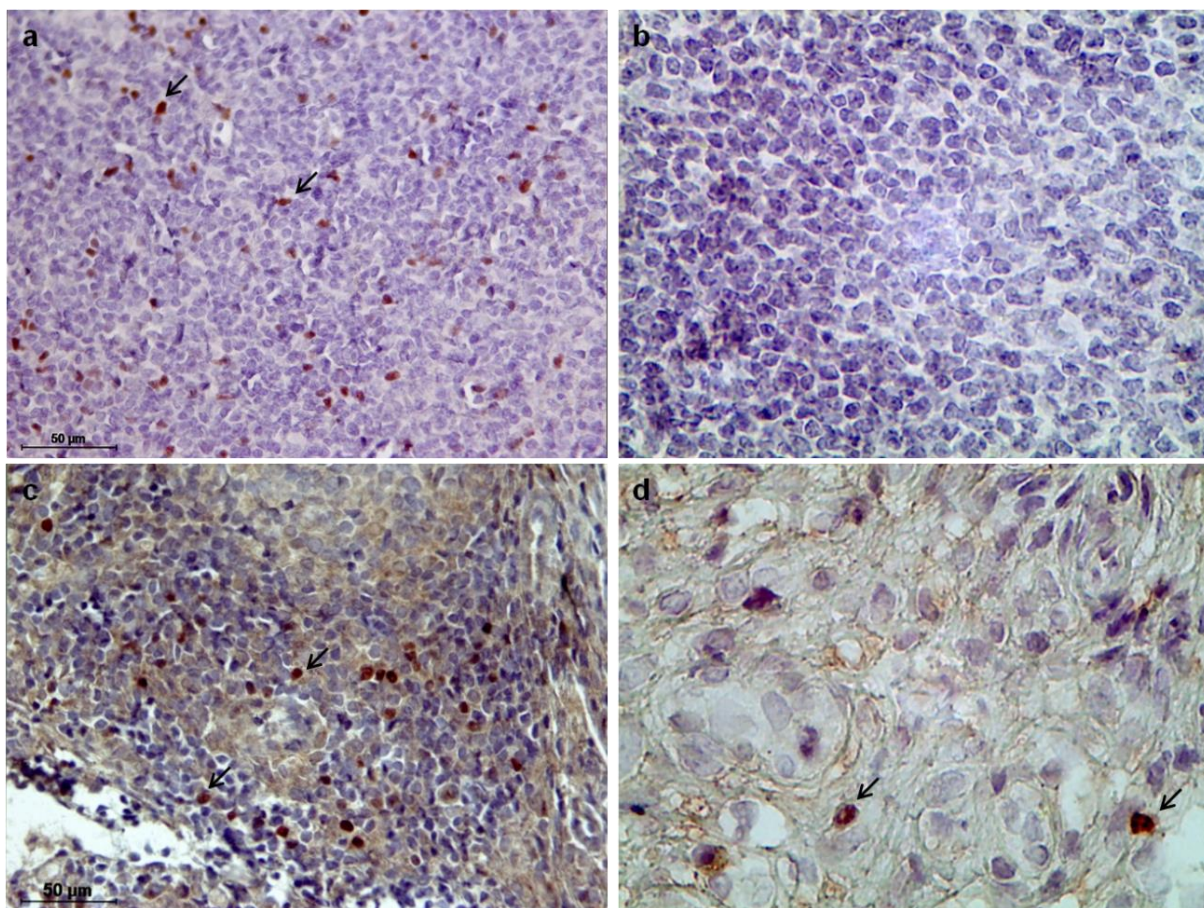
Figura 12 – Frequência da carga viral segundo a coexpressão de CD25/FOXP3 e os achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=72).



Nota: **Low**: pequena quantidade de células imunomarcadas; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD25/FOXP3. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 13, observa-se a coexpressão de CD25/FOXP3 em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina.

Figura 13 - Coexpressão de CD25/FOXP3 detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.

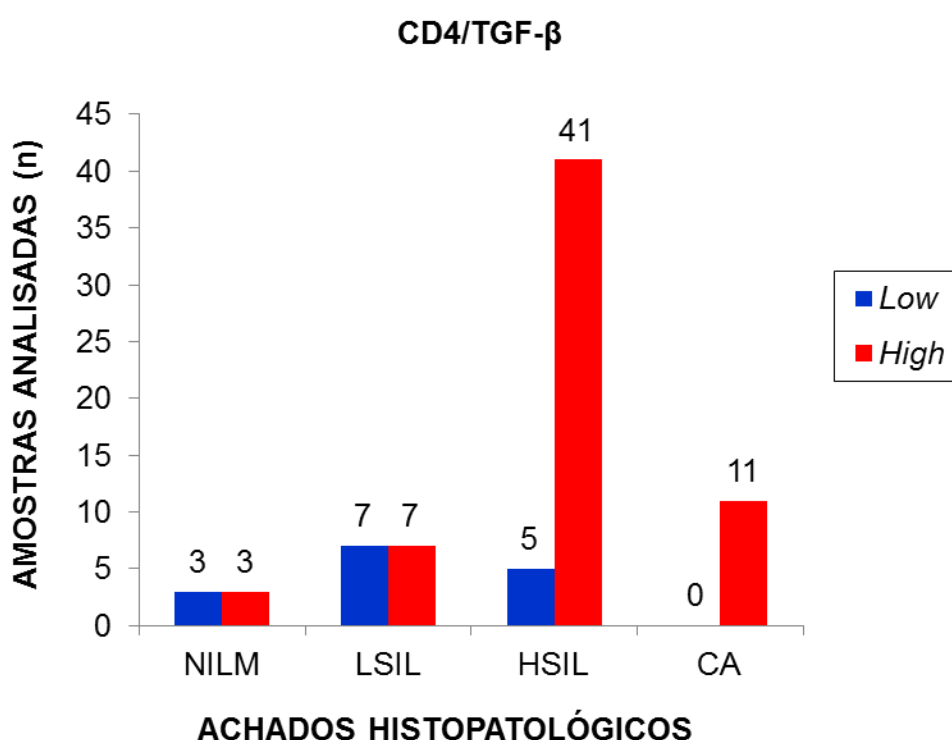


Nota: **a**: controle (+) - tonsila humana marcada com os anticorpos anti-CD25 e anti-FOXP3 humanos; **b**: controle (-) - tonsila humana - omissão dos anticorpos primários; **c** (NIC II) e **d** (NIC I): células CD25⁺FOXP3⁺ em grande e em pequena quantidade, respectivamente. Todas as figuras (400X). Setas pretas indicam células CD25⁺FOXP3⁺.

5.3.2 Coexpressão dos marcadores CD4/TGF- β

Foram analisadas 77 amostras quanto à coexpressão de CD4/TGF- β . Observa-se a relação entre os diferentes achados histopatológicos e a coexpressão dos marcadores na Figura 14.

Figura 14 - Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a intensidade de coexpressão de CD4/TGF β em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD4/TGF- β . **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. ($\chi^2 = 16.712$; GL = 3; $p = 0,0008$).

Na Tabela 5, observa-se que todas as amostras com carcinoma e 89,1% (41/46) daquelas com lesão de alto grau (HSIL) apresentaram grande quantidade (*high*) de células coexpressando CD4/TGF- β . A análise de contingência entre os achados histopatológicos e coexpressão de CD4/TGF- β obteve um resultado estatisticamente significativo ($\chi^2 = 16.712$; GL= 3; p= 0,0008).

O teste de Qui-quadrado, através da análise por partição individual, demonstrou significância estatística quanto à quantidade de células coexpressando CD4/TGF- β nas seguintes comparações: NILM vs CA, NILM vs HSIL, CA vs LSIL e HSIL vs LSIL (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a coexpressão de CD4/TGF- β em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS				
	NILM	LSIL	HSIL	CA
CD4/TGF-β				
Low (n=15)	3 (50%)	7 (50%)	5 (10,9%)	0 (0%)
High (n=62)	3 (50%)	7 (50%)	41(89,1%)	11 (100%)
Total	6 (100%)	14 (100%)	46 (100%)	11 (100%)

Nota: **Low**: pequena quantidade de células marcadas; **High**: grande quantidade de células marcadas para CD4/TGF- β . **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma ($\chi^2 = 16.712$; GL= 3; p= 0,0008)

NILM vs CA: $\chi^2 = 66.786$; GL= 1; p= 0,0098

NILM vs LSIL: não aplicável – valores iguais

CA vs LSIL: $\chi^2 = 76.389$; GL= 1; p= 0,0057

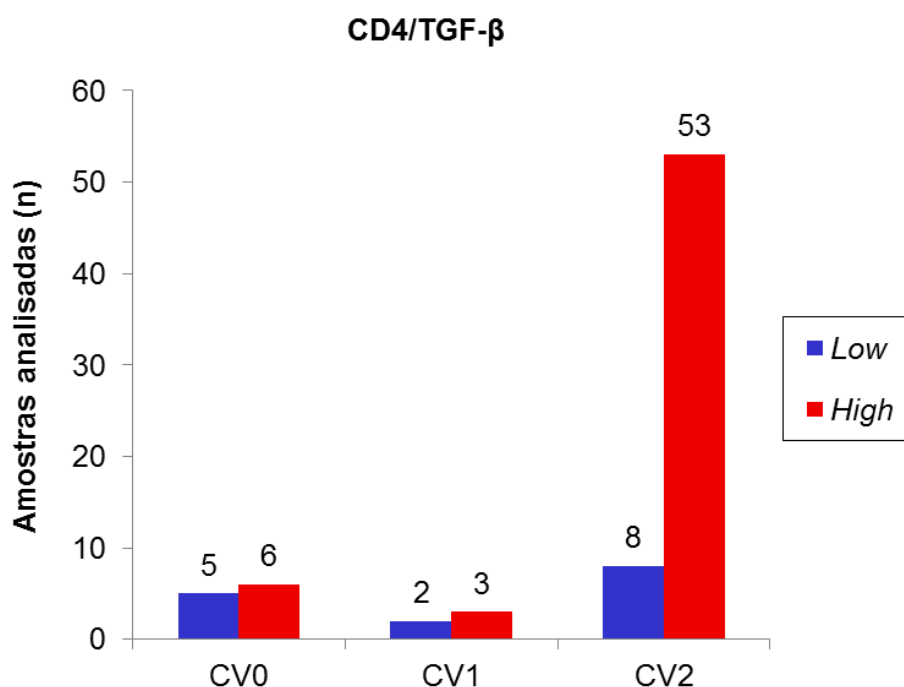
NILM vs HSIL: $\chi^2 = 62.431$; GL= 1; p= 0,0125

CA vs HSIL: $\chi^2 = 13.106$; GL= 1; p= 0,2523

HSIL vs LSIL: $\chi^2 = 102.717$; GL=1; p= 0,0014

Na Figura 15, observa-se a distribuição da carga viral segundo a coexpressão de CD4/TGF- β , ressaltando a correlação estatística ($\chi^2= 7,649$; GL= 2; $p= 0,022$) e predomínio (53/61; 86,8%) de grande quantidade (*high*) de células coexpressando CD4/TGF- β entre as amostras CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL) (Figura 15).

Figura 15 - Distribuição da carga viral segundo a coexpressão de CD4/TGF β em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD4/TGF- β . **CV - Carga Viral**: **CV0** (negativo para DNA-HPV); **CV1** (1050 a <10.000 cópias virais/mL); **CV2** (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL). ($\chi^2= 7,649$; GL= 2; $p= 0,022$).

Na Tabela 6, pode-se observar a distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD4/TGF- β e a carga viral. A maioria (62/77; 80,5%) das amostras apresentaram grande quantidade (*high*) de células coexpressando CD4/TGF- β , distribuídas predominantemente entre as amostras classificadas como HSIL (41/62; 66,1%), seguido daquelas classificadas como carcinoma (11/62; 17,7%).

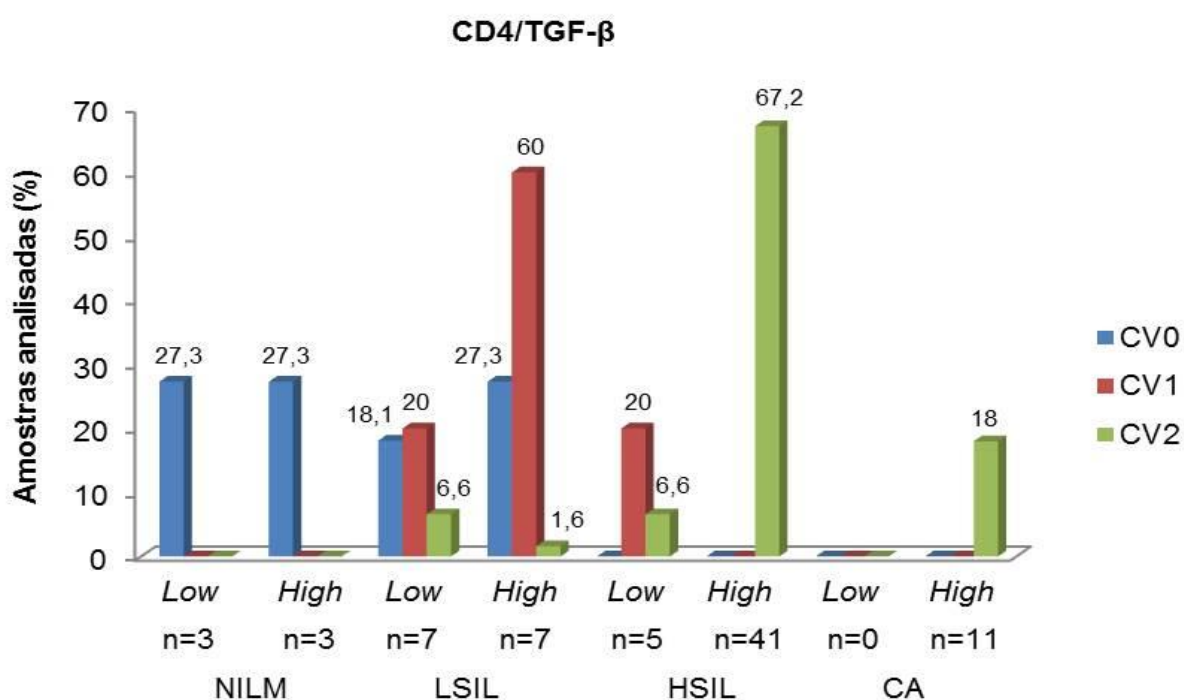
Tabela 6 - Distribuição dos achados histopatológicos segundo a coexpressão de CD4/TGF- β e carga viral em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).

	NILM		LSIL		HSIL		CA	
	CD4/TGF- β		CD4/TGF- β		CD4/TGF- β		CD4/TGF- β	
	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
CV0	3	3	2	3	0	0	0	0
CV1	0	0	1	3	1	0	0	0
CV2	0	0	4	1	4	41	0	11
Total	3	3	7	7	5	41	0	11

Nota: **Low:** pequena quantidade; **High:** grande quantidade de células imunomarcadas para CD4/TGF- β . **NILM:** negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL:** lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL:** lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA:** carcinoma **CV - Carga viral:** CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 ($\geq$ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 16, encontra-se a frequência da carga viral segundo a coexpressão de CD4/TGF- β e os achados histopatológicos. Observa-se o predomínio (52/61; 85,2%) de CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL), entre as amostras designadas como HSIL e CA que apresentaram intensa coexpressão de CD4/TGF- β .

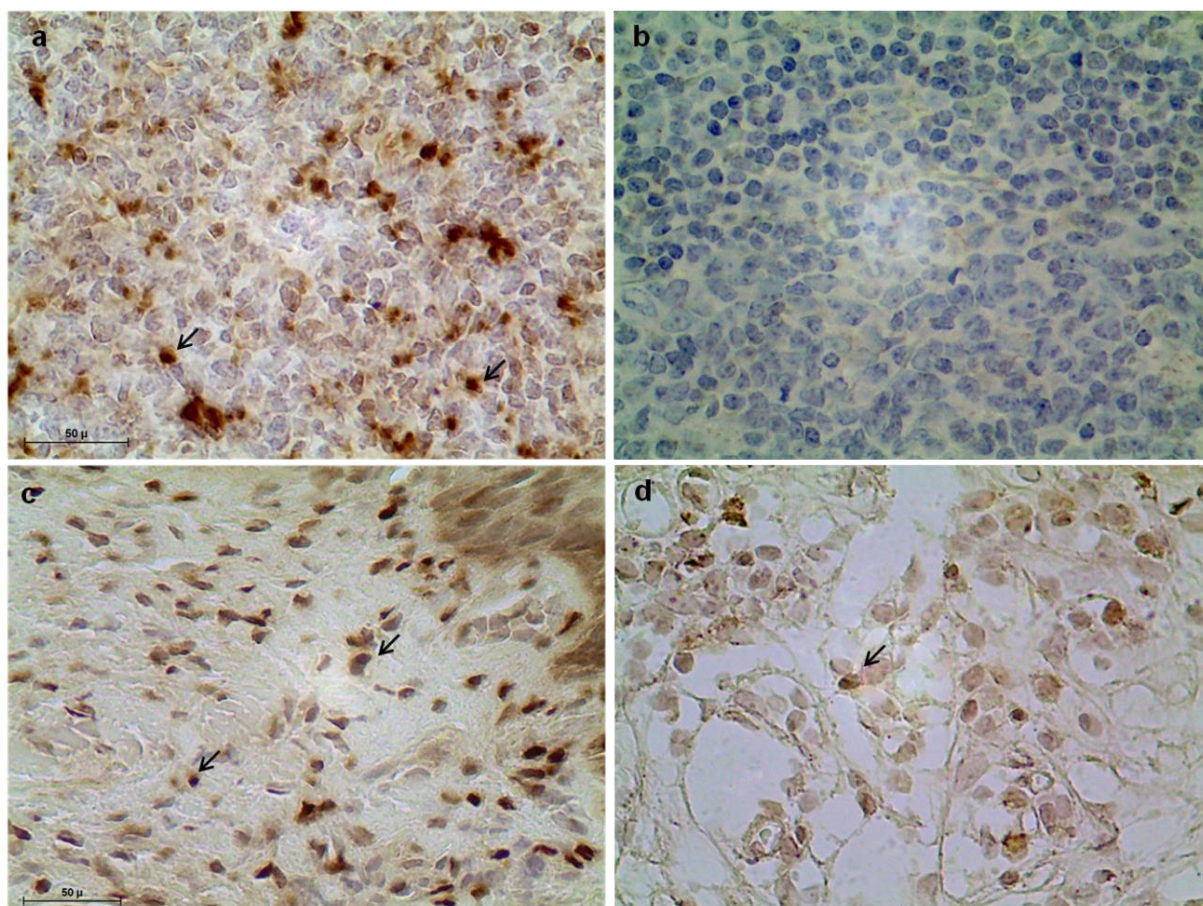
Figura 16 – Frequência da carga viral segundo a coexpressão de CD4/TGF- β e achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=77).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para CD4/TGF- β . **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 17, observa-se a coexpressão de CD4/TGF- β em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina.

Figura 17 - Coexpressão de CD4/TGF- β detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.

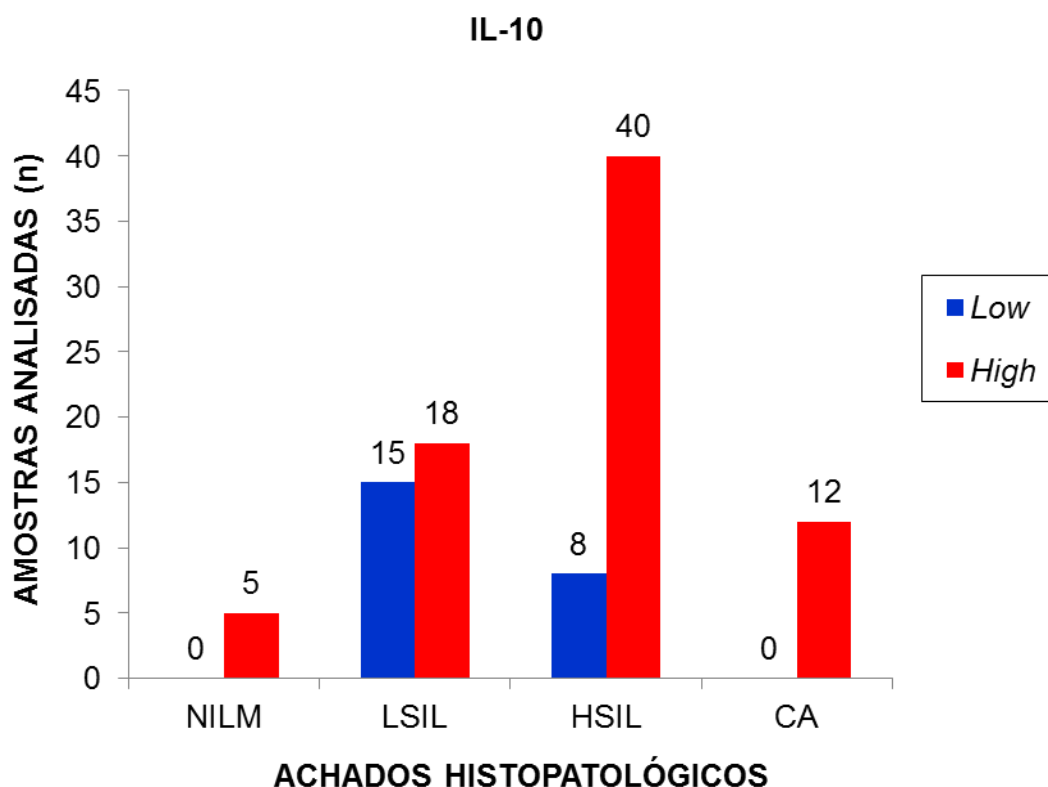


Nota: **a**: controle (+) - tonsila humana marcada com os anticorpos anti-CD4 e anti-TGF- β humanos; **b**: controle (-) - tonsila humana – omissão dos anticorpos primários; **c** (NIC II) e **d** (NIC II): células CD4⁺TGF β ⁺ em grande e em pequena quantidade, respectivamente. Todas as figuras (400X). Setas pretas indicam células CD4⁺TGF β ⁺.

5.3.3 Expressão de IL-10

Foram analisadas 98 amostras para a expressão de IL-10. A relação entre os achados histopatológicos e a expressão desta citocina encontra-se na Figura 18.

Figura 18 – Distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de IL-10 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade células imunomarcadas para IL-10. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. ($\chi^2 = 15,331$; GL= 3; p= 0,002).

Na Tabela 7, observa-se que todas as amostras com carcinoma e 83,3% (40/48) daquelas com lesão de alto grau (HSIL) apresentaram grande quantidade (*high*) de células expressando IL-10. A análise de contingência entre achados histopatológicos e a expressão de IL-10 mostrou diferença significativa ($\chi^2= 15,331$; GL= 3; $p= 0,002$). O teste de Qui-quadrado por partição individual, demonstrou diferença significativa quanto à quantidade de células expressando IL-10 entre as comparações amostrais CA vs LSIL, HSIL vs LSIL e NILM vs LSIL.

Tabela 7 – Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a expressão de IL-10 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS				
	NILM	LSIL	HSIL	CA
IL-10				
Low (n=23)	0 (0%)	15 (45,4%)	8 (16,7%)	0 (0%)
High (n=75)	5 (100%)	18 (54,6%)	40 (83,3%)	12 (100%)
Total	5 (100%)	33 (100%)	48 (100%)	12 (100%)

Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade células imunomarcadas para IL-10. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. ($\chi^2= 15,331$; GL= 3; $p= 0,002$).

NILM vs CA: não aplicável – 50% valores nulos

NILM vs HSIL: $\chi^2 = 0,9815$; GL= 1; $p= 0,3218$

NILM vs LSIL: $\chi^2 = 37,549$; GL=1; $p= 0,0527$

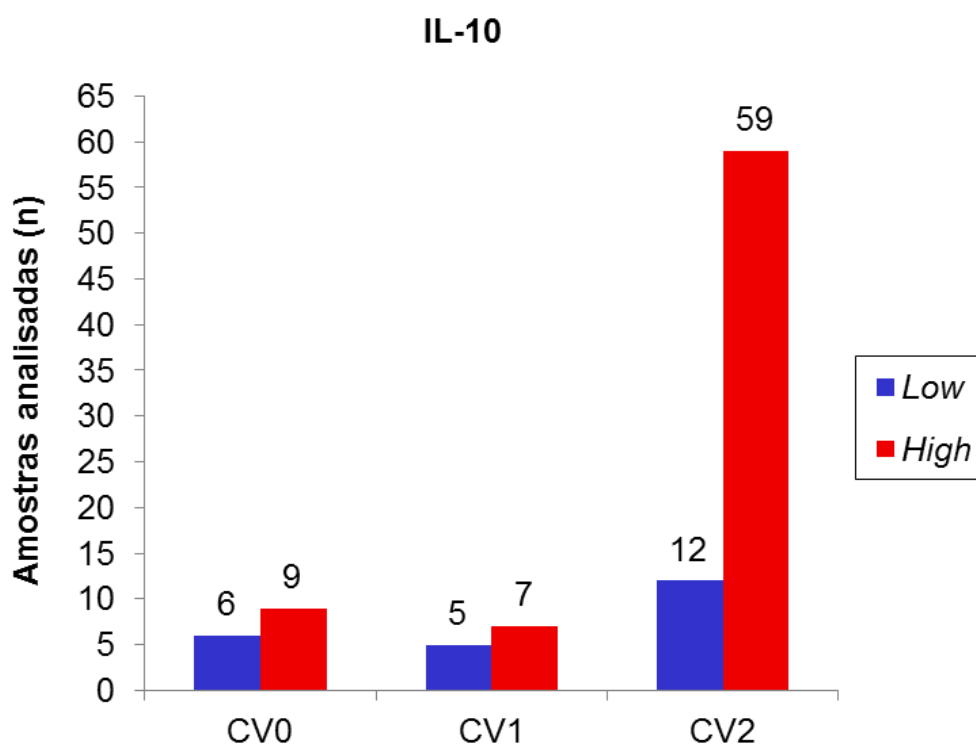
CA vs HSIL: $\chi^2 = 23,077$; GL= 1; $p= 0,1287$

CA vs LSIL: $\chi^2 = 81,818$; GL= 1; $p= 0,0042$

HSIL vs LSIL: $\chi^2 = 79,708$; GL=1; $p= 0,0048$

Na Figura 19, observa-se a distribuição da carga viral segundo a expressão de IL-10. Ressaltamos a correlação estatística ($\chi^2= 6,200$; GL= 2; $p= 0,045$), e o predomínio (59/71; 83,1%) de grande quantidade (*high*) de células expressando IL-10 entre as amostras CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Figura 19 - Distribuição da carga viral segundo a expressão de IL-10 em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para IL-10 **CV - Carga Viral**: **CV0** (negativo para DNA-HPV); **CV1** (1050 a <10.000 cópias virais/mL); **CV2** (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL). ($\chi^2= 6,200$; GL= 2; $p= 0,045$).

Na Tabela 8, pode-se observar a distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de IL-10 e carga viral. Observa-se que a maioria (75/98; 76,5%) das amostras apresentaram grande quantidade (*high*) de células expressando IL-10, distribuída predominantemente entre as amostras classificadas como HSIL (40/98; 53,3%).

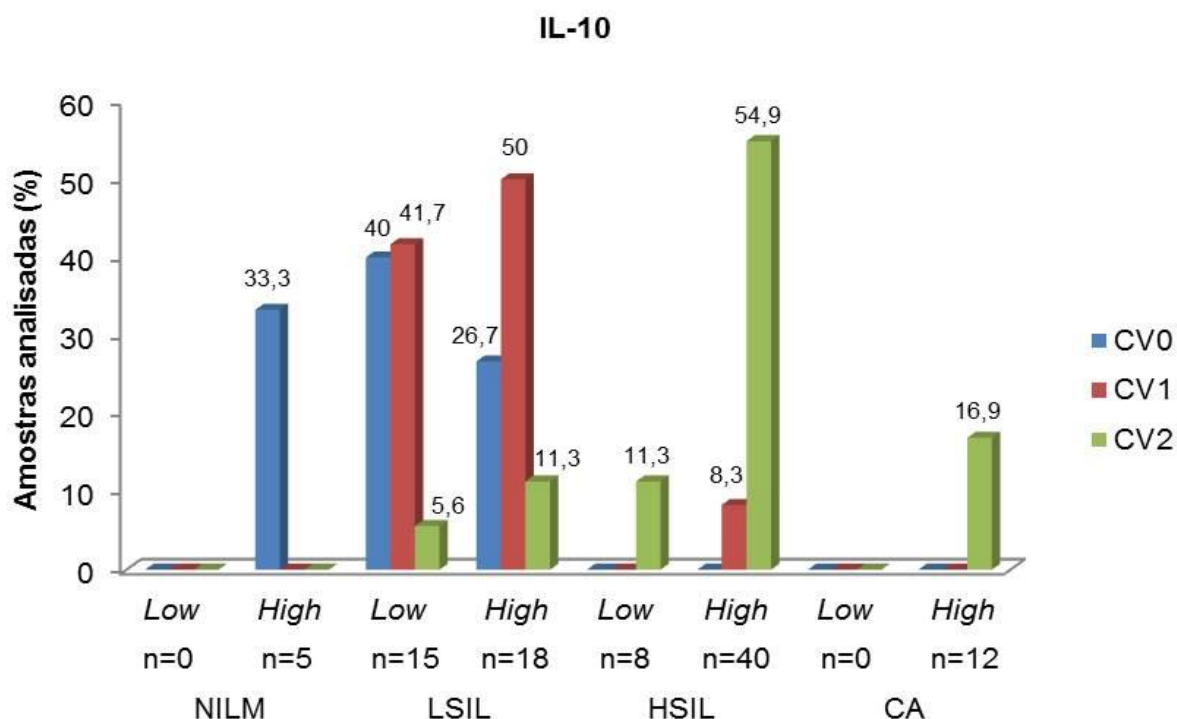
Tabela 8 - Distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de IL-10 e carga viral em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).

	NILM		LSIL		HSIL		CA	
	IL-10		IL-10		IL-10		IL-10	
	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
CV0	0	5	6	4	0	0	0	0
CV1	0	0	5	6	0	1	0	0
CV2	0	0	4	8	8	39	0	12
Total	0	5	15	18	8	40	0	12

Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para IL-10. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 ($\geq$ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 20, encontra-se a distribuição da carga viral segundo a expressão de IL-10 e os achados histopatológicos. Observa-se predomínio (51/71; 71,8%) de amostras classificadas como CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL) entre as amostras designadas como HSIL e CA com grande quantidade (*high*) de células expressando IL-10.

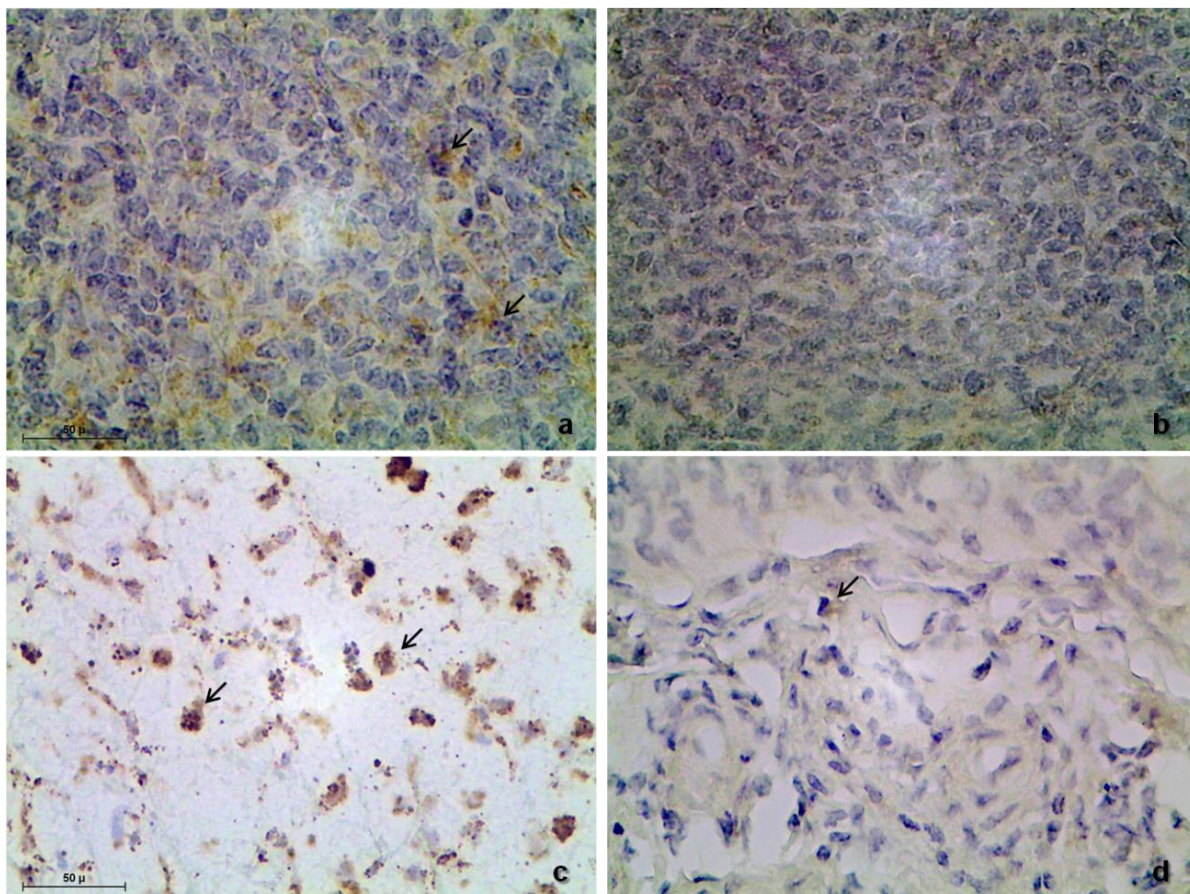
Figura 20 – Frequência da carga viral segundo a expressão de IL-10 e achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=98).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para IL-10. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 21, observa-se a expressão de IL-10 em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina.

Figura 21 - Expressão de IL-10 detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.

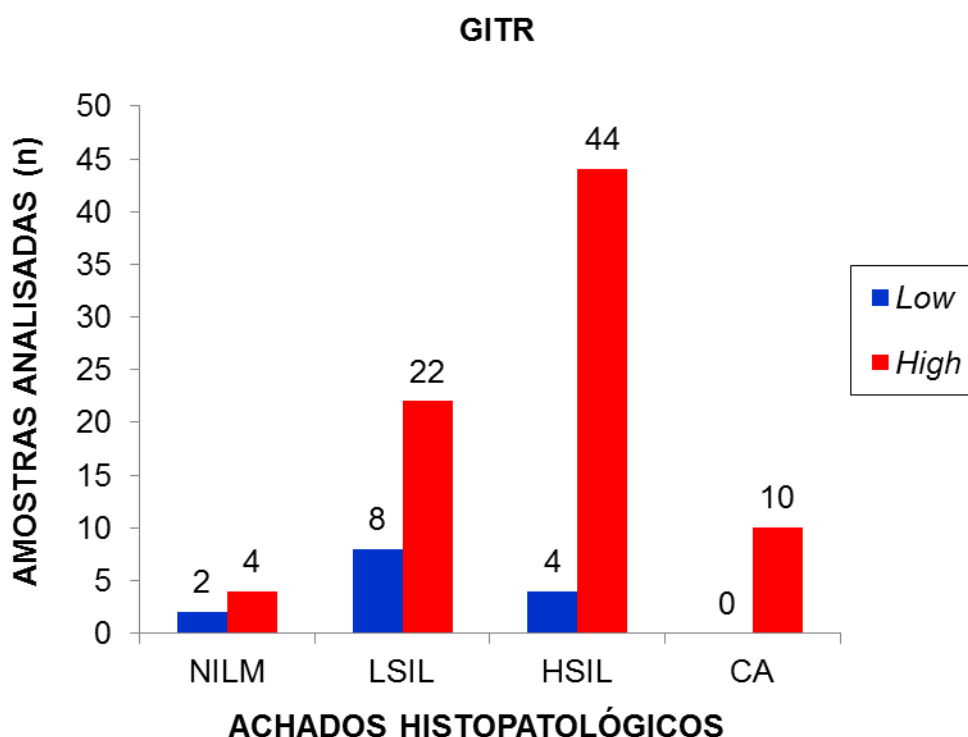


Nota: **a**: controle (+) - tonsila humana marcada com anticorpo anti-IL-10 humano; **b**: controle (-) - tonsila humana – omissão do anticorpo primário; **c** (NIC II) e **d** (CA): células IL-10⁺ em grande e em pequena quantidade, respectivamente. Todas as figuras (400x). Setas pretas indicam células IL-10⁺.

5.3.4 Expressão de GTR

Foram analisadas 94 amostras para a expressão de GTR. A relação entre os achados histopatológicos e a expressão deste marcador encontra-se na Figura 22.

Figura 22 – Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a expressão de GTR em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade células imunomarcadas para GTR. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma ($\chi^2= 8.270$; GL= 3; $p= 0,0408$).

Na Tabela 9, observa-se que todas as amostras com carcinoma e 91,7% daquelas com lesão de alto grau (HSIL) apresentaram grande quantidade (*high*) de células expressando GTR. A análise de contingência entre achados histopatológicos e a expressão de GTR foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 8.270$; GL= 3; p= 0,0408). As comparações pelo teste de Qui-quadrado, através da partição individual, mostraram diferenças significativas quanto à intensidade de expressão de GTR entre as seguintes associações: NILM vs CA e HSIL vs LSIL. Observou-se tendência estatística entre NILM vs HSIL e entre CA vs LSIL (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição dos achados histopatológicos de acordo com a expressão de GTR em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS				
	NILM	LSIL	HSIL	CA
GTR				
Low (n=14)	2 (33,3%)	8 (26,7%)	4 (8,3%)	0 (0%)
High (n=80)	4 (66,7%)	22 (73,3%)	44 (91,7%)	10 (100%)
Total	6 (100%)	30 (100%)	48 (100%)	10 (100%)

Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade células imunomarcadas para GTR. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma ($\chi^2 = 8.270$; GL= 3; p= 0,0408).

NILM vs CA: χ^2 : 38.095; GL=1; p=0,050

NILM vs LSIL: χ^2 : 0,1108 ; GL=1; p=0,7393

CA vs LSIL: χ^2 =33.333; GL= 1; p= 0,0679

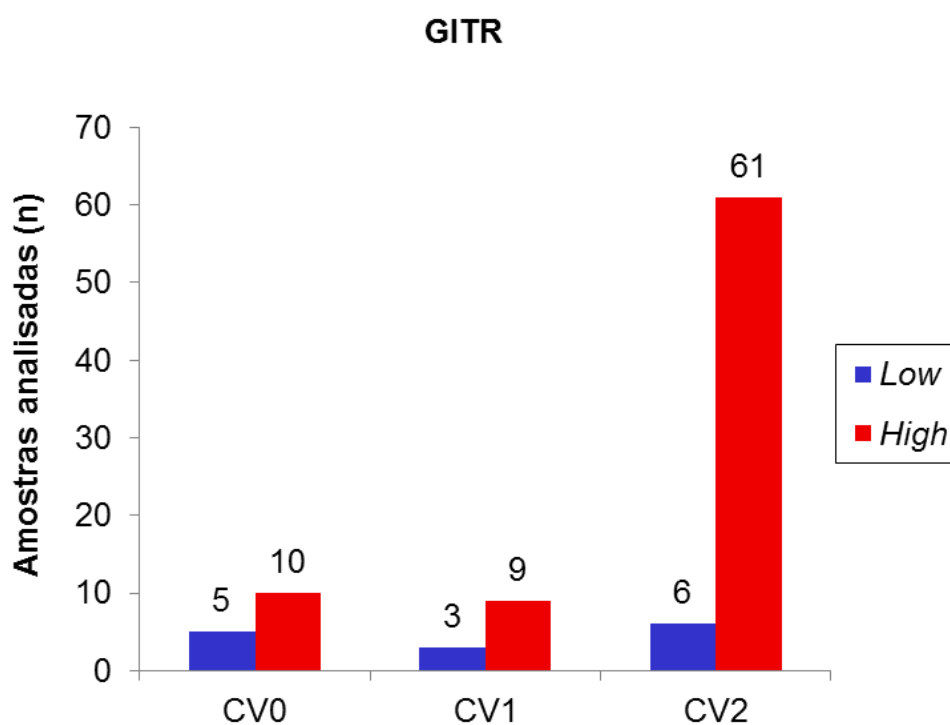
NILM vs HSIL: χ^2 =33.750; GL= 1; p= 0,0662

CA vs HSIL: χ^2 = 0,8951; GL= 1; p= 0,3441

HSIL vs LSIL: χ^2 =47.667; GL=1; p= 0,029

Na Figura 23, observa-se a distribuição da carga viral de acordo com a expressão de GTR. Houve correlação estatística ($\chi^2= 6,855$; GL= 2; $p= 0,032$) e observou-se grande quantidade (*high*) de células expressando GTR tanto entre as amostras HPV-DNA negativas, quanto entre as HPV-DNA positivas, com maior percentual de intensa marcação (61/67; 91%) nas amostras com carga viral CV2(≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Figura 23 - Distribuição da carga viral segundo a expressão de GTR em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para GTR **CV** - **Carga Viral**: **CV0** (negativo para DNA-HPV); **CV1** (1050 a <10.000 cópias virais/mL); **CV2** (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL) ($\chi^2= 6,855$; GL= 2; $p= 0,032$).

Na Tabela 10, pode-se observar a distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de GTR e carga viral. Observa-se que a maioria (80/94; 85,1%) das amostras apresentaram grande quantidade (*high*) de células expressando GTR, distribuída predominantemente entre as amostras classificadas como HSIL (44/94; 55%).

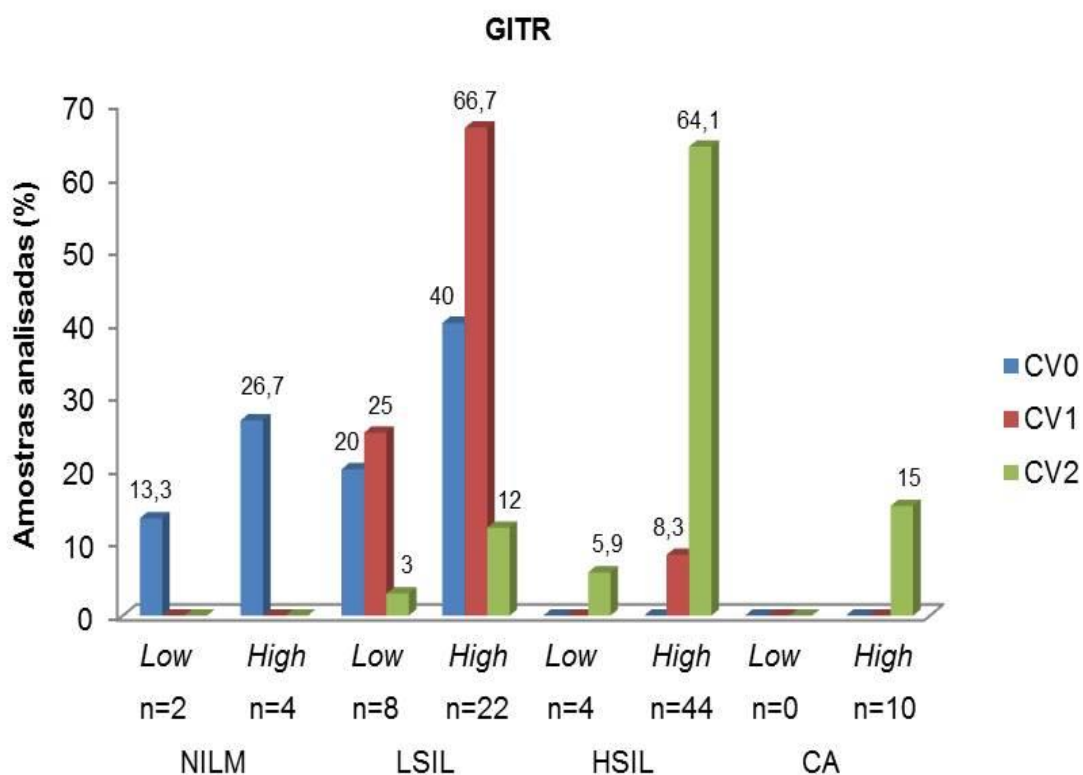
Tabela 10 - Distribuição dos achados histopatológicos segundo a expressão de GTR e carga viral em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).

	NILM		LSIL		HSIL		CA	
	GTR		GTR		GTR		GTR	
	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
CV0	2	4	3	6	0	0	0	0
CV1	0	0	3	8	0	1	0	0
CV2	0	0	2	8	4	43	0	10
Total	2	4	8	22	4	44	0	10

Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células marcadas para GTR. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 ($\geq$ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 24, encontra-se a frequência da carga viral segundo a expressão de GTR e achados histopatológicos. Observamos o predomínio (53/67; 79,1%) de amostras com carga viral CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL) distribuídas entre as amostras designadas como HSIL e CA e que apresentaram grande (*high*) quantidade de células expressando GTR.

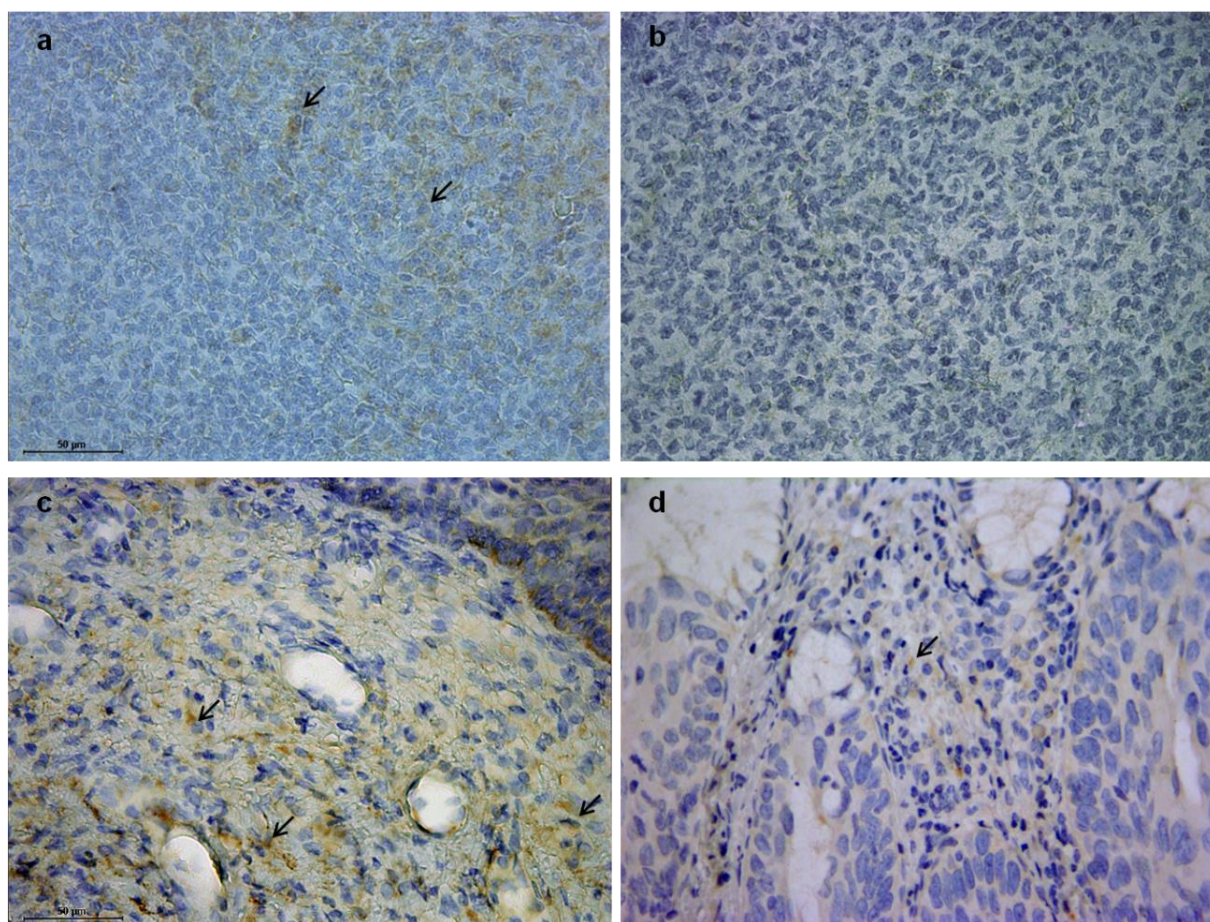
Figura 24 – Frequência da carga viral segundo a expressão de GTR e achados histopatológicos em amostras de biópsias de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012 (n=94).



Nota: **Low**: pequena quantidade; **High**: grande quantidade de células imunomarcadas para GTR. **NILM**: negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **LSIL**: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (NICI); **HSIL**: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (NICII e NICIII); **CA**: carcinoma. **CV - Carga viral**: CV0 (negativo para DNA-HPV), CV1 (1050 a <10.000 cópias virais/mL); CV2 (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL).

Na Figura 25, observa-se a expressão de GITR em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina.

Figura 25 - Expressão de GITR detectada por IHQ em tonsila humana e biópsia de cérvix uterina de pacientes atendidas no Centro de Prevenção ao Câncer – Campo Grande – MS, 2012.



Nota: **a**: controle (+) - tonsila humana marcada com anticorpo anti-GITR humano; **b**: controle (-) - tonsila humana – omissão do anticorpo primário; **c** (NIC III) e **d** (NILM): células GITR⁺ em grande e em pequena quantidade, respectivamente. Todas as figuras (400x). Setas pretas indicam células GITR⁺.

6 DISCUSSÃO

A infecção por tipos oncogênicos de HPV é a causa primária para o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais. Adicionalmente, o risco de progressão de lesões de baixo grau para lesões de alto grau e carcinoma parece estar aumentado em infecções que cursam com a persistência de elevadas cargas virais dos tipos de alto risco oncogênico, em especial HPV 16, 18, 45, 33, 31, 58 e 35 (FLORES *et al.*, 2006; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; LI *et al.*, 2011; de SANJOSÉ *et al.*, 2010). Os altos níveis virais relacionam-se com o aumento da integração do genoma viral ao do hospedeiro, elevando, portanto, o risco de transformação maligna. O HPV 16 tem se destacado em termos de prevalência e de associação positiva ao risco aumentado de promover o desenvolvimento de cânceres invasivos, quando presente em elevados níveis (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; MOBERG *et al.*, 2005).

O presente estudo demonstrou que o elevado número de cópias virais de diferentes tipos de HPV está associado à maior severidade das lesões, dada a diferença significativa encontrada na relação entre os achados histopatológicos e a carga viral, com predomínio de elevados níveis de cópias virais (CV2) em todas as amostras com carcinoma e em 97,9% daquelas designadas HSIL. Esses resultados são condizentes com a prerrogativa de que a persistência viral em elevados níveis é causa necessária para geração de alterações neoplásicas (CUZICK *et al.*, 2003; DALSTEIN *et al.*, 2003; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Dentre os diversos fatores que contribuem para a persistência viral, têm se mostrado relevante a presença de células T regulatórias (Treg) encontradas nos indivíduos infectados pelo HPV, particularmente no microambiente da infecção (ADURTHI *et al.*, 2008; MOLLING *et al.*, 2007; VAN DER BURG *et al.*, 2007; VISSER *et al.*, 2007). Evidências mostram que a detecção dessas células acontece já nas fases iniciais do desenvolvimento neoplásico e que frequências aumentadas de células Treg em estágios precoces, contribuem para a falha da eliminação viral, impedindo a geração de células efetoras contra o vírus, e ainda limitando ou bloqueando a função dessas, permitindo, dessa forma, a progressão das lesões

neoplásicas. North e Bursuker (1984) observaram que o desenvolvimento das células Treg capazes de inibir a resposta ao câncer precede a progressão tumoral, demonstrando o efeito regulador negativo dessas células sobre a geração de células efetoras. Tem sido demonstrado, ainda, que a depleção de células TCD25⁺ *in vitro* aumenta as respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ vírus-específicas, inclusive contra as proteínas E6 e E7 do HPV16 em pacientes com câncer cervical, o que também contribui para a premissa de que a resposta ao HPV existe, sendo, porém, suprimida pelas células T regulatórias (AANDAHL *et al.*, 2004; VISSER *et al.*, 2007). Observa-se também que as células Treg contribuem para que as células neoplásicas geradas escapem da resposta imune (JAYSHREE *et al.*, 2009).

Observa-se no presente estudo que elevados níveis de marcadores da população de células Treg e suas citocinas supressoras estão associados significativamente com lesões cervicais de alto grau/carcinoma e também aos altos níveis de cópias virais, reforçando evidências anteriores que mostram a presença dessa relação, contribuindo com apontamentos prévios que sugerem que as células T regulatórias podem configurar marcadores potenciais de persistência da doença cervical (ADURTHI *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2008; MOLLING *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2009; VISSER *et al.*, 2007). Corroborando os achados anteriores, bem como, os do presente estudo, Kojima e colaboradores (2013), em estudo longitudinal recente, mostraram que a prevalência de células Treg FOXP3⁺ residentes em lesões precursoras do câncer cervical correlaciona-se inversamente com a regressão espontânea das lesões, independentemente do subtipo de HPV, demonstrando que as células Treg podem ser responsáveis pela persistência viral e progressão da lesão e ainda enfatizando a utilização dessas células como biomarcadores preditivos de progressão neoplásica cervical.

Observa-se que, quando comparados ao câncer colorretal, ao melanoma de pele e, ainda, ao carcinoma pulmonar, o câncer cervical e suas lesões precursoras HPV-induzidas apresentam número aumentado de células T regulatórias (LODDENKEMPER *et al.*, 2009; VISSER *et al.*, 2007). A análise longitudinal da frequência de células Treg em sangue periférico de pacientes com câncer cervical mostrou um modesto declínio na quantidade dessas células após excisão cirúrgica da lesão tumoral ou quimioterapia, demonstrando que outros fatores, além das próprias células neoplásicas, estão associados com os elevados níveis de células

Treg (VISSER *et al.*, 2007). Nesse sentido, a infecção viral tem sido considerada como um fator determinante para o aumento de células Treg, e a persistência viral de forma latente em áreas adjacentes ao do tumor pode justificar a sustentação de níveis elevados de Treg no microambiente tecidual (CAO *et al.*, 2008; IELLEM, *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2005; ROUSE; SARANGI; SUVAS, 2006). Considerando que outros fatores podem influenciar nos níveis de células Treg cervicais e diante das evidências que mostram a relação de fatores diversos com o desenvolvimento de lesões cervicais, Kojima e colaboradores (2013) resolveram avaliar a associação da frequência de Treg cervical com fase menstrual, hábito de tabagismo, genótipo de HPV e curso da lesão (regressão/progressão). Os resultados obtidos não mostraram significância estatística, indicando que as células Treg não são influenciadas por nenhum dos fatores relacionados, o que reforça a hipótese de que a persistência viral desempenha importante papel na manutenção dos elevados níveis de células Treg na infecção por HPV.

No presente estudo, a idade média inferior encontrada nas pacientes com lesões neoplásicas de baixo e alto grau (LSIL: 32,4 anos; HSIL: 35,54 anos) quando comparada à idade média daquelas sem lesão e HPV-negativas (NILM: 49,66 anos), em associação à diferença significativa encontrada quanto à idade média entre os achados histopatológicos NILM vs LSIL/HSIL ($p=0,003$; $p=0,013$, respectivamente), sugere que a paciente adquire a infecção precocemente, reforçando os achados da literatura que apontam o pico de prevalência da infecção na faixa etária de 18 a 34 anos, caracterizando, portanto, a idade como um importante fator de risco para infecção, e que, quando associado com a falha da eliminação viral de tipos oncogênicos, resulta em progressão das lesões com detecção de anormalidades histopatológicas cervicais severas mais precocemente. Os resultados da presente análise estão de acordo com as evidências que mostram infecção de mulheres cada vez mais jovens, as quais já podem apresentar lesões cervicais de alto grau em torno de 35 anos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; MOSCICKI *et al.*, 2000; de SANJOSÉ, 2007; TARKOWSKI *et al.*, 2004; VILLA, 1998; VISSER *et al.*, 2007).

A idade média superior encontrada nas pacientes com carcinoma (44,75 anos) quando comparada à das demais categorias histopatológicas, em associação à diferença significativa detectada quanto à idade média dessas pacientes e

daquelas com LSIL/HSIL, pode ser justificada pelo fato de que as alterações neoplásicas acontecem progressivamente, demandando maior tempo para a geração de alterações malignas transformantes invasivas (VISSER *et al.*, 2007; YLITALO *et al.*, 2000a).

Em relação aos resultados obtidos de detecção do HPV, níveis de carga viral e associação desses com os achados histopatológicos no presente estudo, sugere-se que a presença de LSIL sem detecção do HPV-DNA em 33,3% das amostras, assim como os baixos níveis de cópias virais encontrados em outros 33,3% dessas lesões de baixo grau possam estar associados a uma resposta celular aguda a infecções transitórias do HPV, onde mais de 90% dessas regride espontaneamente (KOSHIOL *et al.*, 2008). Para os casos LSIL em que não houve detecção viral, pode-se também sugerir a possibilidade de resultados HPV falso negativos, como consequência de um número extremamente reduzido de partículas virais ou ainda níveis flutuantes de cópias virais, embora a metodologia empregada para detecção apresente elevada sensibilidade (WHEELER *et al.*, 1996).

Deve-se considerar também, que nesses casos com lesões de baixo grau HPV-negativas, as alterações histopatológicas possam ter sido geradas por outros fatores, como hormonais, genéticos e ainda pela presença de patógenos, dentre eles, a *Chlamydia trachomatis*, a qual vem sendo considerada como fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical, com capacidade, inclusive de aumentar a suscetibilidade de infecção ao HPV, assim como, a persistência viral, devido a sua habilidade de causar microabrasões, alterar as características das células epiteliais e desviar a resposta imune para o perfil Th2 (COOPER; EVANS; MOUNT, 2003; MOSCICKI *et al.*, 2004; SAMOFF *et al.*, 2005). Quanto aos casos com lesões de baixo grau que apresentaram elevados níveis de carga viral (33,3%), ressalta-se que essas pacientes podem estar predispostas ao desenvolvimento de lesões mais severas, com maior risco de desenvolvimento de carcinoma invasivo quando da infecção por tipos de HPV oncogênicos (FLORES *et al.*, 2006; KJAER, *et al.*, 2002; MOBERG *et al.*, 2005).

Salienta-se que a detecção do HPV 16 em 48,8% das amostras analisadas, seguido do HPV 18 em 39,3% delas, condiz com estudos epidemiológicos anteriores de abrangência mundial que apontam a maior prevalência de infecção atribuída a esses dois tipos virais (CLIFFORD *et al.*, 2003; INTERNATIONAL AGENCY FOR

RESEARCH ON CANCER, 2012); e, ainda, com estudo realizado por Tozetti e colaboradores (2006a), também na cidade de Campo Grande – MS, que detectou o predomínio desses mesmos tipos virais. No entanto, estudo mais recente, de Almeida (2013), realizado nesta mesma cidade, não encontrou o HPV 18 entre os mais prevalentes. Tal divergência pode ser justificada por características populacionais distintas entre os estudos, dado que tanto o presente estudo, quanto o de Tozetti *et al.* (2006a) incluíram amostras provenientes de pacientes com fortes suspeitas de serem portadoras de lesões cervicais, enquanto que o estudo de Almeida (2013) incluiu mulheres jovens sem indicação clínica de lesão cervical.

A presença de infecção simples em 82,1% das amostras HPV-positivas e de infecção múltipla em 17,9% delas está de acordo com dados obtidos em estudos epidemiológicos, como o realizado recentemente em Campo Grande por Almeida (2013), que detectou frequência de 20,4% de infecções múltiplas em pacientes sem suspeita de infecção; e, ainda outro, realizado na região Norte da Itália, que apontou prevalência de 87% de infecção simples e 13% de infecção múltipla em pacientes com carcinoma e metástases associadas (CIOTTI *et al.*, 2006). Fortalecendo os resultados obtidos em cada estudo individualmente, observa-se que a revisão sistemática de diversos estudos realizada pela IARC (2007) encontrou uma prevalência em torno de 25% para infecções múltiplas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Percentuais superiores de infecções múltiplas podem ser encontrados em estudos envolvendo pacientes com alterações citológicas, como visto em estudo realizado na Itália, que detectou 49,7% de positividade para dois ou mais tipos de HPV, demonstrando, porém, uma frequência significativamente menor de infecção múltipla nas amostras com lesão de alto grau e carcinoma, o que sugere que a infecção por múltiplos tipos de HPV não necessariamente se caracteriza como um melhor fator preditivo de carcinoma quando comparada à infecção simples (GARGIULO *et al.*, 2007). Em contrapartida, o estudo de Herrero e colaboradores (2005), envolvendo também mulheres com lesões neoplásicas e pré-neoplásicas, detectou que as infecções múltiplas estavam associadas ao maior risco de desenvolvimento de lesões e progressão para o câncer, quando comparadas às infecções simples, exceto nos casos com infecções por HPV 16.

Tem sido relatada também prevalência aumentada de infecções múltiplas, com maior risco de persistência viral em indivíduos portadores de deficiências na resposta imune (BANURA *et al.*, 2011; CLIFFORD *et al.*, 2006). Embora se observe imunidade cruzada mediada por anticorpos a diferentes tipos de HPV, a aquisição de infecções múltiplas pode ainda ser justificada pela baixa avidéz de interação desses anticorpos com os antígenos virais, aumentando a susceptibilidade de aquisição concomitante ou sequencial de outros tipos virais e ainda a falha na eliminação viral (BACHMANN *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 2000; WANG; HILDESHEIM, 2003). A sugestão da possibilidade de alguns tipos de HPV de alto risco exercerem vantagem competitiva sobre outros tipos também tem sido relatada (MERIKUKKA *et al.*, 2011).

A constatação do predomínio dos tipos virais de alto risco oncogênico (HPV 16, 18, 33, 45) nas amostras com infecções múltiplas, bem como do maior percentual atribuído ao HPV 16 (10/15 infecções múltiplas; 66,6%) entre essas infecções, está de acordo com achados anteriores que apontam a maior prevalência de HPV de alto risco em infecções múltiplas, o que pode configurar importante fator de risco para o desenvolvimento de cânceres cervicais, uma vez que, a associação de dois ou mais tipos de HPV, incluindo pelo menos um tipo de HPV de alto risco, é capaz de conferir condições favoráveis à transformação maligna, como o elevado risco de persistência viral, altos níveis de cópias virais e ainda um somatório de efeitos inibitórios sobre a resposta imune exercidos pelos diferentes tipos de vírus (DALSTEIN *et al.*, 2003; SAMOFF *et al.*, 2005).

As infecções múltiplas por HPV podem ter significados diferentes dependendo da faixa etária em que são detectadas. Observa-se que em mulheres mais jovens, adolescentes ou no início da fase adulta, a presença de infecções múltiplas pode refletir um estado ainda imunologicamente *naïve* para o HPV, resultando na maioria dos casos em infecções transitórias que resultam na depuração viral mediada por imunidade tipo-específica ou ainda proteção cruzada entre os tipos. Já as infecções múltiplas detectadas em mulheres de idade adulta, com 30 anos ou mais, podem caracterizar imunidade estabelecida a pelo menos um tipo viral identificado ou ainda insuficiente aos tipos virais detectados. Nestes casos, a distinção entre infecções transitórias ou persistentes fica dificultada, uma vez que alguns parâmetros não são conhecidos como, o período de aquisição dos tipos virais, a possibilidade de

reativação de infecções latentes, dentre outros (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; THOMAS *et al.*, 2000).

A associação com os achados histopatológicos pode ajudar a definir quadros de persistência viral, uma vez que lesões de alto grau (NIC II e NICIII) estão forte e consistentemente associadas a infecções persistentes (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012; KOSHIOL *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2000). No presente estudo, pode-se observar que dentre as infecções múltiplas predominaram amostras com lesões de alto grau (66,7%; $p < 0,05$) e considerando que a idade média dessas pacientes portadoras de HSIL foi de aproximadamente 35 anos, sugere-se que as mesmas foram infectadas precocemente, como apontado também por outros estudos (DALSTEIN *et al.*, 2003; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; SAMOFF *et al.*, 2005).

O risco de desenvolvimento de neoplasias tem sido associado à presença de células T regulatórias. O aumento dessas células, tanto no sangue periférico como no microambiente lesado, tem sido reportado em diversos tipos de câncer, como pulmonar, ovariano, hepático, gástrico, de mama e linfomas, sendo em alguns casos correlacionado com pior prognóstico (CURIEL *et al.*, 2004; deLEEuw *et al.*, 2012; LIYANAGE *et al.*, 2002; ORMANDY *et al.*, 2005; WOO *et al.*, 2001). Evidências apontam o forte envolvimento de elevadas frequências de células Treg em infecções cervicais persistentes por HPV, as quais são capazes de induzir regulação negativa da resposta imune às lesões HPV-induzidas, permitindo assim a progressão neoplásica (KOBAYASHI *et al.*, 2008; SCOTT *et al.*, 2009; VISSER *et al.*, 2007).

Já está bem estabelecido que uma resposta imune insuficiente é responsável pela persistência do HPV, resultando na carcinogênese de células cervicais normais. Nesse sentido, vários estudos demonstram aumento de células Treg FOXP3⁺ em pacientes com câncer cervical, comparado com indivíduos saudáveis, apontando que essas células contribuem para a tolerância imunológica ao câncer e ao HPV, enfatizando, portanto, a importância dessas células como possíveis alvos terapêuticos para a prevenção do desenvolvimento de lesões neoplásicas invasivas de etiologia viral (ADURTHI *et al.*, 2008; PIERSMA *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2011; VISSER *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011).

As células neoplásicas utilizam de múltiplas estratégias para evadir da resposta imunológica, inclusive um sistema de cooperação mútua com as células

Treg, favorecendo, portanto, a invasão e metástase do câncer cervical. Estudos que avaliam a carcinogênese HPV-induzida mostram, por exemplo, que as células tumorais podem recrutar mais células Treg para o microambiente tumoral e ainda estimular a expansão de Treg naturais e a diferenciação de Treg induzidas, entretanto os mecanismos envolvidos ainda não estão bem elucidados (HOU; MA; CUI, 2013). Evidências mostram que tais mecanismos possam envolver a expressão aumentada da enzima supressora IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) por células neoplásicas previamente estimuladas por células Treg locais (NAKAMURA *et al.*, 2007). Observa-se também, que os tumores conseguem estimular a conversão de células T CD4⁺ em células Treg tumor-específicas, secretando, por exemplo, TGF- β , e dessa forma, impedindo a geração e o estabelecimento da função de células efectoras (RAO; PETRONE; PONATH, 2005; VALZASINA *et al.*, 2006). Outro efeito de cooperação celular para a supressão da resposta é observado quando da elevada expressão da molécula PD-1 (programmed cell death-1) por células neoplásicas, capaz de gerar mais células iTreg e ainda diminuir a atividade de células T efectoras, o que tem sido considerado como um prognóstico desfavorável em diversos tipos de cânceres (FRANCISCO; SAGE; SHARPE, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que a regulação negativa da resposta imune ao HPV e às células neoplásicas é acompanhada por alterações do infiltrado celular presente no microambiente cervical infectado. Observa-se que, enquanto a cérvix uterina sem alterações histopatológicas é histologicamente composta por diversas células efectoras da resposta imune, tais como, linfócitos CD4⁺, CD8⁺, linfócitos B, células dendríticas, macrófagos, linfócitos CD4⁺ intraepiteliais da ectocérvice e zona de transformação, e pequena quantidade de células Treg no estroma logo abaixo da membrana basal; aquela que apresenta lesões de baixo grau (LSIL) é composta principalmente linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e frequências variadas de células Treg, que uma vez aumentadas são capazes de modular as respostas efectoras, induzindo a tolerância, e portanto, contribuindo para persistência viral (ADURTHI *et al.*, 2008; JAYSHREE *et al.*, 2009). Já a cérvix apresentando lesões de alto grau (HSIL) é histologicamente composta por um aumento de macrófagos intralesionais supressores, células de Langerhans em reduzido número e com função comprometida, células T CD4⁺ logo abaixo da membrana basal e ainda T CD8⁺ distribuídas no epitélio displásico, sendo as duas últimas

possivelmente anérgicas a estímulos antigênicos (KOBAYASHI *et al.*, 2000; MOTA *et al.*, 1999).

As células Treg encontram-se em quantidades elevadas tanto no epitélio quanto no estroma, exercendo efeito supressivo dominante sobre diferentes tipos celulares (NAKAMURA *et al.*, 2007). Observa-se também, nas lesões de alto grau (HSIL), um predomínio de citocinas regulatórias, dentre elas, IL-10, TGF- β e IL-4 (ADURTHI *et al.*, 2008; SHEU *et al.*, 2001). Finalmente, nos cânceres invasivos, um perfil de imunotolerância já se encontra estabelecido, composto por células dendríticas tolerogênicas, células NKT invariantes, células T citotóxicas anérgicas, macrófagos imaturos IDO⁺ e elevadas densidades de células Treg (KOBAYASHI *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2007; SHEU *et al.*, 2001).

A possível relação positiva entre a densidade de células T regulatórias e o grau de imunotolerância no microambiente infectado tem instigado os pesquisadores a apontarem o forte envolvimento das células T regulatórias locais no desenvolvimento do câncer cervical de etiologia viral. Nesse sentido, destaca-se a importância do presente estudo, uma vez que permitiu identificar os principais marcadores das células Treg e citocinas no estroma cervical, verificando ainda, a associação desses componentes com os níveis de carga viral e os achados histopatológicos. A importância dessa relação no sítio da infecção foi enfatizada em vários estudos, como aqueles que mostraram que as mensurações em sangue periférico são subestimadas (CASTLE *et al.*, 2002; KOJIMA *et al.*, 2013; VISSER *et al.*, 2007) e ainda, outros que identificaram expressão aumentada de TGF- β e de IL-10 somente em células Treg presentes no microambiente da lesão, justificando o achado com base na natureza do ciclo replicativo do HPV, o qual desencadeia somente uma inflamação limitada ao sítio da infecção, não influenciando, portanto, as demais células Treg presentes na circulação (CASTLE *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Scott e colaboradores (2009) ao detectaram elevada expressão de FOXP3 na cérvix uterina, fornecendo evidências do aumento de células Treg no microambiente tecidual de pacientes com alterações histopatológicas infectadas pelo HPV, enfatizaram que para uma melhor caracterização local dessas células fossem utilizados múltiplos marcadores. Ressalta-se, então, que a decisão pela utilização da técnica imunohistoquímica de dupla marcação no presente estudo foi tomada com o

objetivo de se obter resultados mais fidedignos quanto à caracterização das células T regulatórias locais, além de permitir detectar, no microambiente tecidual, as células responsáveis pela produção dos componentes supressores da resposta, tais como FOXP3, TGF- β e IL-10, enquanto que através de outras técnicas, como aquelas que avaliam a expressão de mRNA de produtos celulares apenas sugerem a presença das mesmas no microambiente.

Enfatiza-se ainda, que a escolha dos marcadores e das citocinas pesquisadas no presente estudo foi baseada em uma revisão detalhada da literatura, no sentido de otimizar a detecção das células T regulatórias. Embora não tenha sido objetivo deste estudo validar os biomarcadores de Treg nas lesões de alto grau, os resultados obtidos sugerem que a presença desses marcadores pode refletir a presença de Treg, contribuindo para o estabelecimento de um possível prognóstico para as pacientes infectadas quanto à progressão da lesão. Salienta-se também, que embora este estudo não forneça dados quantitativos das células detectadas, dado que a quantificação foi apenas subjetiva, certamente, a análise dos resultados e as associações significativas encontradas poderão contribuir para o conhecimento ainda incipiente da participação das células Treg no microambiente cervical HPV-infectado.

Observa-se também que a utilização de diversas metodologias para a detecção dessas células tais como, a RQ-PCR, a RT-PCR, a imunohistoquímica, a imunofluorescência, a citometria de fluxo, não compromete a interpretação mais consensual de que níveis aumentados de células Treg estão fortemente associados com a progressão maligna da doença cervical de etiologia viral. Os resultados conflitantes podem ser justificados, na grande maioria das vezes, por diferenças na natureza da amostra, no tamanho amostral, no tipo de estudo, nos marcadores pesquisados, nas características populacionais estudadas e ainda inerentes aos tipos virais encontrados nas diversas regiões geográficas (CASTLE *et al.*, 2002; BORGES, 2008)

As diferenças quanto ao número amostral entre as marcações histológicas realizadas no presente estudo são justificadas pela escassez de material das amostras obtidas. Ressalta-se que foram realizadas as marcações em todas as amostras cujas categorias histológicas apresentavam número amostral reduzido, a fim de minimizar possíveis vieses de interpretação. A conduta de se priorizar a

realização das diferentes marcações para os casos com lesões de alto grau, carcinoma e sem anormalidades histopatológicas foi baseada em estratégias metodológicas utilizadas por outros autores que, embora utilizassem técnicas diversas para a detecção de células Treg e citocinas, optaram por priorizar também a análise dessas três categorias histológicas. Possivelmente, tal escolha tenha se apoiado no fato de que tais células estão fortemente associadas a lesões cervicais mais severas e de que existe uma similaridade quanto ao perfil de resposta entre tecidos normais e aqueles apresentando lesões de baixo grau, o que fez que com que alguns deles nem incluíssem as amostras LSIL (ADURTHI *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008; MOLLING *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2009). Enfatiza-se que mesmo diante da necessidade de um procedimento cirúrgico para a obtenção das amostras e do caráter transversal do presente estudo, conseguiu-se, ainda sim, obter material necessário para a realização das associações previstas, encontrando inclusive relações estatisticamente significantes.

Salienta-se também, que o caráter transversal do presente estudo não permitiu detectar eventos importantes, como a depuração, regressão ou ainda persistência da infecção. Nesse sentido, estudos longitudinais mostram-se mais eficientes, permitindo tirar algumas conclusões sobre a carcinogênese cervical induzida pela persistência viral e o possível papel das células Treg nesse dinâmico processo. Sabe-se que a história completa da exposição da mulher ao HPV raramente é detectada, mesmo nos estudos de caráter longitudinal, dificultando, portanto, a interpretação de lesões neoplásicas intraepiteliais presentes em pacientes consideradas negativas para a pesquisa do HPV, como observado no presente estudo.

Embora o presente estudo não tenha permitido a avaliação da densidade das células Treg no decurso da progressão neoplásica, verifica-se um aumento gradual de células CD25⁺FOXP3⁺ entre os diferentes achados histopatológicos (NILM: 20%; LSIL: 33,3%; HSIL: 65,2% e CA: 91,6%), condizente com os estudos que revelam que essas células começam a infiltrar o microambiente nas fases iniciais das alterações neoplásicas e que o acúmulo dessas células continua com a progressão da doença (CAO *et al.*, 2008; SAKAGUCHI *et al.*, 2006). Em concordância com esses achados, um estudo em camundongos, que avaliou a dinâmica da resposta imune, revelou que células T regulatórias, tais como, as nTreg pré-existent e

iTreg, aparecem ainda nas fases iniciais do desenvolvimento do adenocarcinoma de ducto pancreático (CLARK *et al.*, 2007).

Observa-se que os elevados níveis de Treg no ambiente tumoral podem ser justificados, tanto pela presença de nTreg, quanto pela geração de iTreg. Malchow e colaboradores (2013) sugerem que o ambiente tumoral não proporciona a conversão de células T CD4⁺ em Treg FOXP3⁺ induzidas, mas estimula o recrutamento Treg timoderivadas pré-existentes reativas a antígenos próprios AIRE-dependentes, associados ao órgão de origem do câncer. Enquanto que outros autores indicam que o microambiente pode influenciar no desenvolvimento das Treg induzidas, relatando que embora o entendimento sobre o papel do microambiente na geração de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ *in vivo* ainda permaneça incompleto, alguns aspectos já estão elucidados, como a necessidade do estímulo antigênico via TCR e das citocinas TGF- β e IL-2 para a geração dessas células, uma vez que tais elementos induzem a expressão da proteína FOXP3, fundamental no desenvolvimento e atividade das células Treg (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; LIN *et al.*, 2013).

Condizentes com esses últimos, Kojima e colaboradores (2013) apontaram que a maior frequência encontrada de células Treg FOXP3⁺ cervicais, quando comparada àquela detectada em sangue periférico, pode ser justificada por uma produção local continuada de iTreg antígeno-dependente existente em lesões teciduais cronicamente infectadas pelo HPV.

O predomínio de elevada coexpressão de CD25/FOXP3 nas amostras classificadas como carcinoma (91,6%), seguido daquelas designadas como lesões de alto grau (65,2%) e a significância estatística encontrada quanto à intensidade de coexpressão dos marcadores entre os achados NILM vs HSIL/CA, e entre LSIL vs HSIL/CA, reforçam as evidências de que elevadas frequências de células Treg no microambiente cervical estão fortemente associadas com a supressão da resposta imune, contribuindo para persistência viral e progressão da lesão. Consistentes com esses resultados, achados anteriores relatam que as células Treg FOXP3⁺ estromais predominam nas lesões de alto grau, aumentando consideravelmente no câncer invasivo (ADURTHI *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011).

Como já comentado anteriormente, Scott e colaboradores (2009) verificaram também que a elevada expressão de mRNA de FOXP3 estava associada ao risco

aumentado das pacientes apresentarem lesões neoplásicas de alto grau. E ainda mais recentemente, Kojima e colaboradores (2013), em estudo longitudinal, mostraram pela primeira vez que os níveis de células Treg FOXP3⁺ encontrados em pacientes que apresentaram progressão das lesões HSIL, foram significativamente superiores àqueles detectados nos casos que culminaram com regressão ($p=0,0012$), independentemente do subtipo de HPV.

Embora haja controvérsias entre os estudos, reforçando a importância da pesquisa de células Treg no sítio da infecção, observa-se que o aumento dessas células fora do microambiente cervical também tem sido relatado, como observado por Molling e colaboradores (2007), ao detectarem elevadas densidades dessas células no sangue periférico em infecções persistentes e ainda naquele de Van der Burg e colaboradores (2007), que mostraram níveis elevados de células T regulatórias CD4⁺HPV-específicas capazes de suprimir a proliferação linfócitos T efetores e a produção das citocinas IFN- γ e IL-2, em biópsias de nódulos linfáticos de pacientes com carcinoma cervical.

A ausência de significado estatístico quanto à coexpressão de CD25/FOXP3 entre as amostras sem anormalidades histopatológicas e aquelas designadas como LSIL ($p= 0,5825$) pode ser explicada pelo fato de que lesões de baixo grau refletem uma resposta celular aguda ao HPV, sendo que na grande maioria das vezes essas lesões regredem espontaneamente, uma vez que nesses casos os mecanismos de desenvolvimento neoplásico são suplantados por uma resposta imune ativa ao vírus e às células neoplásicas geradas (COOPER; EVANS; MOUNT, 2003; MOSCICKI *et al.*, 2004). Observa-se que alguns estudos sequer incluem pacientes apresentando LSIL em suas populações amostrais, provavelmente por preverem que o comportamento da resposta imune nessas pacientes é semelhante àquele observado em mulheres não infectadas, como o estudo prospectivo realizado por Molling e colaboradores (2007), desenvolvido para investigar a relação entre a frequência de células Treg e a persistência viral em pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais; e, ainda outro, realizado por Kobayashi e colaboradores (2008) ao investigarem componentes supressivos da resposta imune em microambiente HPV-infectado, para entender o mecanismo de escape viral e progressão das lesões.

No presente estudo observou-se expressão aumentada de CD25/FOXP3 nas amostras com carcinoma (91,6%), seguido daquelas designadas HSIL (65,2%). Esses resultados não refletiram em diferença estatisticamente significativa entre tais categorias histopatológicas ($p=0,0734$), o que pode estar associado ao fato de que tais fenótipos proliferativos conjugam muitas alterações celulares HPV-induzidas, capazes de modificar as propriedades imunogênicas das células tumorais, tornando-as aptas a escaparem de mediadores da resposta imune efetora e ainda colaborarem para o aumento da frequência e da atividade supressiva das células Treg. Dessa forma, estabelecendo um sistema de cooperação célula tumoral – células Treg, e gerando, portanto, uma regulação negativa exacerbada sobre a resposta imune, em ambas as categorias histopatológicas.

Sugere-se, então, que o desenvolvimento de lesões mais severas nos casos analisados no presente estudo tenha tido como forte influência, além da presença de HPV de alto risco, a elevada densidade de células CD25⁺FOXP3⁺ encontrada no microambiente tecidual lesado, em especial naqueles casos com carcinoma, como apontado também por outros estudos (ADURTHI *et al.*, 2008; JAYSHREE *et al.*, 2009).

É sabido que tanto CD25 quanto FOXP3 contribuem para o forte poder supressivo exercido pelas células T regulatórias. A importância do FOXP3 no desenvolvimento e função dessas células é realçada por evidências que mostram sua habilidade em suprimir a transcrição de citocinas inflamatórias, além de promover a expressão de genes associados às células Treg (SCHUBERT *et al.*, 2001), entretanto, a base molecular funcional desse fator de transcrição ainda não está bem definida. Evidências experimentais mostram que a ligação do antígeno com o receptor da célula T (TCR) desencadeia a interação física entre FOXP3 e os fatores nucleares NF- κ B e NFAT, inibindo-os, e por consequência, reprimindo os genes de transcrição das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ ; e, estimulando a expressão de CD25, CTLA-4 e GITR (CAMPBELL; ZIEGLER, 2007). Observa-se que a expressão de FOXP3 pode acontecer também em células T CD4⁺ efetoras e nessas células, este fato, desencadeia um estado de hiporresponsividade (GAVIN *et al.*, 2006; MORGAN *et al.*, 2005; WALKER *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007; ZIEGLER 2006; ZIEGLER 2007).

Experimentos envolvendo análises funcionais celulares com animais transgênicos, os quais expressam FOXP3 em todas as células T CD4⁺, mostram que tais células adquirem o perfil de células T regulatórias (WALKER *et al.*, 2003; KASPROWICZ *et al.*, 2003). Ressalta-se, no presente estudo, a possibilidade de ter sido considerada a detecção células T ativadas expressando FOXP3, de forma transitória ou persistente, no entanto, isso não compromete as associações realizadas entre a detecção de células CD25⁺FOXP3⁺ e a supressão da resposta, tampouco o papel do FOXP3 como marcador específico de células Treg, uma vez que é sabido que as células FOXP3⁺ exibem, independentemente, propriedades imunossupressivas.

Quanto ao efeito do CD25 nas células Treg, estudos mostram que as Treg são mais sensíveis à ativação após o estímulo antigênico, quando comparadas às células T efectoras *naïves*, fato que tem sido atribuído principalmente ao estado semi-ativado das células Treg, conferido pela elevada expressão de CD25 presentes na membrana dessas células (BRUSKO *et al.*, 2009; ITOH *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2000; YAMAGUCHI *et al.*, 2007). Estudos envolvendo pacientes com câncer cervical uterino têm demonstrado *in vitro* que a depleção de células T CD25⁺ leva ao aumento da resposta das células T helper específicas para E6 e E7 do HPV16, sugerindo que as respostas anti-HPV existem, mas são, entretanto, moduladas pelas células Treg (HOU; MA; CUI, 2013; VISSER *et al.*, 2007).

A detecção de células CD25⁺FOXP3⁺ apenas em grande quantidade, entre as amostras com baixa carga viral (CV1), pode não refletir a realidade, tendo em vista o limitado número de amostras com essas características. Entretanto, é evidente a associação entre o predomínio de intensa coexpressão de CD25/FOXP3 e a elevada carga viral (CV2), assim como o predomínio da pequena quantidade de células CD25⁺FOXP3⁺ e a negatividade para o HPV-DNA (p=0,008). Nota-se ainda que a presença de um caso com baixa carga viral (CV1), lesão de alto grau e elevada coexpressão de CD25/FOXP3 pode refletir um estado de equilíbrio na resposta imune com tendência à preponderância de escape viral, caso estejam associadas ainda propriedades tumorais não-imunogênicas (JAYSHREE *et al.*, 2009). Considera-se ainda que nesse caso o baixo número de cópias virais possa refletir níveis flutuantes de partículas virais no decurso da infecção (WHEELER *et al.*, 1996).

Ainda não está claro se frequências aumentadas de células Treg são causa ou consequência de elevada carga viral e cronicidade das infecções, no entanto, os resultados de Molling e colaboradores (2007), em estudo prospectivo que mostram frequências aumentadas de Treg em pacientes que apresentaram persistência do HPV 16 e desenvolvimento de lesões de alto grau, somado aos resultados do presente estudo que mostraram predomínio (64,4%) de elevada carga viral (≥ 10.000 a 250.000 cópias virais/mL), principalmente relacionada aos tipos HPV 16 e 18, entre as amostras designadas como HSIL e CA que apresentaram grande quantidade de células coexpressando CD25/FOXP3, fortalecem as evidências de que essas células desempenham importante papel na carcinogênese. Tal fato é corroborado pela observação de que a vacinação de pacientes com câncer cervical não gera resposta citotóxica específica ao HPV 16, reforçando o modelo de que mecanismos de tolerância precedem o câncer cervical invasivo (KOBAYASHI *et al.*, 2008; RESSING *et al.*, 2000). Frequências diminuídas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ específicas para proteínas virais do HPV 16 encontradas em mulheres com lesão de alto grau quando comparadas àquelas infectadas sem lesão também podem estar associadas ao efeito exercido pelas células T regulatórias na geração e função dessas células efectoras (DE JONG *et al.*, 2004; NAKAGAWA *et al.*, 1997).

A observação de elevada quantidade de células $CD4^+TGF-\beta^+$ em todas as amostras classificadas como carcinoma e em 89,1% daquelas designadas como lesões de alto grau, associada à significância estatística encontrada quanto à intensidade de coexpressão de $CD4/TGF-\beta$ entre os achados NILM vs HSIL/CA, e entre LSIL vs HSIL/CA, reforçam as evidências da associação entre a presença de elevada frequência de células Treg e a progressão neoplásica. A detecção no presente estudo de elevados níveis de células produtoras de $TGF-\beta$ entre as amostras com carcinoma invasivo enfatiza o papel já conhecido dessa citocina, bem como dessa população celular em facilitar a migração de células tumorais do epitélio para o estroma cervical, promovendo o crescimento neoplásico, a invasão e a angiogênese (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Estudos mostram a íntima relação entre $TGF-\beta$ e FOXP3, uma vez que essa citocina exerce importante papel na indução desse fator transcricional (FANTINI *et al.*, 2004; JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2009). Nesse sentido, os resultados ora

obtidos quanto à detecção da coexpressão de CD4/TGF- β nos permite supor que as células detectadas coexpressando tais moléculas, podem se tratar de células Treg (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; FARIA; WEINER, 2005; HORWITZ; ZHENG; GRAY, 2008; OKAMURA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2013; ZHENG, 2012; ZHOU *et al.*, 2010). De forma interessante, Andersson e colaboradores (2008) mostraram que o TGF- β presente na membrana de células T CD4⁺FOXP3⁺ tem a habilidade em conferir uma “tolerância infecciosa”, capaz de converter células T FOXP3⁻ em Treg FOXP3⁺. Ressalta-se então, a importância da dupla marcação CD4⁺TGF- β ⁺ no presente estudo, uma vez essas células podem sugerir a presença de iTreg TGF- β ⁺, sendo consideradas como melhores preditoras de progressão da lesão quando comparadas à avaliação isolada de TGF- β , já que alguns estudos têm demonstrado que a expressão dessa citocina pode estar diminuída em lesões cervicais em comparação aos níveis encontrados no epitélio normal (EL-SHERIF *et al.*, 2000; KOJIMA *et al.*, 2013; XU *et al.*, 1999).

A ausência de significância estatística observada quanto ao nível de coexpressão de CD4/TGF- β entre as associações NILM vs LSIL e HSIL vs CA pode ser justificada por motivos semelhantes àqueles explicitados na avaliação da coexpressão de CD25/FOXP3, uma vez que a primeira associação de achados histopatológicos pode refletir uma resposta imune efetora, capaz de eliminar o vírus, que corre em paralelo com uma regulação negativa homeostática; e, a segunda, a vigência de fenótipos proliferativos que conjugam muitas alterações neoplásicas HPV-induzidas capazes de gerar em ambos os casos regulação negativa exacerbada da resposta imune, permitindo, portanto, a persistência viral e maior severidade das lesões.

Os resultados obtidos que mostram expressão aumentada de células FOXP3⁺ e células TGF- β ⁺ nas lesões de alto grau e carcinoma são condizentes com as evidências fornecidas por Kobayashi e colaboradores (2008). Nesse sentido, observa-se que a presença de TGF- β pode exercer influências negativas ou positivas para o crescimento tumoral, a depender do microambiente e da fase em que ocorre. Observa-se que na ausência de lesão ou ainda nas fases iniciais da proliferação neoplásica (LSIL), a presença dessa citocina pode ser relevante, devido ao seu papel protetor, capaz de inibir a proliferação descontrolada de células epiteliais, interrompendo o ciclo celular e ainda induzindo a apoptose. Entretanto,

nas alterações neoplásicas mais avançadas, a citocina TGF- β em grandes quantidades, secretada por diversos tipos celulares, tais como as células CD4⁺TGF- β ⁺ detectadas e até mesmo pelas próprias células neoplásicas, tem a característica de contribuir para a progressão tumoral (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001). Vale ressaltar que nas lesões mais severas, as células tumorais possuem diversas estratégias para escapar do efeito inibitório do TGF- β , dentre elas, a baixa expressão ou ainda hiporreatividade dos receptores para essa citocina, agindo sinergicamente para a progressão neoplásica (GUO; JACOBS; KYPRIANOU, 1997; KIM *et al.*, 2000).

A equivalência observada em relação à quantidade de células CD4⁺TGF- β ⁺ entre as amostras negativas para o HPV e aquelas com pequenos níveis de carga viral (CV1) pode ser explicada pela necessidade de mecanismos regulatórios ativos capazes de evitar respostas indesejadas em tecidos não infectados sem anormalidades histopatológicas; ou, ainda respostas exacerbadas nos tecidos infectados que cursem com poucas alterações histopatológicas. A presença de apenas um caso com pequenas quantidades de cópias virais (CV1) apresentando lesão de alto grau e baixa coexpressão de CD4/TGF- β , pode refletir, como já foi dito, um quadro de equilíbrio imune, cujo desfecho, representado pela eliminação ou escape viral, depende de propriedades inerentes ao vírus e ao hospedeiro (JAYSHREE *et al.*, 2009). Considera-se ainda que o baixo número de cópias virais nesse caso pode refletir níveis flutuantes de partículas virais no decurso da infecção, também como já dito anteriormente (WHEELER *et al.*, 1996).

O predomínio (86,8%) de grande quantidade de células coexpressando CD4/TGF- β entre as amostras com elevados níveis de cópias virais (CV2), somado à correlação estatística encontrada entre a coexpressão desses marcadores e os níveis de carga viral ($p= 0,022$), indicam que o TGF- β pode estar exercendo influências supressivas na resposta imune, tais como, inibindo a proliferação e ativação de linfócitos T efetores, células NK, macrófagos e linfócitos B, além de contribuir para a geração de mais células imunorregulatórias, possibilitando, portanto, o escape imune tanto do vírus quanto das células neoplásicas (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; LETTERIO; ROBERTS, 1998; LIN *et al.*, 2013).

O efeito supressivo de TGF- β tem sido relacionado com sua habilidade em inibir a expressão e a função da IL-2 e seu receptor (IL-2R), entre as células efectoras

da resposta imune, além de diminuir a expressão de moléculas de MHC classe II pelas APCs (BOTTI *et al.*, 1998). A presença de TGF- β nas lesões mais severas pode ainda impedir a diferenciação de células dendríticas imaturas, mantendo níveis aumentados da enzima imunossupressora IDO. Esse mesmo efeito sobre o amadurecimento de células dendríticas é observado diante de elevadas concentrações de IL-10 (WAKKACH *et al.*, 2003). Ressalta-se ainda que o predomínio (85,2%) de elevada carga viral (CV2) entre as amostras designadas como HSIL e CA apresentando intensa coexpressão de CD4/TGF- β reforça os apontamentos já realizados anteriormente. Diante de uma associação de condições favorecedoras do crescimento tumoral, aqueles casos com lesões de alto grau podem resultar em transformação maligna, invasão e metástase (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001).

A elevada expressão de IL-10 observada em todas as amostras com carcinoma e na maioria (83,3%) daquelas designadas como HSIL, somado à significância estatística encontrada entre os achados LSIL vs HSIL/CA e a expressão de IL-10 ($p=0,002$), contribui sinergicamente com os resultados anteriormente discutidos, indicando que a persistência viral e lesões neoplásicas mais severas cursam com uma acentuada imunossupressão local.

Estudos demonstram que a progressão das lesões intraepiteliais cervicais está associada com o aumento local de IL-10 e IL-12, entretanto, observa-se que lesões de alto grau, apresentam expressão diminuída de IL-12 e níveis ainda maiores de IL-10 quando comparados às lesões de baixo grau, o que contribui para um mecanismo de escape eficiente utilizado pelo vírus e pelas células tumorais (GIANNINI *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2008). O papel supressor da IL-10 já é bem estabelecido e envolve mecanismos que inibem células Th1 efectoras, que favorecem a diferenciação de células T naive em células Th2/iTreg e ainda, que diminuem a expressão de moléculas MHC classe I e II, resultando na falha da eliminação de antígenos virais e tumorais (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; BEISSERT *et al.*, 1995; MATSUDA *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 1993; RONCAROLO *et al.*, 2006).

A expressão aumentada de IL-10, por diversas células da resposta imune e pelas próprias células cancerosas, tem sido relatada em cânceres pulmonares, renais, linfomas, melanomas, assim como em carcinoma de cérvix uterina (HUANG

et al., 1995; KIM *et al.*, 1995; ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003). Enfatiza-se que, no presente estudo, a expressão de IL-10 foi avaliada somente em células com características morfológicas indicativas de linfócitos, tendo em vista o objetivo proposto de detectar linfócitos com perfil regulatório, em especial, as células Tregulatórias. A associação entre frequências aumentadas de Treg e níveis elevados de IL-10 foi demonstrada por Zhang e colaboradores (2011), ao caracterizarem essas células no sangue circulante e em metástases de nódulos linfáticos de pacientes com câncer cervical, os quais verificaram inclusive, que níveis significativamente maiores de Treg e IL-10 eram encontrados nas formas metastáticas quando comparado à ausência de metástase.

Os resultados ora obtidos são condizentes com os do estudo de Adurthi e colaboradores (2008) que analisaram múltiplos marcadores, utilizando técnicas imunohistoquímicas de simples e dupla marcação, nas diferentes categorias histopatológicas de cérvix uterina e identificaram frequências elevadas de células CD25⁺FOXP3⁺, células CD25⁺TGF- β ⁺ e células IL-10⁺ em amostras com carcinoma, seguido daquelas com lesões de alto grau, concluindo que embora tenham também detectado frequências elevadas de células CD4⁺ e CD8⁺ nessas amostras, o crescimento tumoral continuado justificava-se pela presença de microambiente regulatório instalado.

A ausência de significado estatístico quanto à expressão de IL-10 entre os achados NILM vs HSIL/CA pode ser justificada pelo pequeno número de amostras sem alterações histopatológicas envolvidos neste estudo, mas também pode refletir um mecanismo de *feedback* homeostático fundamental encontrado em tecidos histologicamente normais ausentes de infecção (SCOTT *et al.*, 2009). Tal mecanismo regulatório também pode justificar a fraca correlação estatística encontrada entre os achados NILM vs LSIL (p=0,0527). Um estudo que avaliou quantitativamente a expressão de mRNA de IL-10 em cérvix uterina por PCR em tempo real, identificou níveis significativamente maiores (p=0,005) dessa citocina em amostras com lesões pré-neoplásicas quando comparados àquelas sem anormalidades, demonstrando, também, à semelhança do presente estudo, a ausência de diferença significativa (p=0,96) quanto aos níveis de expressão de IL-10 entre as amostras NILM e LSIL (EL-SHERIF *et al.*, 2001). Vale lembrar que o referido estudo também utilizou número reduzido de amostras para a análise.

A falta de associação significativa quanto à expressão de IL-10 entre as amostras HSIL e CA pode ser justificada pelo mesmo motivo anteriormente descrito para os demais marcadores, uma vez que tais achados histopatológicos conjugam alterações celulares neoplásicas semelhantes e acentuada regulação negativa da resposta imune.

Embora não tenha sido avaliada a persistência viral diretamente e dado que a IL-10 exerce efeito supressivo sobre as células Th1, observa-se que o predomínio de elevada expressão de IL-10 (83,1%) entre as amostras com altos níveis de carga viral (CV2) pode refletir a persistência viral, uma vez que o resultado encontrado enquadra-se em um modelo de resposta celular insuficiente para a eliminação do vírus. Tal sugestão é reforçada pela significância estatística encontrada entre expressão de IL-10 e carga viral ($p=0,045$), assim como pelo predomínio (71,8%) observado de elevados níveis de carga viral (CV2) entre as amostras designadas como HSIL e CA apresentando grande quantidade de células IL-10⁺.

À semelhança de apontamentos anteriores, sugere-se que o ligeiro predomínio de elevada expressão de IL-10 entre as amostras negativas para HPV e naquelas com baixas cópias virais (CV1) possa ser justificado pela necessidade de regulação negativa, capaz de evitar respostas inflamatórias indesejadas ou exageradas. Sugere-se também, que os casos infectados que sustentem elevados níveis de IL-10, mesmo que com baixa carga viral, poderão ainda assim apresentar risco aumentado de persistência viral. Em relação à presença de um caso apenas com poucas cópias virais (CV1), lesão de alto grau e elevada coexpressão de IL-10, como abordado anteriormente, pode refletir níveis flutuantes de detecção viral no decurso da infecção (WHEELER *et al.*, 1996).

Contribuindo com discussões anteriores, os resultados obtidos quanto à detecção de células GITR⁺ reforçam a importância das Treg para a manutenção do microambiente tumoral, uma vez que foi observada elevada expressão de GITR em todas as amostras com carcinoma e na maioria (91,7%) daquelas com lesão de alto grau, com significância estatística encontrada entre os achados NILM vs CA ($p=0,05$) e HSIL vs LSIL ($p=0,029$), e ainda uma tendência entre CA vs LSIL ($p=0,0679$) e NILM vs HSIL ($p=0,0662$).

O GITR tem sido considerado o segundo marcador característico de células T regulatórias e a sua elevada expressão induzida por FOXP3 nessas células tem sido

relacionada a um estado de semi-ativação capaz de conferir reatividade aumentada quando do estímulo antigênico às Treg (de BOER *et al.*, 2007; BUSHELL; WOOD, 2007; ITOH *et al.*, 1999; OHKURA; SAKAGUCHI, 2010; ONNO *et al.*, 2007; RUDENSKY, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2000; YAMAGUCHI *et al.*, 2007). A relevância das células que expressam GITR na supressão da resposta imune é enfatizada por estudos que avaliam a atividade supressora *in vitro* de células T CD4⁺, células CD4⁺CD25⁺GITR⁺ e células CD4⁺CD25⁻GITR⁺ mediada por secreção de citocinas. Os resultados mostram que as primeiras produzem citocinas que ativam a resposta imune, enquanto que as duas últimas produzem níveis aumentados de citocinas imunossupressoras (SHIMIZU *et al.*, 2002; URAUSHIHARA *et al.*, 2003).

A ausência de significado estatístico quanto à expressão de GITR entre os achados NILM vs LSIL e CA vs HSIL pode ser interpretada com o mesmo raciocínio já explicitado, de que os fenótipos comparados constituem perfis histológicos que cursam provavelmente com graus de regulação positiva/negativa da resposta imune.

À semelhança de resultados anteriormente discutidos, sugere-se que o predomínio de elevada expressão de GITR nas amostras negativas para HPV-DNA e naquelas com baixos níveis (CV1) de cópias virais possa ser justificado pelo mecanismo de regulação negativa, necessário para impedir respostas imunes indesejadas ou exacerbadas, as quais causariam destruição tecidual, embora, podendo também não refletir a realidade em virtude do reduzido tamanho amostral naqueles casos sem anormalidades histológicas (SCOTT *et al.*, 2009). Já a observação de um caso com baixas cópias virais e elevada expressão de GITR entre as amostras HSIL pode refletir a detecção de níveis flutuantes do vírus, como citado anteriormente (WHEELER *et al.*, 1996).

Os resultados do presente estudo mostram o predomínio (91%) de elevada expressão de GITR entre as amostras com altos níveis de carga viral (CV2), com maior percentual (79,1%) atribuído àquelas designadas como HSIL e CA, apontando, portanto, o envolvimento de células GITR⁺ na progressão tumoral. Concordantemente, observa-se o estudo de Pedroza-Gonzalez e colaboradores (2013) que ao investigar a influência das células Treg infiltrantes de tumor nas respostas de linfócitos T tumores-específicos, em pacientes com câncer hepático, encontrou expressão aumentada de GITR em microambiente tumoral quando

comparada àquela observada em tecido sem alterações neoplásicas. Semelhantemente, o estudo de Krausz e colaboradores (2012) que detectou frequência aumentada de células Treg GITR⁺ em nódulos linfáticos tumorais quando comparados a nódulos não infiltrados por células tumorais, no mesmo paciente. Ambos os estudos propõem que o ligante de GITR (GITRL) pode configurar um alvo para terapias futuras contra o câncer e que GITR/GITRL são bons candidatos a biomarcadores de evolução das doenças malignas.

Observa-se no presente estudo que os padrões de expressão dos marcadores e citocinas analisados ocorrem em paralelo e que as amostras apresentando lesões mais severas demonstram maior grau de regulação negativa da resposta imune, o que sugere que as células Treg bem como suas citocinas supressoras, podem ter forte envolvimento na manutenção do microambiente favorável à persistência viral e à progressão neoplásica. No entanto, por se tratar de um estudo transversal, não foi possível avaliar mudanças no padrão de expressão desses marcadores no curso da infecção, tornando-se fundamental a realização de estudos longitudinais que permitam uma análise mais detalhada da regulação imune no microambiente infectado.

A literatura já tem considerado a elevada densidade de células Treg FOXP3⁺ nas lesões tumorais como um fator preditivo de mau prognóstico em muitos cânceres, sugerindo que essas células desempenham um importante papel funcional na progressão neoplásica (de LEEUW *et al.*, 2012). No entanto, o seu envolvimento na carcinogênese cervical HPV-induzida ainda não está bem elucidado.

Sabe-se que o conhecimento parcial da resposta imune ao HPV já tem levado à realização de métodos terapêuticos, como o uso de interferons e moduladores imunológicos, trazendo benefícios para as mulheres infectadas pelo vírus, no entanto, ainda são pouco eficazes. Estratégias terapêuticas incluindo a modulação das células Treg podem ser menos tóxicas do que a quimioterapia vigente. Observa-se que o desenvolvimento de vacinas, também, tem contribuído para a prevenção da infecção e evidências apontam para a possibilidade da introdução de moduladores de células Treg nas composições vacinais. Nesse sentido, ressalta-se, então, a importância do melhor entendimento do papel exercido pelas células T regulatórias na resposta imune ao HPV, sobretudo, no microambiente cervical, com o objetivo de

compreender o quadro completo de uma resposta do hospedeiro à infecção pelo HPV, inclusive no que diz respeito às condições que possam estar associadas à persistência viral e ao desenvolvimento do câncer e suas lesões precursoras, permitindo, então, o avanço das estratégias terapêuticas e preventivas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste estudo, pioneiro em nossa região, evidencia-se a existência de um microambiente regulado negativamente, composto por elevada quantidade de células $CD25^+FOXP3^+$, células $CD4^+TGF-\beta^+$, células $IL-10^+$ e células $GITR^+$ nas amostras classificadas como carcinoma, seguido daquelas designadas como lesões intraepiteliais cervicais de alto grau. A presença abundante destes marcadores, indicativos da população de células Treg e suas citocinas, foi significativamente associada às lesões mais severas e à elevada carga viral, sugerindo que essas células imunorregulatórias podem ter forte envolvimento na manutenção do microambiente favorável à persistência viral e à progressão neoplásica. Ressalta-se que os elementos pesquisados podem ser úteis como biomarcadores preditivos da progressão da doença cervical, e que o melhor entendimento sobre o papel exercido pelas células Treg na carcinogênese cervical de etiologia viral poderá contribuir para o avanço de estratégias terapêuticas e preventivas, incluindo a possível utilização dessas células como potenciais alvos para a modulação da resposta imunológica.

8 CONCLUSÕES

Através do presente estudo conclui-se que:

- A coexpressão de CD25/FOXP3 e de CD4/TGF- β foi elevada entre as amostras classificadas como carcinoma, seguido daquelas designadas como HSIL.
 - Entre as amostras com elevada carga viral houve predomínio de intensa coexpressão de CD25/FOXP3 e CD4/TGF- β .
 - As amostras designadas como HSIL e CA com intensa coexpressão de CD25/FOXP3 e CD4/TGF- β apresentaram predomínio de elevada carga viral.
 - A expressão de IL-10 e GITR foi elevada em todas as amostras com carcinoma e na maioria daquelas designadas como HSIL.
 - Entre as amostras com elevada carga viral houve predomínio de elevada expressão de IL-10 e GITR.
 - As amostras designadas como HSIL e CA com intensa expressão de IL-10 e GITR apresentaram predomínio de elevada carga viral.
- ✓ A identificação de elevada expressão dos marcadores CD25/FOXP3, CD4/TGF- β , IL-10 e GITR entre as amostras analisadas, associada às lesões mais severas e aos altos níveis de carga viral é indicativo da presença de células Treg e suas citocinas, constituindo um microambiente favorável à persistência viral e à progressão neoplásica.

REFERÊNCIAS

- Aandahl EM, Michaëlsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+CD25+ regulatory T cells control T-cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol*. 2004 Mar; 78(5): 2454-9.
- Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol*. 2008 60: 55-65.
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr; 148(1): 32-46.
- Agarossi A, Ferrazzi E, Parazzini F, Perno CF, Ghisoni L. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus infection in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Italy. *J Med Virol*. 2009 Mar; 81(3): 529-35.
- Aleixo Neto A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. *Rev. Saúde públ*. 1991 Ago; 25(4): 326-33.
- Almeida FG. Epidemiologia molecular da infecção pelo papilomavírus humano em mulheres jovens, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2013.120 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina/UFMS, Campo Grande, 2013.
- Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea J, et al. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med*. 2008 Sep 1; 205(9): 1975-81.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy - review of a new approach. *Pharmacol Rev*. 2003 55: 241.
- Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, O'Brien PM, Sibbet GJ, Andrew L, et al. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene*. 2002 Jan 10; 21(2): 248-59.

Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug; 120(2): 227-35.

Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhardt C, Roost H, et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science*. 1997 Jun 27; 276(5321): 2024-7.

Baecher-Allan CM, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Clin Immunol*. 2005 Nov; 117(2): 192-3.

Bafverstedt B. Condyloma acuminata past and present. *Acta Derm Venereol*. 1967 47(5): 376-81.

Balestieri FMP. *Imunologia*. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2006.

Banura C, Mirembe FM, Katahoire AR, Namujju PB, Mbonye AK, Wabwire FM. Epidemiology of HPV genotypes in Uganda and the role of the current preventive vaccines: A systematic review. *Infect Agent Cancer*. 2011 Jul 12; 6(1): 11.

Barnard P, Payne E, McMillan NA. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology*. 2000 Nov 25; 277(2): 411-9.

Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, et al. transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA*. 1994 Apr 20; 271(15): 1181-8.

Bedell MA, Jones KH, Laimins LA. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J Virol*. 1987 Nov; 61(11): 3635-40.

Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1995 Feb 1; 154(3): 1280-6.

Beutner KR, Ferenczy A. Therapeutic approaches to genital warts. *Am J Med*. 1997 May 5; 102(5A): 28-37.

Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunol Rev.* 2011 Jan; 239(1): 85-98.

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11; 204(6): 1303-10.

Borges, TM. *Imunologia da infecção pelo HPV*. 2008. 83 p. Monografia (Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2008.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992 52: 743-9.

Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Research.* 2002 89: 183-90.

Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003 (31): 3-13.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr; 55(4): 244-65.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun 7; 87(11): 796-802.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984 May; 3(5): 1151–57.

Botti C, Seregini E, Ferrari L, Martinetti A, Bombardieri E. Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *Int J Biol Markers.* 1998 Apr-Jun; 13(2): 51-69.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2011. Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agenda estratégica 2011-2015. Brasília: SVS, 2011. [acesso em: 20 de maio de 2013]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/agenda_estrategica_svs_2011_2015.pdf

Brenna SM, Syrjänen KJ. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV) - associated cervical carcinogenesis. Sao Paulo Med J. 2003 May 5; 121(3): 128-32.

Brentjens MH, Yeung-Yue KA, Lee PC, Tyring SK. Human papillomavirus: a review. Dermatol Clin. 2002 Apr; 20(2): 315-31.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead / winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. 2001 Jan; 27(1): 68-73.

Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. PLoS One 2009 4:e7980.

Bulkmans NW, Rozendaal L, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Boeke AJ, Zandwijken GR, et al. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. Int J Cancer. 2004 May 20; 110(1): 94-101.

Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. Vaccine. 2006 Aug 31; 24 Suppl 3: S3/52-61.

Bushell A, Wood K. GITR ligation blocks allograft protection by induced CD25+CD4+ regulatory T cells without enhancing effector T-cell function. Am J Transplant 2007 7:759-68.

Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. Nat Rev Immunol. 2007 7(4): 305-10.

Campion MJ, Clarkson P, McCance DJ. Squamous neoplasia of the cervix in relation to other genital tract neoplasia. *Clin Obstet Gynaecol*. 1985 mar; 12(1): 265-80.

Cannizzaro LA, Dürst M, Mendez MJ, Hecht BK, Hecht F. Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988 Jul 1; 33(1): 93-8.

Cao Y, Zhao J, Lei Z, Shen S, Liu C, Li D, et al. Local Accumulation of FOXP3 Regulatory T Cells: Evidence for an Immune Evasion Mechanism in Patients with Large Condylomata Acuminata. *J Immunol*. 2008 Jun 1; 180(11): 7681-6.

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al.: Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000 181: 1911-9.

Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003 (31): 29-34.

Castle PE, Hildesheim A, Bowman FP, Strickler HD, Walker JL, Pustilnik T, et al. Cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin Immunol*. 2002 Jan; 22(1): 23-7.

Cervantes J, Lema C, Hurtado L, Andrade R, Quiroga G, Garcia G, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in rural villages of the Bolivian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003 May-Jun; 45(3): 131-5.

Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Nat Immunol*. 2002 Mar; 3(3): 237-43.

Chao A, Chen TC, Hsueh C, Huang CC, Yang JE, Hsueh S, et al. Human papillomavirus in vaginal intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2012 Aug 1; 131(3): E259-68.

Chaouki N, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, El Gueddari B, El Ghazi A, et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer*. 1998 Feb 9; 75(4): 546-54.

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, et al. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*. 1987 Feb 13; 48(3): 409-15.

Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2010 Feb; 2(1): 30-6.

Cho YS, Kang JW, Cho M, Cho CW, Lee S, Choe YK, et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett*. 2001 Jul 20; 501(2-3): 139-45.

Choo KB, Pan CC, Han SH. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology*. 1987 Nov; 161(1): 259-61.

Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS*. 2010 118: 422–49.

Ciotti M, Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Benedetto A, Favalli C. Single or multiple HPV types in cervical cancer and associated metastases. *Oncol Rep*. 2006 Jan; 15(1): 143-8.

Ciuffo G. Innesto positive com filtrate di verruga volgare. *Gior Ital Mal Venner*. v. 1907 48: 12-7.

Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*. 2007 67(19): 9518-27.

Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Dec; 2(12): 910-7.

Clavel C, Rihet S, Masure M, Chypre C, Boulanger JC, Quereux C, et al. DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiplex PCR. *J Clin Pathol*. 1998 Jan; 51(1): 38-43.

Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Feb 5; 89(3): 245-50.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005 Sep 17-23; 366(9490): 991-8.

Clifford GM, Gonçalves MA, Franceschi S; HPV and HIV Study Group. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS.* 2006 Nov 28; 20(18): 2337-44.

Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003 Jan 13; 88(1): 63-73.

Coffer PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004 4(11): 889-9

Cohen AD, Schaer DA, Liu C, Li Y, Hirschhorn-Cymerman D, Kim SC, et al. Agonist Anti-GITR Monoclonal Antibody Induces Melanoma Tumor Immunity in Mice by Altering Regulatory T Cell Stability and Intra-Tumor Accumulation. *PLoS One.* 2010 May 3; 5(5): e10436.

Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994 Dec; 102(6): 768-74.

Connor JP, Ferrer K, Kane JP, Goldberg JM. Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 1999 Oct; 75(1): 130-5.

Cook HR, Olson C. Experimental transmission of cutaneous papilloma of the horse. *Am J Pathol.* 1951 Nov-Dec; 27 (6):1087-97.

Cooper K, Evans M, Mount S. Biology and evolution of cervical squamous intraepithelial lesions: a hypothesis with diagnostic prognostic implications. *Adv Anat Pathol*. 2003 10: 200-3.

Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lörincz AT, Burk RD, et al. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection on Human Papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin Microbiol*. 1997 Sep; 35(9): 2262-5.

Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar; 40(3): 902-7.

Cruvinel WM, Mesquita DJ, Araújo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. *Rev Bras Reumatol*. 2008 48: 342-355.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep; 10(9): 942-9.

Curotto de Lafaille MA and Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009 30: 626-635.

Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and –independent control of allergic inflammation. *Immunity*. 2008 Jul 18; 29(1): 114-26.

Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet*. 2003 Dec 6; 362(9399): 1871-6.

Dai M, Bao YP, Li N, Clifford GM, Vaccarella S, Snijders PJ, et al. Human papillomavirus infection in Shanxi Province, People's Republic of China: a population-based study. *Br J Cancer*. 2006 Jul 3; 95(1): 96-101.

Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade

cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*. 2003 Sep 1; 106(3): 396-403.

de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wal AC, Teunissen MB. Immunohistochemical Analysis of Regulatory T Cell Markers FOXP3 and GITR on CD41CD251 T Cells in Normal Skin and Inflammatory Dermatoses. *J Histochem Cytochem*. 2007 Sep;55(9): 891-8.

de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*. 2004 64: 5449–55.

de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul; 7(7): 453-9.

de Sanjosé S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010 Nov; 11(11): 1048-56.

De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA, Wilbanks GD. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol*. 1993 Jun; 49(3): 303-10.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20; 324(1): 17-27.

de Leeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 1; 18(11): 3022-9.

Demengeot J, Zelenay S, Moraes-Fontes MF, Caramalho I, Coutinho A. Regulatory T cells in microbial infection. *Springer Semin Immunopathol*. 2006 Aug; 28(1): 41-50

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001 Oct; 29(2): 117-29.

Desai S, Wetten S, Woodhall SC, Peters L, Hughes G, Soldan K. Genital warts and cost of care in England. *Sex Transm Infect.* 2011 Oct; 87(6): 464-8.

DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene, Oncogene.* 2001 Nov 26; 20(54):7866-73.

Doan T, Herd KA, Lambert PF, Fernando GJ, Street MD, Tindle RW. Peripheral tolerance to human papillomavirus E7 oncoprotein occurs by cross-tolerization, is largely Th-2-independent, and is broken by dendritic cell immunization. *Cancer Res.* 2000 Jun 1; 60(11): 2810-5.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991 Aug 29; 352(6338): 824-7.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005 Mar; 32 Suppl 1: S7-15.

Dun AE, Ogilvie MM. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: Observations on the ultra structure of epidermal layer. *J Ultrastruct Res.* 1968 Feb; 22(3): 282-95.

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun; 80(12): 3812–15.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus- 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989 Feb 17; 243(4893): 934-7.

El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol.* 2000 192:494–501.

El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN- γ mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol.* 2001 195:179–185.

Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 1994 January; 69(1): 114–9.

Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, Nambiar PR, Ge Z, Fox JG, et al. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 2005 May 15; 65(10): 3998-4004.

Escobar Ospina ME, Perdomo JG. A growth model of human papillomavirus type 16 designed from cellular automata and agent-based models. *Artif Intell Med.* 2013 Jan; 57(1):31-47

Faccini AM, Cairney M, Ashrafi GH, Finbow ME, Campo MS, Pitts JD. The bovine papillomavirus type 4 E8 protein binds to ductin and causes loss of gap junctional intercellular communication in primary fibroblasts. *J Virol.* 1996 Dec; 70(12): 9041-5.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004 May 1; 172(9): 5149-53.

Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005 Aug; 206: 232-59.

Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Res.* 2003 Jul 1; 63(13): 3478-82.

Ferenczy A, Mitao M, Nagai N, Silverstein SJ, Crum CP. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med.* 1985 Sep 26; 313(13): 784-8.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989 170: 2081.

Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2006 Mar 1; 118(5): 1187-93.

Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*. 2002 76: 10009–14.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr; 4(4): 330-6.

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010 Jul; 236: 219-42.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999 Nov; 180(5): 1415-23.

Frazer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N, et al. Potential strategies utilized by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev*. 1999 Apr; 168: 131-42.

Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Sep 20; 92(18): 1500-10.

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol*. 2003 15: 430–5.

García-Millián R, Santos A, Perea SE, González-Cabañas R, Valenzuela C, Araña M. Molecular analysis of resistance to interferon in patients with laryngeal papillomatosis. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1999 Jun; 5(2): 79-85.

Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res*. 2007 May; 125(2): 176-82.

Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25; 103(17): 6659-64.

Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene*. 2000 Oct 5; 19(42): 4930-5.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*. 2005 Oct 3; 202(7): 919-29.

Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 1998 Aug; 113(2): 183-9.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996 Oct; 6(10): 995-1001.

Gissmann L, zur Hausen H. Human papillomavirus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Apr; 73(4): 1310-3.

Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, et al. Incidence, prevalence, and clearance of typespecific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis*. 2002 Aug 15; 186(4): 462-9.

Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol*. 2005 174:1783–1786.

Goodman JR, Greenwood AM. Verrucae, a review. *Arch Dermatol & Syphilol*. 1934 30: 659-71.

Gounaris E, Blatner NR, Dennis K, Magnusson F, Gurish MF, Strom TB, et al. T-regulatory cells shift from a protective anti-inflammatory to a cancer-promoting proinflammatory phenotype in polyposis. *Cancer Res.* 2009 Jul 1; 69(13): 5490-7.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 38: 357-61.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity.* 2004 21: 589–601.

Gruijl TD, Bontkes HJ, van den Muysenberg AJ, van Oostveen JW, Stukart MJ, Verheijen RH, et al. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer.* 1999 35:490–497.

Guess JC, McCance DJ. 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. *J Virol.* 2005 Dec; 79(23): 14852-62.

Guo Y, Jacobs SC, Kyprianou N. Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor- β (TGF- β 1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 1997 71, 573–579.

Gupta S, Shang W, Sun Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008 56(2): 85-102.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7; 100(1): 57-70.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol.* 2007 Mar 1; 178(5):3186-97.

Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003 3: 233–42.

Heck DV, Yee CL, Howley PM, Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 May; 89(10): 4442-6.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005 Jun 1;191(11):1796-807.

Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, et al. Foxp3 Transcription-Factor-Dependent and -Independent Regulation of the Regulatory T Cell Transcriptional Signature. *Immunity*. 2007 Nov; 27(5): 786-800.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12; 338(7): 423-8.

Hoffmann C, Stanke J, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother*. 2010 Feb-Mar; 33(2): 136-45.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14; 299(5609): 1057-61.

Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology*. 2010 Jan 20; 7: 11.

Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol*. 2008 Sep; 29(9): 429-35.

Hou F, Ma D, Cui B. Treg cells in different forms of uterine cancer. *Clin Chim Acta*. 2013 Jan 16; 415: 337-40.

Howley P. Papillomaviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 2045-76.

Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res.* 1995 Sep 1; 55(17): 3847-53.

Huang SM, McCance DJ. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol.* 2002 Sep; 76(17): 8710-21.

Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Aug; 127(8): 940-5.

Hubert P, Caberg JH, Gilles C, Bousarghin L, Franzen-Detrooz E, Boniver J, et al. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre) neoplastic lesions. *J Pathol.* 2005 Jul; 206(3): 346-55.

Ibáñez R, Moreno-Crespi J, Sardà M, Autonell J, Fibla M, Gutiérrez C, Lloveras B, Alejo M, Català I, Alameda F, Casas M, Bosch FX, de Sanjosé S. Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2+ (CIN2+) using HPV DNA testing after a diagnosis of atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US) in Catalonia, Spain. *BMC Infect Dis.* 2012 12: 25.

Iellem, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4₊CD25₊ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2001 Sep 17; 194(6): 847-53.

Ikezawa Y, Nakazawa M, Tamura C, Takahashi K, Minami M, Ikezawa Z. Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25₊CD4₊ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci.* 2005 Aug; 39(2): 105-12.

International Agency for Research on Cancer. A reveal of human carcinogenesis. Lyon: IARC. 2012 Vol. 100b.

International Agency for Research on Cancer. Handbooks of cancer prevention: cervix cancer screening. 10th ed. Lyon: IARC; 2005.

International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans: human Papillomaviruses. 90th ed. Lyon: IARC; 2007.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*. 1999 May 1; 162(9): 5317-26.

Jacobs MV, Walboomers JM, van Beek J, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Meijer CJ, et al. A quantitative polymerase chain reaction-enzyme immunoassay for accurate measurements of human papillomavirus type 16 DNA levels in cervical scrapings. *Br J Cancer*. 1999 Sep; 81(1): 114-21.

Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res*. 2009 Sep; 130(3): 286-95.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003 171(12): 6323-7.

Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009 May; 30(5):616-25.

Josefsson A, Livak K, Gyllensten U. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar; 37(3): 490-6.

Kado S, Kawamata Y, Shino Y, Kasai T, Kubota K, Iwasaki H, et al. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. *Gynecol Oncol*. 2001 Apr; 81(1): 47-52.

Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Feb; 7(1): 79-89.

Kasprowicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol*. 2003 Aug 1; 171(3): 1216-23.

Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr; 4(4): 337-42.

Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4+CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006 Apr; 16(2): 124-36.

Kidd JG. The course of virus-induced rabbit papilomas as determined by virus. cells and host. *J Exp Med*. 1938 Mar 31; 67(4): 551-74.

Kim SJ, Im YH, Markowitz SD, Bang YJ. Molecular mechanisms of inactivation of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000 Mar-Jun; 11(1-2): 159-68.

Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol*. 1995 155: 2240-7.

Kirnbauer R. Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology*. 1996 39(1-2): 54-61.

Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ*. 2002 Sep 14; 325(7364): 572.

Kobayashi A, Miaskowski C, Wallhagen M, Smith-McCune K. Recent developments in understanding the immune response to HPV infection and cervical neoplasia. *Oncol Nurs Forum* 2000 27 : 643-53.

Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*. 2008 Sep; 1(5): 412-20.

Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res*. 2004 Sep 15; 64(18): 6766-74.

Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Miura S, et al. The Prevalence of Cervical Regulatory T Cells in HPV-Related Cervical Intraepithelial

Neoplasia (CIN) Correlates Inversely with Spontaneous Regression of CIN. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Feb; 69(2): 134-41.

Konya J, Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res*. 2001 82: 205-38.

Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, Franco E, Lapointe N, Richardson H, et al. Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol*. 2001 Oct; 39(10): 3530-6.

Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008 Jul 15; 168(2): 123-37.

Koss LG, Durfee GR. Cytological changes preceding the appearance of in situ carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*. 1955 Mar-Apr; 8(2):295-301.

Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997 May 5; 102(5A): 3-8.

Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*. 1992 Oct 29; 327(18): 1272-8.

Kramer M, Mollema L, Smits G, Boot H, de Melker H, van der Klis F. Age-specific HPV seroprevalence among young females in The Netherlands. *Sex Transm Infect*. 2010 Dec; 86(7): 494-9.

Krausz LT, Fischer-Fodor E, Major ZZ, Fetica B. GITR-expressing regulatory T-cell subsets are increased in tumor-positive lymph nodes from advanced breast cancer patients as compared to tumor-negative lymph nodes. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012 25: 59-66.

Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol*. 2005 23: 877-900.

Kroupis C, Thomopoulou G, Papathomas TG, Vourlidis N, Lazaris AC. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Athens, Greece. *Epidemiol Infect.* 2007 Aug; 135(6): 943-50.

Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* 2012 Sep 3; 10: 183.

Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol.* 2000 Aug;12(8):1145-55.

Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med.* 2005 Apr 4; 201(7): 1037-44.

Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K, et al. Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *APMIS.* 1993 Nov; 101(11): 833-7.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol.* 1998 16: 137-61.

Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011 Feb 15; 128(4): 927-35.

Licht D. Ansteckungsfähigkeit der wrzen. *Ugesk f laeger* 1984 1-368.

Lie AK, Skjeldestad FE, Hagen B, Johannessen E, Skarsvåg S, Haugen OA. Comparison of light microscopy, in situ hybridization and polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus in histological tissue of cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS.* 1997 Feb; 105(2): 115-20.

Likuni N, Lourenço EV, Hahn BH, La Cava A. Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2009 Aug 1; 183(3): 1518-22.

Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, et al. Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human

papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010 Nov; 11(11): 1048-56.

Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013 6(2): 116-123.

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002 Sep 1; 169(5): 2756-61.

Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, Nagorsen D, Baron U, Olek S, et al. Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci.* 2009 100: 1112-7.

Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, Zafrani B, de la Rochefordière A, Clough K, et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Aug; 16(8): 2613-9.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006 May; 116(5): 1167-73.

Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998 (23): 27-30.

Lu L, Werneck MB, Cantor H. The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol Rev.* 2006 Aug; 212: 51-9.

Lungu O, Wright TC Jr, Silverstein S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes.* 1992 Apr; 6(2): 145-52.

MacEwan DJ. TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *Br J Pharmacol.* 2002 Feb; 135(4): 855-75.

Malchow S, Leventhal DS, Nishi S, Fischer BI, Shen L, Paner GP, et al. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science.* 2013 Mar 8; 339 (6124): 1219-24.

Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002 17: 167–178.

Manos MM, Waldman J, Zhang TY, Greer CE, Eichinger G, Schiffman MH, et al. Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *J Infect Dis*. 1994 Nov; 170(5): 1096-9.

Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, O'Brien PM, Campo MS. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Oncogene*. 2002 Nov 7; 21(51): 7808-16.

Marsh MR. Papilloma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 1952 Aug; 64(2): 281-91.

Matikainen S, Paananen A, Miettinen M, Kurimoto M, Timonen T, Julkunen I et al. INF-alpha and IL-18 synergistically enhance INF-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat 4 activation and INF-gamma gene expression by INF-alpha and IL-12. *Eur J Immunol*. 2001 Jul; 31(7): 2236-45.

Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med*. 1994 180: 2371-6.

Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol*. 2003 Aug; 77(15): 8378-85.

McCance DJ. Human Papillomaviruses. *Infect Dis Clin North Am*. 1994 Dec; 8(4): 751-67.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002 Feb; 16(2): 311-23.

Melief CJ, Van Der Burg SH, Toes RE, Ossendorp F, Offringa R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev.* 2002 Oct; 188: 177-82.

Melnick JL. Papova virus group. *Science.* 1962 Mar;135(3509): 1128-30.

Merikukka M, Kaasila M, Namujju PB, Palmroth J, Kirnbauer R, Paavonen J, et al. Differences in incidence and co-occurrence of vaccine and nonvaccine human papillomavirus types in Finnish population before human papillomavirus mass vaccination suggest competitive advantage for HPV33. *Int J Cancer.* 2011 Mar 1; 128(5): 1114-9.

Meyer T, Arndt R, Stockfleth E, Flammann HT, Wolf H, Reischl U. Strategy for typing human papillomaviruses by RFLP analysis of PCR products and subsequent hybridization with generic probe. *Biotechniques.* 1995 Oct; 19(4): 632-9.

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003 Oct; 77(19): 10186-201.

Mittl PR, Priestle JP, Cox DA, McMaster G, Cerletti N, Grütter MG. The crystal structure Protein Sci. 1996 Jul; 5(7): 1261-71.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002 Feb; 16(2): 219-30.

Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 2005 92: 891–4.

Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer.* 2002 Jul 29; 87(3): 324-33.

Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, et al. CD4+ CD25high regulatory T cell frequency correlates with persistence of human

papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15; 121(8): 1749-55.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993 11: 165-90.

Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. 1990 Jun 8;248(4960):1230-4.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001 19: 683-765.

Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*. 2005 Jan; 66(1): 13-20.

Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EM, et al. Regression of low-grade squamous intraepithelial lesions in young women. *Lancet*. 2004 364: 678-83.

Moscicki AB, Ellenberg JH, Vermund SH, Holland CA, Darragh T, Crowley-Nowick PA, et al. Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls: impact of infection with human immunodeficiency virus. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000 Feb; 154(2): 127-34.

Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31; 24 Suppl 3: S3/42-51.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989 7: 145-73.

Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr; 116(1): 33-40.

Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001 Nov 26; 20(54): 7888-98.

Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002 Nov; 89(2): 213-28.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6; 348(6): 518-27.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, et al. The casual link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992 Nov 11; 52(5): 743-9.

Muñoz N, Bosch FX. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. *Bull Pan Am Health Organ.* 1996 Dec; 30(4): 362-77.

Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004 Dec 15; 190(12): 2077-87.

Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology.* *J Clin Virol.* 2000 Oct; 19(1-2): 1-5.

Nakagawa M, Stites DP, Farhat S, Sisler JR, Moss B, Kong F, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis.* 1997 175: 927–931.

Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 2007 Jun; 98(6): 874-81.

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes down regulate expression of interferon-responsive genes and up regulate proliferation associated and NF-kappa B-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001 May; 75(9): 4283-96.

Negrini S, Fenoglio D, Balestra P, Fravega M, Filaci G, Indiveri F. Endocrine regulation of suppressor lymphocytes: role of the glucocorticoid-induced TNF-like receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jun; 1069: 377-85.

Nobre RJ, Almeida LP, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol.* 2008 42 (1): 13-21.

Nobre RJ, Cruz E, Real O, de Almeida LP, Martins TC. Characterization of common and rare human papillomaviruses in Portuguese women by the polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism and sequencing. *J Med Virol.* 2010 May; 82(6): 1024-32.

Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10; 94(12): 6216-21.

Nocentini G, Riccardi C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol.* 2005 Apr; 35(4): 1016-22.

North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2-suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med.* 1984 159(5): 1295-311.

O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res.* 2002 Sep; 88(1-2):103-17.

O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res.* 2002 Sep; 88(1-2): 103-17.

Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 2010 32:95-106.

Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2012 Apr; 71 Suppl 2: i96-100.

Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999 Jul 1; 59(13): 3128-33.

Onno JB, Van Der Loos CM, Teeling P, Van Der Wal AC, Teunissen MBM. Immunohistochemical Analysis of Regulatory T Cell Markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T Cells in Normal Skin and Inflammatory Dermatoses. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2007 v. 55(9): 891-898.

Oriel JD. Natural history of genital warts. *The British Journal of Venereal Diseases.* Br J Vener Dis. 1971 Feb; 47(1): 1-13.

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005 65(6): 2457-64.

Parish WE. A transmissible genital papilloma of the pig resembling condylomata acuminatum of man. *J Pathol Bacteriol.* 1961 Apr; 81: 331-45.

Payan, C. et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples using a general realtime PCR on Mx4000 and Lightcycler systems. *J Clin Microbiol.* 2007 45(3): 897-901.

Pedroza-Gonzalez A, Verhoef C, Ijzermans JN, Peppelenbosch MP, Kwekkeboom J, Verheij J, et al. Activated tumor-infiltrating CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer. *Hepatology.* 2013 Jan; 57(1): 183-94.

Peh WL, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, et al. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol.* 2002 Oct; 76(20): 10401-16.

Pennie WD, Grindlay GJ, Cairney M, Campo MS. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology.* 1993 Apr; 193(2): 614-20.

Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine.* 2008 43(3): 395-401;

Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, et al. High number of intraepithelial CD8+tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* 2007 Jan 1; 67(1): 354-61.

Plett-Torres T, Cruz-Valdez A, Esquivel-Guadarrama F, Hernández-Nevarez P, Lazcano-Ponce E, Gutiérrez-Xicotencatl L. Frequency of antibodies against E4 and E7 from human papillomavirus type 16 in Mexican soldiers. *Arch Virol.* 2007 Jan; 152(1): 97-114.

Qin HY, Mukherjee R, Lee-Chan E, Ewen C, Bleackley RC, Singh B. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol.* 2006 Jul; 18(7): 1001-15.

Ramael M, Van Steelandt H, Stuyven G, Van Steenkiste M, Degroote J. Detection of human papilloma virus (HPV) genomes by the primed in situ (PRINS) labelling technique. *Pathol Res Pract.* 1999 195(12): 801-7.

Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, et al. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis.* 2010 Nov 11; 10: 326.

Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol.* 2005 Feb 1; 174(3): 1446-55.

Ressing ME, van Driel WJ, Brandt RM, Kenter GG, de Jong JH, Bauknecht T, et al. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother.* 2000 Mar-Apr; 23(2): 255-66.

Richart RM. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 1987 Oct 15; 60(8 Suppl): 1951-9.

Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jan; 82(1): 119-23.

Rolón PA, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer*. 2000 Feb 15; 85(4): 486-91.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006 Aug; 212: 28-50.

Ronchetti S, Nocentini G, Riccardi C, Pandolfi PP. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 2002 100:350-2.

Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzeti MC, Silva FR, Silva BR. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad Saúde Pública*. 2009 May; 25(5).

Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev*. 2006 Aug; 212: 272-86.

Rowson KE, Mahy BW. Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev*. 1967 Jun; 31(2): 110-31.

Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev*. 2011 241: 260-268.

Rulison RH, Wart SA. Statistical study of nine hundred and twenty one cases. *Arch Derm Syphilol*. 1942; 46(1): 66-81.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant selftolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006 Aug; 212: 8-27.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004 22: 531–62.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. *Nat Immunol*. 2005 6(4): 345-52.

Sakaguchi S. Regulatory T cells. *Springer Semin Immunopathol*. 2006 28(1): 1-2.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1; 155(3): 1151-64.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000 May 26; 101(5): 455-8.

Saleh DS, Fadhil HY, Al-Hamdani FG. Screening for High-Risk Human Papillomavirus by Real-Time PCR and Its Association with Cytological Abnormalities of Pap Smears in Baghdad. *International Journal of Microbiology Research*. , 2012 4(9): 332-5.

Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, et al. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol*. 2005 Oct 1; 162(7): 668-75.

Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002 May; 16(3): 231-40.

Santiago E, Camacho L, Junquera ML, Vázquez F. Full HPV typing by a single restriction enzyme. *J Clin Virol*. 2006 Sep; 37(1): 38-46.

Sapp M, Day PM. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*. 2009 Feb 20; 384(2): 400-9.

Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Supryn timer F, Schlegel R, Grinstein S. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol*. 2000 Jan 24; 148(2): 305-15.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990 Dec 21; 63(6): 1129-36.

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Sep-Oct; 15(5): 727-46.

Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003 (31): 14-9.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Scott DR, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993 85(12): 958-64.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 370(9590): 890-907.

Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*. 1995 Nov 15; 76(10 Suppl): 1888-901.

Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell Activation. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5; 276(40): 37672-9.

Scott ME, Ma Y, Kuzmich L, Moscicki AB. Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. *Int J Cancer*. 2009; 124(6): 1379-83.

Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Sep; 6(5): 751-5.

Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*. 2001 55: 255-81.

Serra A. Ricerche istologiche e sperimentali sul condiloma acuminato, i papil-lomi del capo e la verruca volgare. *Gior Ital Mai Ven*. 1908 49: 11.

Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Delovitch TL. Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med (Berl)*. 2002 May; 80(5): 290-300.

Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, Stoppler MC, Koval D, Schlegel R. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology*. 1997 Oct 27; 237(2): 296-306.

Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001 167 : 2972-8.

Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2000 18: 423-49.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological selftolerance. *Nat Immunol* 2002 3:135–42.

Shope RE, Hurstn W. Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med*. 1933 Oct 31; 58(5): 607–24.

Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory Tcell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008 124(1): 13-22.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. Forum Group Members; Bethesda 2001Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 Apr 24; 287(16): 2114-9.

Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*. 2010 Oct; 5(19): 1-6.

Stanley MA, Browne HM, Appleby M, Minson AC. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer*. 1989 Apr 15; 43(4): 672-6.

Steller MA, Schiller JT. Human papillomavirus immunology and vaccine prospects. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1996 (21): 145-8.

Stern PL, Brown M, Stacey SN, Kitchener HC, Hampson I, Abdel-Hady ES, et al. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol*. 2000 Oct; 19(1-2): 57-66.

Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug; 127(8): 935-9.

Stoler MH. Human Papillomaviruses and Cervical Neoplasia: A Model For Carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol*. 2000 Jan; 19(1): 16-28.

Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. Crystalline virus like particles from skin papilomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949 Oct; 72(1): 46-50.

Suran RR, Meister PC. Papilloma of the cervix uterine in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1948 Feb; 55(2): 342-5.

Swan DC, Tucker RA, Holloway BP, Icenogle JP. A sensitive, type-specific, fluorogenic probe assay for detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol.* 1997 Apr; 35(4): 886-91.

Swygart C. Human papillomavirus: disease and laboratory diagnosis. *Br J Biomed Sci.* 1997 Dec; 54(4): 299-303.

Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology.* 2006 May; 118(1): 1-9.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+) CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000 Jul 17; 192(2): 303-10.

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008 9(3): 239-44.

Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 1993 Jan 7; 361(6407): 82-5.

Tarkowski TA, Koumans EH, Sawyer M, Pierce A, Black CM, Papp JR, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J Infect Dis.* 2004 Jan 1; 189(1): 46-50.

Thomas KK, Hughes JP, Kuypers JM, Kiviat NB, Lee SK, Adam DE, et al. Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis.* 2000 Oct; 182(4): 1097-102.

Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998 188:287–296.

Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2010 184: 3433-3441.

Tian Y, Yuan C, Ma D, Zhang Y, Liu Y, Zhang W, et al. IL-21 and IL-12 inhibit differentiation of Treg and TH17 cells and enhance cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in patients with cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Dec; 21(9): 1672-8.

Tindle RW, Frazer IH. Immune response to human papillomaviruses and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994 186: 217-53.

Torgerson TR, Ochs HD. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7(6): 515-21.

Tozetti IA, Scapulatempo IDL, Levi JE, Ferreira AW. Determination of HPV DNA viral load by hybrid capture assay and its association with cytological findings. *J. Bras. Patol. Med*. 2006b Dec; 42 (6): 449-453.

Tozetti IA, Scapulatempo ID, Kawski VL, Ferreira AW, Levi JE. Multiple types of human papillomavirus in women in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2006a Oct; 10(5): 309-10.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jul; 15(7): 1274-80.

Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW: Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type β transforming growth factor. *Science* 1984, 226: 705–07.

Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, et al. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25⁺ and CD25-CD4⁺ glucocorticoid-induced TNF receptor family- related gene⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 171: 708–16.

Vaccarella S, Franceschi S, Snijders PJ, Herrero R, Meijer CJ, Plummer M. IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Feb; 19(2): 503-10.

Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4⁺CD25⁻ lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res*. 2006 66(8): 4488-95.

Van Den Brule AJ, Walboomers JM, Du Maine M, Kenemans P, Meijer CJ. Difference in prevalence of human papillomavirus genotype in cytomorphologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 1991 May 30; 48(3): 404-8.

van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, van den Hende M, et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4⁺ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 17; 104(29): 12087-92.

van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: An indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer*. 2002 Apr 1; 98(4): 590-5.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul; 8(7): 523-32.

Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavírus. In: Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 51-58.

Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*. 1996 Jul 5; 273(5271): 104-6.

Virchow RLK. *Patologie des tumeurs*. Paris: Germer Baillière, 1867. p. 338-343.

Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol*. 2007 Nov; 150(2): 199-209.

von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005 Apr; 6(4): 338-44.

Waelsch L. Übertragungsversuche mit spitzem, kondylom. *Arch F Derm Syphilol*. 1918 124: 625-46.

Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstetrics and Gynecology*. 1984 Dec; 64(6): 767-72.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan; 10(1): 45-65.

Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003 May; 18(5): 605-17.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep; 189(1): 12-9.

Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺ CD25[−] T cells. *J Clin Invest*. 2003 Nov; 112(9): 1437-43.

Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Jan; 37(1): 129-38.

Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003 (31): 35-40.

Wheeler CM, Greer CE, Becker TM, Hunt WC, Anderson SM, Manos MM. Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol*. 1996 88: 261–8.

Wile UJ, Kingery LB. The etiology of molluscum contagiosum. *J Cut Dis.* 1919 37: 431.

Windsor WT, Syto R, Tsarbopoulos A, Zhang R, Durkin J, Baldwin S, et al. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry.* 1993 Aug 31; 32(34): 8807-15.

Wolfe SA. Papilloma of the cervix, associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1950 Aug; 60 (2): 448-51.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001 61(12): 4766-72.

Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007 Jan; 7(1): 11-22.

Woodworth CD, Lichti U, Simpson S, Evans CH, DiPaolo JA. Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. *Cancer Res.* 1992 Jan 15; 52(2): 456-63.

World Health Organization [homepage na internet]. Human papillomavirus infection and cervical cancer, 2009b. [acesso em 10 ago 2009]. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/

World Health Organization. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. 2007. [Acesso em: 21 ago. 2009]. Disponível em <<http://www.who.int/hpvcentre>>.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC). The Globocan Project. Cervical cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008. [acesso em: 14/08/2012]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>

World Health Organization. Meeting of the immunization strategic advisory group of experts, November 2008-conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009 Jan 9; 84(1-2): 1-16.

World Health Organization/ICO Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Summary Report 2010. [acesso em: 20 jul. 2010]. Disponível em: www.who.int/hpvcentre

Wu Z, Xu Y. IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances IL-2 and IL-15 anti-tumor action through NK and CD8+ T cells proliferation and activation. *J Mol Cell Biol.* 2010 2: 217-22.

Xu XC, Mitchell MF, Silva E, Jetten A, Lotan R. Decreased expression of retinoic acid receptors, transforming growth factor beta, involucrin, and cornifin in cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun; 5(6): 1503-8.

Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med.* 2012 209: 1713-22.

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004 Nov; 16(11): 1643-56.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 2007 27: 145-159.

Yan M, Peng J, Jabbar IA, Liu X, Filgueira L, Frazer IH, et al. Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NF-kappaB-mediated signalling, moderated by TGF-beta. *Immunol Cell Biol.* 2005 Feb; 83(1): 83-91.

Yang R, Murillo FM, Cui H, Blosser R, Uematsu S, Takeda K, et al. Papillomaviruslike particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol.* 2004 Oct; 78(20): 11152-60.

Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sörensen P, Frisch M, Andersen PK, et al. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2000a Nov 1; 60(21): 6027-32.

Ylitalo N, Sørensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Pontén J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: A nested case–control study. *Lancet*. 2000b Jun 24; 355(9222): 2194-8.

Yoshimura T, Leonard EJ. Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol*. 1990 Jul 1;145(1):292-7.

Younes A, Kadin ME. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15; 21(18): 3526-34.

Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*. 2005 Mar 7; 201(5): 779-91.

Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation*. 2012 Dec; 35(6): 1773-80.

Zdanov A. Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Curr Pharm Des*. 2004 10(31): 3873-84.

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 2003 May 25; 310(1): 100-8.

Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*. 1999 263: 388–94.

Zhang Y, Ma D, Zhang Y, Tian Y, Wang X, Qiao Y, et al. The imbalance of Th17/Treg in patients with uterine cervical cancer. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12; 412(11-12): 894-900.

Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med*. 2000 6: 782–9.

Zhao DM, Thornton AM, Dipaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006 107: 3925–3932.

Zheng SG. Emerging topics and new perspectives on regulatory and effector T cells. *J Mol Cell Biol*. 2012 Feb; 4(1): 1-2.

Zhou X, Kong N, Zou H, Brand D, Li X, Liu Z, et al. Therapeutic potential of TGF- β -induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2011 44: 43-50.

Zhou X, Wang J, Shi W, Brand DD, Liu Z, Fan H, et al. Isolation of purified and live Foxp3+ regulatory T cells using FACS sorting on scatter plot. *J Mol Cell Biol*. 2010 2: 164-169.

Ziegler SF. FOXP3: Not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol*. 2007 Jan; 37(1): 21-3.

Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006 24: 209-26.

zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomavirus. *Annual Review of Microbiology*. 1994 48: 427-447.

zur Hausen H, Menhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*. 1974 13(5): 650-6.

zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*. 1976 Feb; 36(2 pt 2): 794.

zur Hausen H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cells carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1977 78: 1-30.

zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May; 2(5): 342-50.

zur Hausen H. Human genital cancer: synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet*. 1982 Dec 18; 2(8312): 1370-2.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

ESTUDO:

“DETECÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM PACIENTES HPV INFECTADAS”

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____ (SOMENTE AS INICIAIS)

abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo **“DETECÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM PACIENTES HPV INFECTADAS”**.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I. O estudo se faz necessário para o melhor entendimento dos processos patológicos associados à persistência ou regressão da infecção pelo HPV, com o objetivo de prevenir de forma mais eficaz o câncer cervical.
- II. Após o meu consentimento serão utilizados para a pesquisa os resultados dos exames histopatológicos e os de detecção para HPV.
- III. Após o meu consentimento, autorizo a utilização do material de biópsia emblocado em parafina para pesquisas complementares futuras.
- IV. Caso seja de seu interesse poderá receber os resultados da análise e ser encaminhada.
- V. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI. A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII. Os resultados obtidos durante este trabalho serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII. Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Campo Grande, de de 2010

() Paciente _____

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto:

Profa. MSc Cacilda Tezelli Junqueira Padovani

Telefone para contato: Laboratório de Imunologia – CCBS - UFMS
Tel: 3457388

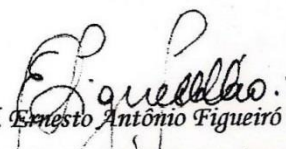
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO nº 1628



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

*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 1628 da Pesquisadora Inês Aparecida Tozetti intitulado "Detecção de células T regulatórias em pacientes infectadas pelo papilomavírus humano (HPV)" e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 20 de maio de 2010, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Ernesto Antônio Figueiró Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 21 de maio de 2010.

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

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO

Major Article

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(3):288-292, May-Jun, 2013
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0029-2013>



Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor expression in patients with cervical human papillomavirus infection

Cacilda Tezelli Junqueira Padovani^[1], Camila Mareti Bonin^[2], Inês Aparecida Tozetti^[3],
 Alda Maria Teixeira Ferreira^[2], Carlos Eurico dos Santos Fernandes^[2]
 and Izaías Pereira da Costa^[1]

[1]. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. [2]. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. [3]. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

ABSTRACT

Introduction: The progression of human papillomavirus (HPV) infection in the anogenital tract has been associated with the involvement of cells with regulatory properties. Evidence has shown that glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR) is an important surface molecule for the characterization of these cells and proposes that GITR ligand may constitute a rational treatment for many cancer types. We aimed to detect the presence of GITR and CD25 in cervical stroma cells with and without pathological changes or HPV infection to better understand the immune response in the infected tissue microenvironment. **Methods:** We subjected 49 paraffin-embedded cervical tissue samples to HPV DNA detection and histopathological analysis, and subsequently immunohistochemistry to detect GITR and CD25 in lymphocytes. **Results:** We observed that 76.9% of all samples with high GITR expression were HPV-positive regardless of histopathological findings. High GITR expression (77.8%) was predominant in samples with $\geq 1,000$ RLU/PCB. Of the HPV-positive samples negative for intraepithelial lesion and malignancy, 62.5% had high GITR expression. High GITR expression was observed in both carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) samples ($p = 0.16$). CD25 was present in great quantities in all samples. **Conclusions:** The predominance of high GITR expression in samples with high viral load that were classified as HSIL and carcinoma suggests that GITR⁺ cells can exhibit regulatory properties and may contribute to the progression of HPV-induced cervical neoplasia, emphasizing the importance of GITR as a potential target for immune therapy of cervical cancer and as a disease evolution biomarker.

Keywords: Human papillomavirus. Immune response. Immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) infects the basal and parabasal cells of squamous epithelium in the female anogenital tract, and HPV types 16, 18, 31, 33, and 45 in particular are believed to put patients at high risk for the development of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical carcinoma¹.

Infection progression has been associated with several factors, including the persistence of HPV, the presence of high-risk oncogenic HPV types, high viral load, integration of viral DNA, and E6 and E7 viral oncoprotein activity¹. Evidence shows that regulatory T cells (T_{reg}) are also involved in the progression to cervical neoplasia in HPV-infected patients²⁻⁵. HPV-specific CD4⁺ regulatory cells isolated from lymph node

biopsies of patients with cervical carcinoma were found to suppress proliferation and cytokine (interferon- γ , interleukin [IL]-2) production by responder T cells⁶.

T_{reg} cells play a crucial role in modulating the elimination of pathogens and tumor antigens and perform their function through immunosuppressive cytokine production and immunosuppression induction mediated by cell-to-cell contact, having the ability to suppress the activation, proliferation, and effector function of different cell types contributing to the immune response^{6,7}. T_{reg} cells are subdivided into several subpopulations, one being the natural T_{reg} cells (CD4⁺CD25⁺T_{reg}), which numerically represent the largest group of cells with suppressor activity⁸.

Studies show that T_{reg} cells are activated with greater sensitivity than naïve effector T cells after antigenic stimulation, which has been attributed mainly to their *semi-activated* state that is thought to be due to the increased expression of CD25 (α -chain of the IL-2 receptor), glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR) markers, and others⁹⁻¹¹.

The detection of T_{reg} cells has been challenging owing to the lack of exclusive surface molecules for these cells. Studies have shown that the presence of transcription factor

Address to: Dra. Inês Aparecida Tozetti, FM/UFMS. Caixa Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil.

Phone: 55 67 3345-7387

e-mail: ines.tozetti@ufms.br

Received 7 February 2013

Accepted 4 June 2013

FOXP3 (*forkhead box p3*) is highly specific and that its transduction into naïve T cells increases the molecular expression associated with T_{reg} cells, such as that of CD25 and GTR^{12,13}.

Evidence shows that another characteristic surface molecule of cells with regulatory properties, T_{reg} cells in particular, is the GTR¹⁴ — a tumor necrosis factor receptor superfamily member — which is predominantly expressed in CD25⁺ CD4⁺ T_{reg} cells and plays an important role in the regulation of mucosal immune responses¹⁵⁻¹⁹. Recent studies have demonstrated that *in vivo* GTR ligation using an agonist anti-GTR monoclonal antibody, DTA-1, can augment anti-tumor T-cell responses by modulating T_{reg} cells, which makes targeting GTR a potential immunotherapeutic approach to cancer treatment²⁰⁻²².

Given the findings that indicate the involvement of cells with regulatory properties, especially T_{reg} cells, in the progression of cervical malignant lesions^{3,4,23,24}, this study aimed to detect both CD25 and GTR markers in lymphocytes of cervical stroma to better understand the immune response in the microenvironment of HPV infection, which may shed light on novel therapeutic interventions against intraepithelial neoplasia and cervical cancer of viral etiology, and perhaps also make GTR a possible candidate biomarker for disease evolution.

METHODS

Samples

Forty-nine patient cervical samples embedded in paraffin and selected on a non-probabilistic form by convenience sampling from 2000 to 2002 in the Cancer Prevention Center of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, were used. These samples previously underwent a Hybrid Capture II reaction (Digene, Gaithersburg, MD, USA) to quantify the viral load for group B - high oncogenic risk types that were classified into scores from 0 to 3: 0 (HPV-negative samples); 1 (1 to < 100U of light released for probe; relative light units/positive control to group B (RLU/PCB)); 2 (100 to <1,000 RLU/PCB); and 3 (≥1,000 RLU/PCB). On the basis of histopathological analysis, the samples were classified as low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) (CIN I); high-grade squamous intraepithelial lesions; (HSIL) (CIN II, III); carcinoma, and negative for intraepithelial lesion and malignancy (NILM).

Immunohistochemistry of CD25 and GTR

The Immunohistochemistry (IHC) reaction was developed using antigen retrieval with wet heat and 0.05M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8.0 for the detection of CD25 marker²⁵ and 10mM Tris and 1mM EDTA for the GTR marker. The primary antibodies used included anti-human IL-2R (eBioscience®, San Diego, CA, USA; clone B-B10/cod.BMS134) and anti-GTR (R&D systems®, Minneapolis, MN, USA; goat IgG/cod.AF689).

The detection system was a Universal LSAB + Kit/HRP (Dako®, Carpinteria, CA, USA), and diaminobenzidine (Dako®) was used as a chromogen. Counterstaining was performed in hematoxylin, and the slides were observed under common optical microscopy with 10× and 40× objective lenses. Samples

showing brown staining on characteristic cells were considered positive. Human tonsil tissue was used as the external control of the reaction over which the primary antibody (positive control) and phosphate buffer pH 7.4 containing 1% albumin (negative control) was applied.

Quantitative analysis

According to the presence of immunomarked cells, the histological sections were classified in low (small quantities) and high (large quantities) scores. The slides were analyzed by 2 independent observers, previously calibrated ($\kappa = 0.98$), and the final result of discordant cases was obtained by common analysis to produce a consensus.

Statistical analysis

Analysis of the frequencies among the histopathological findings and viral load according to GTR expression intensity were compared using Fisher's exact test.

Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocol number 975, July 31, 2007.

RESULTS

We observed a predominance of GTR in large quantities (7/9; 77.8%) in the samples with ≥1,000 RLU/PCB (viral load 3), although increases in viral load did not have a statistical correlation with high GTR expression ($p=0.40$). Regardless of histopathological findings, among all samples with high GTR expression, 76.9% (20/26) were HPV-positive (viral load, 1-3). Among the NILM samples, 40% (8/20) were HPV-positive (viral load, 1-3) and 62.5% (5/8) of these showed high GTR expression, while among NILM-HPV negative samples (viral load, 0), only 33.3% (4/12) showed high GTR expression (Table 1).

A frequency analysis of the histopathological findings according to GTR expression intensity is shown in Table 2. High GTR expression was predominant in the carcinoma and HSIL samples ($p = 0.16$) (Figure 1).

All samples showed intense staining for CD25 regardless of the result of viral load or histopathological findings (Figure 2).

DISCUSSION

In the present study, we observed that among the high GTR expression samples 76.9% were HPV-positive and 23.1% were HPV-negative. The expression of this marker was predominant in samples with high viral load as well as high-grade lesions and carcinoma.

A number of surface and secreted molecules have been associated with T_{reg}, and GTR has been recognized as CD4⁺ T_{reg} markers in mice and humans^{22,26,27}. In this context, it is of interest that GTR⁺ T_{reg} cells might be involved in the failure of

TABLE 1 - Distribution of histopathological findings according to viral load and GTR expression (n=49).

Table 1. Distribution of HPV genotypes according to viral load and GTR expression (n = 49).									
Viral load	NILM		LSIL		HSIL		CA		Total
	GTR		GTR		GTR		GTR		
	low	high	low	high	low	high	low	high	
0	8	4	0	0	0	1	0	1	14
1	1	2	5	2	3	4	1	1	19
2	1	1	0	0	2	2	0	1	7
3	1	2	1	1	0	1	0	3	9
Total	11	9	6	3	5	8	1	6	49

GTR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor; NILM: negative for intraepithelial lesion and malignancy; LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high grade squamous intraepithelial lesion; CA: carcinoma. Viral load - 0 (negative); 1 (1 to < 100 RLU/PCB); 2 (100 to < 1,000 RLU/PCB); 3 ($\geq$ 1,000 RLU/PCB); RLU/PCB: relative light unit/positive controls to group B; GTR - low: small quantities of immunomarked cells; GTR - high: large quantities of immunomarked cells.

TABLE 2 - Frequency of histopathological findings according to the intensity of GTR expression.

GTR	Histopathological (n/%)							
	NILM		LSIL		HSIL		CA	
	n	%	n	%	n	%	n	%
low	11	55.0	6	66.7	5	38.5	1	14.3
high	9	45.0	3	33.3	8	61.5	6	85.7
Total	20	100.0	9	100.0	13	100.0	7	100.0

GTR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor; NILM: negative for intraepithelial lesion and malignancy; LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high grade squamous intraepithelial lesion; CA: carcinoma. GTR - low: small quantities of immunomarked cells; GTR - high: large quantities of immunomarked cells. (p=0.16).

the immune system to control the development of HPV-induced cancer. Studies have demonstrated increased frequencies and suppressive activity of T_{reg} cells in patients with high-grade lesions and cervical cancer. In addition, compared to colorectal cancer, skin melanoma, and bronchial carcinoma, HPV-derived CIN lesions and cervical carcinomas have higher numbers of T_{reg} cells^{23,24}.

One study that investigated the influence of tumor-infiltrating T_{reg} cells on tumor-specific T cell responses found that T_{reg} cells in patients with liver cancer upregulated GTR expression compared with T_{reg} cells in tumor-free liver tissue and blood²⁸. Another study identified increased numbers of T_{reg} GTR⁺ cells in tumor-positive lymph nodes compared with tumor-negative nodes in the same patient²⁹. Both studies propose that GTR ligand could be a promising treatment for cancer and that GTR and GTR ligand are good candidates for disease evolution biomarkers.

Studies investigating the natural history of HPV infection have shown that viral clearance may vary from 4-16 months according to the virus' oncogenicity³⁰⁻³². However, it has been observed that persistent infection with a higher likelihood of progression to high-grade lesions and invasive carcinoma can occur in the face of an ineffective immune response. In this context and considering that HPV infection is restricted to epithelial cells, the importance of the local immune response is highlighted,

making the components present in the microenvironment crucial for lesion development or regression³³⁻³⁶. The role of GTR has been unclear until now, emphasizing the importance of the present study to clarify the immune response in the cervical microenvironment.

The presence of high GTR and CD25 expression levels found in HPV-derived CIN lesions and cervical carcinomas indicates that these cells may play an important role in the downregulation of immune responses³⁷. A strong association between these markers and T_{reg} cells was demonstrated in a study that found GTR expression in only those cells that also expressed CD4 and CD25, and most of them co-expressed FOXP3³⁸. The association of GTR and CD25 with negatively regulated T helper-activated lymphocytes has been demonstrated in experiment with C57BL/6 GTR^{+/+} mice (wild type), which showed decreased IL-2 expression compared to C57BL/6 GTR^{-/-}³⁹.

The relevance of cells expressing the studied markers in immune response suppression is emphasized by studies that evaluate in vitro regulatory activity through cytokine expression by CD4⁺ T cells, CD4⁺CD25⁺GTR⁺ cells, and CD4⁺CD25⁺GTR⁺ cells. These studies showed that the first produced cytokines that activated the immune response and the last 2 increased immunosuppressive cytokine levels^{15,17}.

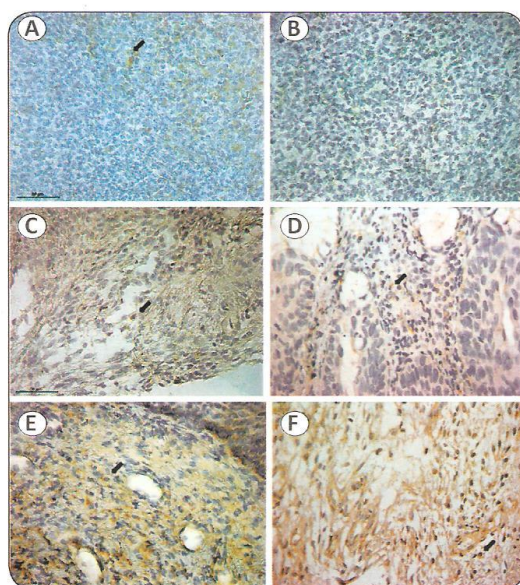


FIGURE 1 - GITR expression in HPV positive cervical lesions. a: positive control human tonsil stained with anti-human GITR antibody; b: negative control human tonsil - omitting primary antibody, showed no staining; c: CIN II and d: NILM, with GITR expressing cells in small quantities; e: CIN III and f: CIN I, with GITR expressing cells in large quantities. All figures are presented in the same magnification (400X). Black arrows indicate positive-staining cells with anti-human GITR antibody. GITR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor; HPV: human papillomavirus; CIN: cervical intraepithelial neoplasia.

It is unclear whether increased frequencies of regulatory cells are a cause or consequence of high viral load and chronic infection^{2,40,41}. The predominant expression of GITR in samples with high viral load and classified as HSIL and carcinoma in this study suggest that GITR⁺ cells can exhibit regulatory properties. The lack of a correlation between GITR and viral load or GITR and histopathological findings can be explained by the small sample size. Additional studies are required to confirm these observations.

Further longitudinal studies are required to assess the true association between HPV persistence and immunoregulatory cell involvement in lesion progression and the development of neoplasia. Studies have demonstrated increased frequencies and suppressive activity of T_{reg} cells in HPV-infected patients with cervical cancer and its precursor lesions (CIN) and suggest that T_{reg} cells may be a potential marker of cervical disease persistence. One longitudinal analysis of T_{reg} cell frequencies showed a modest decline 1 year after curative surgery or chemoradiation^{3,4}.

Finally, on the basis of the finding that GITR configures a surface molecule characteristic of cells with a regulatory profile, our results suggest that GITR⁺ cells may play a role in the development of a favorable microenvironment for the progression of HPV-induced cervical neoplasia that omits proper activation of the immune response for antigen elimination. Additional studies have been made by the same group including the characterization of FOXP3⁺/CD25⁺, CD4⁺/transforming growth factor- β and IL-10 - secreting cells in HPV-infected samples by using IHC to help elucidate the role of T_{reg} cells in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer (manuscript in preparation).

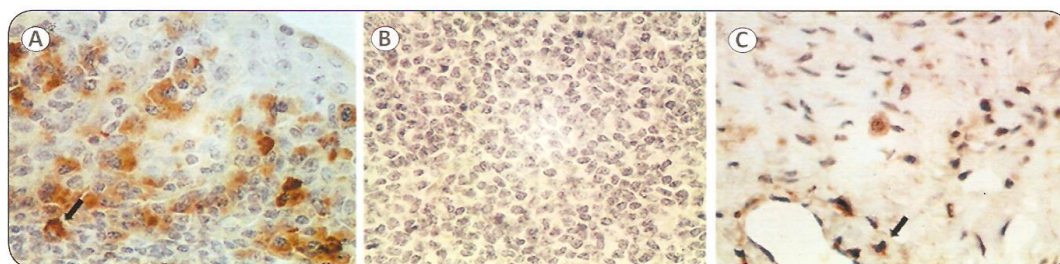


FIGURE 2 - CD25 expression in HPV positive cervical lesions. A: Positive control human tonsil stained with anti-human IL-2R antibody; B: negative control human tonsil - omitting primary antibody, showed no staining; C: CIN II, with CD25 expressing cells in large quantities. All figures are presented in the same magnification (400X). Black arrows indicate positive-staining cells with anti-human IL-2R antibody. HPV: human papillomavirus; IL-2R: IL-2 receptor; CD25: α -chain of the IL-2 receptor.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino.

Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. International Agency for Research Cancer (IARC). Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC monographs on

- the evaluation of carcinogenic risk to humans. Human Papillomaviruses. Lyon: IARC Monographs; 2007.
2. Molling JW, Gruijil TD, Glin J, Moreno M, Rozedaal L, Meijer CJLM, et al. CD4+CD25high regulatory T cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2007; 121:1749-1755.
 3. Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, Van Baarle D, Schuurin E, et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre) malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:199-209.
 4. Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60:55-65.
 5. Van der Burg SH, Piersma SJ, Jong A, Van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Van den Hende M, et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:12087-12092.
 6. Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:338-344.
 7. Cruvinel WM, Mesquita DJ, Araújo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. *Rev Bras Reumatol* 2008; 48:342-355.
 8. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor β -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164.
 9. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162:5317-5326.
 10. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)-CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192:303-310.
 11. Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 2007; 27:145-159.
 12. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 2011; 241:260-268.
 13. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 2010; 32:95-106.
 14. Bushnell A, Wood K. GITR ligation blocks allograft protection by induced CD25+CD4+ regulatory T cells without enhancing effector T-cell function. *Am J Transplant* 2007; 7:759-768.
 15. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25+ CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3:135-142.
 16. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16:311-323.
 17. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, et al. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 171:708-716.
 18. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-562.
 19. Negrini S, Fenoglio D, Balestra P, Fravega M, Filaci G, Indiveri F. Endocrine regulation of suppressor lymphocytes: role of the glucocorticoid-induced TNF-like receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069:377-385.
 20. Cohen AD, Schaefer DA, Liu C, Li Y, Hirschhorn-Cymerman D, Kim SC, et al. Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One* 2010; 5:e10436.
 21. Hoffmann C, Stanke J, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother* 2010; 33:136-145.
 22. Bianchini R, Bistoni O, Alunno A, Petrillo MG, Ronchetti S, Sportoletti P, et al. CD4(+) CD25(low) GITR(+) cells: a novel human CD4(+) T-cell population with regulatory activity. *Eur J Immunol* 2011; 41:2269-2278.
 23. Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, Nagorsen D, Baron U, Olek S, et al. Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci* 2009; 100:1112-1117.
 24. Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, Van Baarle D, Schuurin E, et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre) malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:199-209.
 25. Santos ALF, Derchain SFM, Martins MR, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imunohistoquímica e hibridização *in situ*. In: Alves VAF, Bacchi C, Vassalo J, editors. Manual de imunohistoquímica. 1ª ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999 p. 237-259.
 26. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16:311-323.
 27. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+) CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3:135-142.
 28. Gonzalez AP, Verhoef C, Ijzermans JNM, Peppelenbosch MP, Kwekkeboom J, Verheij J, et al. Activated tumor-infiltrating CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer. *Hematology* 2013; 57:183-194.
 29. Krausz LT, Fischer-Fodor E, Major ZZ, Fetica B. GITR-expressing regulatory T-cell subsets are increased in tumor-positive lymph nodes from advanced breast cancer patients as compared to tumor-negative lymph nodes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; 25:59-66.
 30. Schiffman M, Kjar S. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:14-19.
 31. Trotter H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24 (suppl 1):1-15.
 32. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med* 2011; 53 (suppl 1):12-21.
 33. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Snijders PJ, et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* 2005; 58:1096-1100.
 34. Fernandes Jr PC, Garcia CB, Micheli DC, Cunha FQ, Murta EF, Tavares-Murta BM. Circulating neutrophils may play a role in the host response in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:1068-1074.
 35. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357:539-545.
 36. Fine JS, Byrnes HD, Zavodny PJ, Hipkin RW. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. *Inflammation* 2001; 25:61-66.
 37. Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. *PLoS One* 2009; 4:e7980.
 38. De Boer OJ, Van Der Loos CM, Teeling P, Van Der Wal AC, Teunissen MB. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2007; 55: 891-898.
 39. Ronchetti S, Nocentini G, Riccardi C, Pandolfi PP. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 2002; 100:350-352.
 40. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated *ex vivo* in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38:1437-1448.
 41. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T cells with a CD4+ CD25+ regulatory phenotype suppress *in vitro* proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79:7860-7867.