



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T γ δ EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
CERVICAIS INTRA-EPITELIAIS (NIC) e CANCER CERVICAL: CONTRIBUIÇÃO DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS**

Discente: Rhadamés Menezes da Costa Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Janaína Cristiana de Oliveira Crispim Freitas

Co-orientadora: profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner

NATAL/RN

2016

RHADAMÉS MENEZES DA COSTA ROCHA

**QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T γ δ EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
CERVICAIS INTRA-EPITELIAIS (NIC) e CANCER CERVICAL: CONTRIBUIÇÃO DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Janaína Cristiana de Oliveira Crispim Freitas

Co-orientadora: Prof. Dr^a Silvana Maria Zucolotto Langassner

NATAL/RN

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Rocha, Rhadamés Menezes da Costa.

Quantificação de células T gama delta em pacientes com neoplasias cervicais intra-epiteliais (NIC) e cancer cervical: contribuição do papilomavírus humano (HPV) e das citocinas pró-inflamatórias / Rhadamés Menezes da Costa Rocha. - Natal, 2017. 45f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas.

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Maria Zucolloto Langassner.

1. Neoplasia intraepitelial cervical - Dissertação. 2. Células T gama delta - Dissertação. 3. Citometria de fluxo - Dissertação. I. Freitas, Janaina Cristiana de Oliveira Crispim. II. Langassner, Silvana Maria Zucolloto. III. Título.

RN/UF/BSCCS

CDU 615.015

RHADAMÉS MENEZES DA COSTA ROCHA

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T γ δ EM PACIENTES COM NEOPLASIAS CERVICAIS INTRA-EPITELIAIS (NIC) e CANCER CERVICAL: CONTRIBUIÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra Janaina Cristiana de Oliveira Crispim, UFRN.

Membro Interno: Profa. Dra. Vivian Nogueira Silberger, UFRN.

Membro externo: Profa. Dra. Renata Toscano Simões, Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, IEP-SCBH.

DEDICATÓRIA

Às minhas duas mães-Dália e Goreth e a Glaydson pelo incentivo e encorajamento nos momentos difíceis que passei durante essa longa trajetória, a vocês todo o meu amor e gratidão por tudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as minhas vitórias e conquistas durante essa trajetória, não foi fácil chegar até aqui, mas ele me deu forças pra continuar e perceber que o caminho é árduo, porém no fim gratificante.

À professora Janaina Crispim pela oportunidade de exercer esse trabalho, pelos ensinamentos transmitidos durante nossa convivência além da orientação por ela ministrada.

Ao programa de Pós-graduação em ciências farmacêuticas, pela oportunidade de executar a pesquisa, e por toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Hemocentro Dalton Cunha – Hemonorte pela estrutura física para os experimentos, principalmente a Gabriela pela grande ajuda nos experimentos.

Aos colegas do laboratório LAPIM, Manu, Cleine, Kleiton, Fabíola, Luan, Danyelle meu muito obrigado por todos os momentos de risadas, pela ajuda em tudo.

A Gustavo pela ajuda nos experimentos, e por todos os ensinamentos.

A todos os meus amigos, em especial Beatriz e Larissa.

A Diego pela grande ajuda agora no final do trabalho, principalmente com a parte estatística.

A Glaydson, por me agüentar e entender os meus momentos de tristeza, desânimo, você é que me dar forças para seguir em frente.

EPÍGRAFE

O impossível está a um passo da nossa superação, a partir do momento que nos superamos algo impossível se realiza.
(Sérgio Pinheiro)

RESUMO

O Carcinoma invasivo de células escamosas resulta da progressão das lesões pré-invasivas precursoras denominadas de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC). Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que 12.990 novos casos foram diagnosticados e 4.120 mulheres serão vítimas de câncer cervical em 2016. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2016 no Brasil indicam que o Carcinoma cervical está em 3º lugar entre os 10 tipos de Câncer mais incidentes, excluindo o de pele não melanoma. As evidências têm implicado o Papilomavirus Humano (HPV) como o principal agente etiológico deste câncer. O sistema imune do hospedeiro na grande maioria dos casos (80-90%) consegue debelar o vírus do HPV, restando apenas uma menor parcela (10-20%) de mulheres que vão apresentar um quadro de infecção persistente, podendo evoluir até o câncer cervical. Sabe-se que a evolução e o surgimento do câncer cervical são influenciados por diversos fatores endógenos e exógenos, dentre os quais: o sistema imune do hospedeiro, oncogenicidade do HPV, o estado nutricional, a idade, escolaridade, número de gestações, uso de preservativos, sexarca, número de parceiros sexuais ao longo da vida, entre outros, são fatores determinantes. Em relação à resposta imune do hospedeiro, recentemente, vem sendo discutido o papel das células $T\gamma\delta$, uma subpopulação de células do sistema imune inato, em diferentes estudos. O papel das células $T\gamma\delta$ e sua participação no microambiente tumoral ainda não está bem estabelecido. O objetivo do presente estudo foi quantificar no sangue periférico o percentual dos linfócitos $T\gamma\delta$ e correlacionar nos grupos de mulheres com neoplasias intraepitelial cervical (NIC) e Câncer cervical. Além disso, pretende-se correlacionar essas variáveis com a presença do HPV, citocinas, dados demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológico e avaliar o impacto na patogênese das neoplasias de colo uterino e do câncer cervical. Em um primeiro momento do estudo foi observado que os linfócitos T gama delta estão em maior quantidade no grupo de pacientes sem neoplasias cervicais intra-epiteliais em comparação com os outros grupos, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa. Porém, ainda precisa incluir no presente estudo a quantificação das células $T\gamma\delta$ no grupo de pacientes com câncer cervical, tipagem do HPV, a quantificação das citocinas e avaliar se há uma correlação com as pacientes com câncer cervical, a fim de se entender o papel dessas células para a progressão das neoplasias cervicais.

Palavras chaves: Neoplasia intraepitelialcervical, células $T\gamma\delta$, Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Invasive squamous cell carcinoma is resulting from progression of precursor pre-invasive lesions known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN). In the United States (US), it is estimated that 12,990 new cases were diagnosed and 4,120 women will be cervical cancer victims in 2016. Estimates from the National Cancer Institute (INCA) for the year 2016 in Brazil indicate that cervical carcinoma being in 3rd place among 10 types of more incidents cancer, excluding the nonmelanoma skin. Evidence has implicated the Human Papillomavirus (HPV) as the primary etiologic agent of cervical cancer. The host's immune system in most cases (80-90%) can eradicate the virus HPV, leaving only a smaller portion (10-20%) of women who will present a persistent infection framework, which may progress to cancer cervical. It is known that the evolution and emergence of cervical cancer are influenced by several endogenous and exogenous factors, among which: the host immune system, HPV oncogenicity, nutritional status, age, education, number of pregnancies, use of condoms, first sexual intercourse, number of sexual partners over a lifetime, among others, are determining factors. Regarding the host immune response, recently, has been discussed the role of T $\gamma\delta$ cells, a subpopulation of cells of the innate immune system in different studies. It is known that your presence in the tumor microenvironment may play a role in the progression or inhibition of tumor. The role of T $\gamma\delta$ cells and their participation in the tumor microenvironment is not yet well established. The aim of this study was to quantify the percentage in peripheral blood T $\gamma\delta$ lymphocytes and correlate the groups of women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer. In addition, it is intended to correlate these variables with the presence of HPV, cytokines, demographic, clinical, laboratory and histopathological and evaluate the impact in the pathogenesis of cervical cancer. At first study moment it was observed that lymphocytes gamma delta T are in larger amount in the group of patients without cervical intraepithelial neoplasia compared with the other groups, but this difference was not statistically significant. However, still need to include in this study to quantify the T $\gamma\delta$ cells in patients with cervical cancer, HPV typing, the quantification of cytokines and assess whether there is a correlation with the cervical cancer patients in order to understand the role of these cells to the progression of cervical cancers.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, T $\gamma\delta$ cells, flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Taxa de infecção por HPV e incidência do câncer cervical..... | 01 |
| Figura 2. Estrutura esquemática do HPV16 identificando os genes estruturais e não-estruturais..... | 07 |
| Figura 3. Efeitos do HPV na maturação do epitélio escamoso cervical..... | 10 |
| Figura 4. Histogramas representando a intensidade da marcação FSC e SSC das células T $\gamma\delta$ em uma amostra de paciente com lesão de alto grau. A região vermelha representa a área de marcação para linfócitos. | 31 |

LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1.** Características demográficas e epidemiológicas de pacientes dos grupos saudável e com neoplasia cervicais..... 29
- TABELA 2.** Painel de AcMo com diferentes fluorescências para realização da imunofenotipagem das células T $\gamma\delta$ por citometria de fluxo..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

CSF – Fator estimulante de colônias

CTLs- Linfócitos T citotóxicos

DAB – Diaminobenzidina

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

E – Early

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV - Papilomavírus humano

HR-HPV- HPV de alto risco

HSPG- Sulfato de heparina específico do tecido

IARC - International Agency for Research on Cancer

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IARC - International Agency for Research on Cancer

IFN γ - Interferon Gama

IL - Interleucina

ITS - Infecções sexualmente transmissíveis

KDa - Quilodaltons

L– *Late*

LC - *Células de Langerhans*

LCR – *Long region control*

MHC – *Complexo Principal de Histocompatibilidade*

NIC - Neoplasia Intra-epitelial cervical

NIC 1- Neoplasia Intra-epitelial cervical de grau 1

NIC 2- Neoplasia Intra-epitelial cervical de grau 2

NIC 3- Neoplasia intra-epitelial cervical de grau 3

NKK- 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone

MHC- Complexo de histocompatibilidade

NK- Células natural killer

ORF - Open reading frame

PB – Pares de base

PBS - Solução Salina Tamponada

RNA - Ácido Ribonucléico

SCC – Squamous cell carcinoma of the cervix

Th - T-helper

TLR - Receptores *toll-like*

TCR- Receptor de linfócito T

TCLE- Termo de consentimento Livre e esclarecido

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

Tregs - Células T Reguladoras

URR – *Upstreamregulatory region*

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO | 1 |
| 1.2 | FATORES DE RISCO | 3 |
| 1.3.1 | <i>Papilomavírus humano.....</i> | 6 |
| 1.3.1.1 | Estrutura e genoma viral | 6 |
| 1.3.2 | <i>Classificação dos HPVs.....</i> | 8 |
| 1.4 | PATOGÊNESE DO HPV | 9 |
| 1.4.1 | <i>Infecção pelo HPV e resposta imunológica.....</i> | 12 |
| 1.4.1.1 | Marcadores imunológicos de NIC e Câncer cervical | 14 |
| 1.5 | CÉLULAS T $\Gamma\Delta$ | 16 |
| 1.5.1 | <i>Origem e classificação.....</i> | 16 |
| 1.6.1 | <i>Populações de células T $\gamma\delta$.....</i> | 17 |
| 1.6.1.1 | Funções dos linfócitos T $\gamma\delta$ | 18 |
| 2 | HIPÓTESE..... | 20 |
| 3 | OBJETIVO..... | 21 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 4.1 | ASPETOS ÉTICOS..... | 22 |
| 4.2 | DELINEAMENTOS DO ESTUDO | 22 |
| 4.3 | CASUÍSTICA | 23 |
| 4.4 | ANÁLISES HISTOLÓGICAS | 24 |
| 4.5 | IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO | 24 |
| 4.6 | DETECÇÃO MOLECULAR DO HPV | 25 |
| 4.6.1 | <i>Extração do DNA do HPV.....</i> | 25 |
| 4.6.2 | <i>Amplificação do DNA do HPV pela técnica de PCR e visualização do material amplificado.....</i> | 25 |
| 4.7 | ENSAIOIMUNOENZIMÁTICO (ELISA)..... | 27 |
| 4.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 27 |
| 5 | RESULTADOS..... | 28 |
| 5.1 | NEOPLASIAS CERVICAIS E PARÂMETROS CLÍNICOS | 28 |
| 6 | DISCUSSÃO | 32 |
| 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 36 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de colo uterino

O câncer de colo uterino, também chamado de carcinoma cervical (usualmente conhecido pela sigla em inglês SCC – *squamous cell carcinoma of the cervix*) é a quarta malignidade ginecológica mais frequente entre mulheres no mundo. (WAGGONER, 2003) Anualmente, cerca de 500.000 mulheres em todo o mundo são diagnosticadas com câncer de colo uterino. (American Cancer Society, 2010). Dados estimam que 231.000 mulheres morram desta doença por ano e cerca de 80% delas são oriundas dos países em desenvolvimento (BOSCH, 2008). Estima-se que, nesses países, o carcinoma cervical seja responsável por 15% de todos os tumores em mulheres (PARKIN et al., 2005). Como regiões de alto risco, podemos considerar: o Leste e o Sudeste da África (30/100.000 mulheres), o sul da África (26.8/100.000), o sul da Ásia central (24.6/100.000), a América do Sul e a África central (23.9 e 23.0/100.000, respectivamente). Riscos mais baixos são encontrados no Oeste da Ásia, América do Norte e Austrália/Nova Zelândia (FERLARY et al., 2008) variáveis confirmadas na figura 1.

É um dos cânceres ginecológicos mais comuns, que afeta mulheres pertencentes às faixas etárias entre 25 a 55 anos de idade em sua grande maioria. (BRONONICKA-KLYS; LIANERI; JAGODZINSKI; 2016). Estudos mostram que atualmente a cada ano meio milhão de mulheres sejam diagnosticadas com a doença, e em torno de 50% venham a falecer em sua decorrência. (BRONONICKA-KLYS; LIANERI; JAGODZINSKI; 2016). O câncer cervical é um evento raro de ocorrer, mesmo que o vírus HPV esteja presente. De maneira que para a ocorrência do câncer é necessário que o HPV esteja presente, porém não obrigatoriamente seja o único responsável pelo seu desenvolvimento, outros fatores estão intimamente correlacionados. Na grande maioria dos casos observados, o vírus apresenta um comportamento transitório, no qual o próprio organismo do hospedeiro é capaz de eliminar a infecção por volta de seis meses a dois anos de contato. (INTERNACIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 2007).

Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que 12.990 novos casos foram diagnosticados e 4.120 mulheres foram vítimas de câncer cervical em 2016 (American Cancer Society, 2016.) No Brasil, é o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama e de colorretal, sendo a quarta causa de morte em mulheres em todo o país. (INCA, 2016) Estimativas do Sistema de informações sobre

mortalidade para o ano de 2016 apontam que 5.430 mortes ocorreram no de 2013 e que cerca de 16.340 novos casos sejam diagnosticados apenas para o ano de 2016. (INCA 2016). Uma prova de que o Brasil avançou na sua capacidade de realizar diagnóstico precoce é que na década de 1990, cerca de 70% dos casos diagnosticados eram da doença em um estado invasivo. A ponto que atualmente, cerca de 44% dos casos diagnosticados são de lesão precursora do câncer, denominada carcinoma in situ. Esse tipo de lesão é localizada. (INCA, 2016).

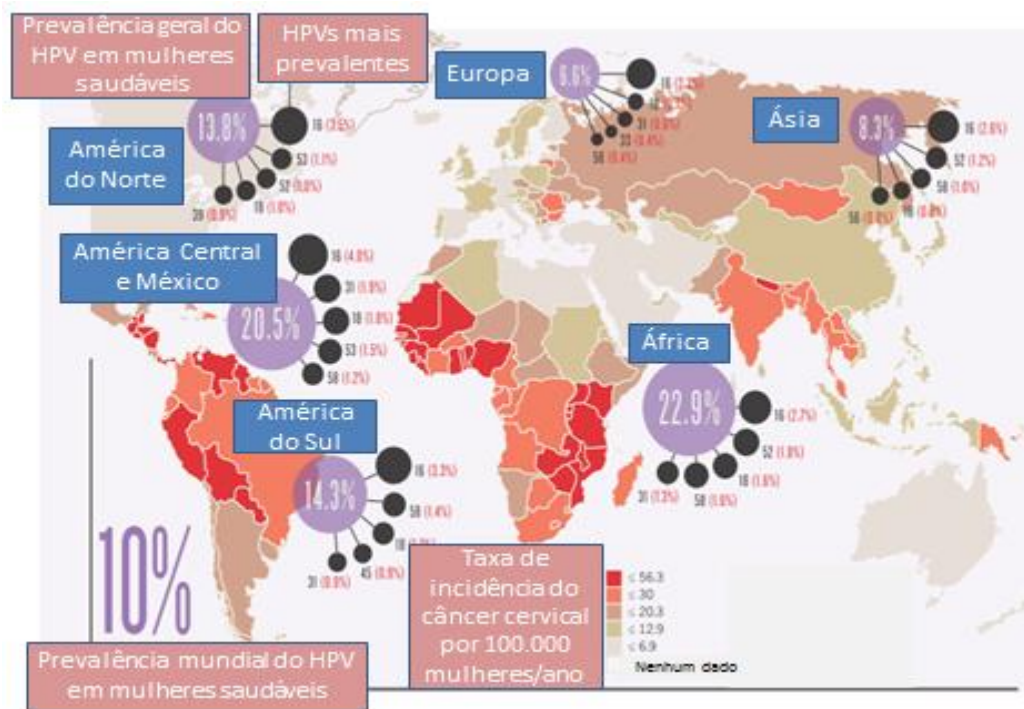


Figura 1. Taxa de infecção por HPV e incidência do câncer cervical. Adaptado de Crow et al., 2012.

As taxas de infecção do papilomavírus humano (usualmente conhecido pela sigla em inglês HPV - humanpapillomavirus) variam em todo o mundo, assim como o número de mulheres infectadas que passam a desenvolver o câncer de colo do útero. Aproximadamente, 291 milhões de mulheres são portadoras no mundo do HPV, sendo 32% infectadas pelos tipos 16 e 18 ou ambas. (DE SANJOSÉ et al.,2007).

1.2 Fatores de risco

O câncer é uma doença multifatorial, na qual estão envolvidos alguns fatores genéticos e alterações epigenéticas que levam à expressão descontrolada de genes envolvidos no início, progressão e promoção da carcinogênese (HOLMES; EGAN; SWAN, 2007). Com relação ao câncer cervical, alguns fatores, são bem conhecidos pela comunidade científica, como estando amplamente relacionados ao desenvolvimento e progressão da carcinogênese cervical, entre eles, encontra-se a idade, o início precoce da vida sexual, multiplicidade de parceiros sexuais, origem étnica, número de gestações, tabagismo, e não mais importante, o sistema imunológico do hospedeiro (GUIMARÃES, 2012; BROVONICKA-KLYS; LAVIERI; JAGODZINSKI, 2016). O câncer de colo uterino está associado à infecção persistente por subtipos oncogênicos do vírus HPV, especialmente o HPV 16 e o HPV 18, responsáveis por 70% dos cânceres cervicais. (WHO, 2010) A infecção pelo HPV é muito comum. Estima-se que cerca de 80% das mulheres

A progressão ou regressão das lesões precursoras até o estágio de câncer, vai estar sob influência de vários fatores, relacionados desde a própria infecção (o subtipo e carga viral, se é uma infecção única ou múltipla) e aos fatores já anteriormente mencionados (genética do hospedeiro, à vida sexual, etc) (INCA, 2016). O sistema imune na grande maioria dos casos (80-90%) consegue debelar o vírus do HPV, restando apenas uma menor parcela (10-20%) de indivíduos que vão apresentar um quadro de infecção persistente. No caso, esse grupo será considerado um grupo de risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical de alto grau. No entanto, uma parcela menor de mulheres infectadas, principalmente por algum tipo de HPV de alto risco oncogênico, ocorre o surgimento de lesões precursoras – NICS e o adenocarcinomas in situ, na qual sua identificação é de grande importância na prevenção do câncer do colo uterino (WHO, 2008; STANLEY, 2008; GUIMARÃES; MICHELIN; LUCENA et al., 2011).

Estudos epidemiológicos clínicos e moleculares demonstraram claramente que a principal causa para o surgimento do câncer cervical é a infecção pelo HPV de alto risco (HR-HPV), tais como os tipos 16 e 18 (JUNG; RAJASEKARAN; JU et al., 2015). Observa-se que os HPVs de alto risco oncogênico estão presentes em mais de 99% dos cânceres de colo uterino; no entanto é necessário levar em consideração outros fatores, como a etiologia, sistema imunológico das mulheres infectadas, assim como a idade, o número de

gestações e partos, vaginite crônica, uso de contraceptivos orais, tabagismo, dentre outros (BROVONICKA-KLYS; LAVIERI; JAGODZINSKI, 2016). O processo da carcinogênese é composto por várias etapas, como a infecção persistente da ectocérvice com um dos tipos de HPV de alto risco (HR-HPV), o que contribui para a expressão dos oncogenes precoces, denominados em inglês por genes Early (E6 e E7), o que resulta em níveis sequenciais de progressão tumoral, caracterizados por discretas alterações histológicas - neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) e por fim o carcinoma cervical invasivo. (KONTOSTATHI; ZOIDAKIS; MAKRIDAKIS et al., 2017) A expressão dos oncogenes E6 e E7 é de fundamental importância para a infecção por um HPV de alto risco oncogênico e progressão das NICs (JONG et al., 2015).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado forte associação entre a multiparidade e as NICs e o SCC. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (usualmente conhecido pela sigla em inglês IARC – *International Agency for Research on Cancer*) observou que mulheres com sete ou mais gestações a termo tiveram risco de desenvolver SCC, quando comparadas com as nulíparas. (CLIFFORD; GONCALVES;FRANCESCHI, 2006) Tem-se observado que fatores hormonais, traumáticos e imunológicos têm sido sugeridos como mecanismos plausíveis para explicar a associação entre a multiparidade e NICs. Além disso, a alta paridade também pode aumentar o risco de SCC porque mantém a exposição da zona de transformação por um período prolongado (HARRIS et al., 2005), facilitando a direta exposição ao HPV e, possivelmente, a outros cofatores.(AZEVEDO et al., 2006).

Outros estudos têm demonstrado forte relação entre a idade da mulher e a infecção pelo HPV. (HERRERO et al., 2005; ALMONTE et al., 2007) Alguns trabalhos de meta-análise corroboram com a relação descrita anteriormente, constatando que a prevalência global do HPV em mulheres com menos de 25 anos foi de 26%, diminuindo para 12% nos intervalos entre 35 à 44 anos e aumentando novamente para 22% naquelas mulheres com mais de 54 anos(SCHIFFMAN et al, 2007)

Estudos têm mostrado que o risco de desenvolvimento do câncer de colo uterino está relacionado com a idade de exposição ao HPV, ou seja, ao início precoce da atividade sexual. No entanto, ainda não estar bem estabelecido os mecanismos que contribuem para a progressão ao SCC, porém os estudos propõem que a exposição do colo uterino ainda imaturo é uma situação de alto risco para a infecção pelo HPV,

buscando alcançar a camada basal e estabelecer uma infecção persistente. (BOSCH et al., 2002)

Evidências científicas demonstraram que o hábito de fumar interfere na incidência e prevalência da infecção por HPV e está associado com o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical (usualmente conhecido pela sigla em inglês NIC – *neoplasia intra-epithelial cervical*) e SCC. (FONSECA- MOUTINHO, 2011) Alguns mecanismos moleculares têm sido sugeridos para explicar como o tabagismo pode contribuir para a carcinogênese cervical, dentre eles: a exposição direta do DNA em células epiteliais do colo uterino frente à nicotina e cotinina, assim como aos produtos resultantes das reações de outros componentes do cigarro, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas (HELLBERG et al.,1988;SIMONS;PHILLIPS; COLEMAN,1993). Essas substâncias favorecem as alterações no sistema imunológico e proporcionam desequilíbrio na produção sistêmica de citocinas pró e anti-inflamatórias (ZEIDEL et al., 2002), podendo ocasionar uma diminuição no número de células de Langerhans (LCs) presentes no colo uterino. (BARTON et al. 1988; POPPE et al., 1996) Ainda, estudos que abordem a metilação do DNA induzida por HPV também parecem contribuir para explicar a relação íntima entre o tabagismo e a carcinogênese cervical (LEA et al.,2004) A relação entre o uso de cigarros e a expressão gênica alterada pode ser explicada pela metilação aberrante epigenética de genes supressores tumorais que resultam em silenciamento gênico (KIM; NELSON; WIENCKE et al., 2001). Por exemplo, demonstrou-se que o gene supressor de tumor P16 é inativado por metilação aberrante em cânceres associados ao tabaco, por exemplo, em cânceres de pulmão e da orofaringe, frequentemente de uma forma dose dependente. A metilação da região promotora do P16 também foi induzida em 94% dos adenocarcinomas de ratos tratados com 4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanona (NKK) (KIM; NELSON; WIENCKE et al., 2001). No mesmo estudo a prevalência da metilação do P16 aumentou com a progressão da doença, da hiperplasia basocelular (17%) para metaplasia escamosa (24%) e, em seguida para carcinoma in situ. (BELINSKY; NIKULA; PALMISANO et al., 1998; KIM; NELSON; WIENCKE et al., 2001)

Em relação ao uso de contraceptivos orais e o risco de desenvolvimento de SCC, estudos sugerem que os altos níveis hormonais possam influenciar a progressão de neoplasias cervicais pré-malignas via integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro proporcionando um aumento da expressão de E6 e E7 (IARC, 1995).

A associação entre infecção pelo HPV e outras Infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) apontam que mulheres HIV soropositivas estão sob maior risco do desenvolvimento de NICs. A interação entre ambos os vírus parece ocorrer da forma direta, por meio de interações moleculares e/ou indireta, via imunossupressão dependente do HIV (CASTELLSAGUE; BOSCH ; MUNOZ, 2002; SALAZAR et al., 2005). Em mulheres soropositivas há uma maior persistência da infecção pelo HPV, quando comparadas com as mulheres soro negativas, o que representa importante fator de risco para o desenvolvimento das NICs e do SCC. (KJELLBERG et al., 2000; HAVERKOS; ROHRER ; PICKWORTH, 2000)

1.3.1 Papilomavírus humano

1.3.1.1 Estrutura e genoma viral

O HPV está classificado na família *Papillomaviridae* (antiga *Papovaviridae*), atualmente, segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Este pequeno vírus, com 55 nanômetros (nm) de diâmetro possui um genoma circular, em dupla fita de DNA, contendo cerca de 8000 pares de base (pb) e peso molecular de $5,2 \times 10^6$ Daltons (SCHNEIDER, 1990; DOORBAR et al., 1990; WHEELER, 2007). As partículas virais completas não são envelopadas, sendo envolvidas por um capsídeo composto por duas proteínas estruturais, que se organizam em 72 subunidades (capsômeros) num arranjo icosaédrico (PFISTER; FUCHS, 1994). O genoma é pequeno e contém apenas alguns genes, todos codificados na mesma cadeia (PFISTER; FUCHS, 1994; WHEELER, 2007; ZUR HAUSEN, 2002). O genoma do HPV contém duas regiões principais (Figura 2) compostas por genes, denominados E (*early*) e L (*late*) (Figura 2), os quais são responsáveis pela codificação de proteínas virais e representam, respectivamente, 45% e 40% do seu genoma; além de uma região reguladora (usualmente conhecido pela sigla em inglês URR – *Upstream regulatory region* ou LCR – *long region control*). (WHEELER, 2007; BUCK et al., 2008; STANLEY, 2010).

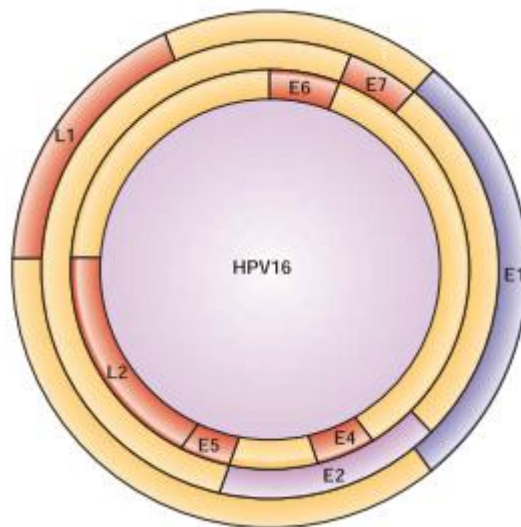


Figura 2. Estrutura esquemática do HPV16 identificando os genes estruturais e não-estruturais.
Adaptado de Ian H. Frazer, 2004.

Oito genes (E1-E8) compõe a região E estão relacionados com a regulação da replicação do DNA e proliferação celular (BONDS et al.,2002; DEHN; TORKKO;SHROYER, 2007), sendo que E3 e E8 ainda não têm função conhecida(PFISTER; FUCHS, 1994). Além disso, essa região codifica as proteínas envolvidas na replicação viral, que nos HPVs de alto risco, são responsáveis pelo processo de imortalização celular (PFISTER; FUCHS, 1994; HEISE, 2003).

A região responsável pela codificação das proteínas estruturais necessárias para a formação do capsídeo viral é a L. Ainda, uma região regulatória, contendo a origem de replicação viral controla a transcrição dos genes da região E. (HEISE, 2003; WHEELER, 2007)

As regiões L1 e L2, que codificam as duas proteínas estruturais que compõem o capsídeo do HPV: a proteína principal L1, de 54 quilodaltos (KDa) e a proteína secundária L2, de 52 KDa (MUNGER;HOWLEY, 2002;WHEELER, 2007); possuem sequência gênica altamente conservada entre todos os tipos de HPV e são responsáveis pela codificação de proteínas constituintes do capsídeo viral, as quais respondem por sua antigenicidade.(STANLEY, 2010)

A região LCR ou URR é constituída por 400 a 1.000 pb aproximadamente e está localizada entre os genes L1 e o início da região E6 (CHEAH E LOOI, 1998; BURD, 2003). Esta região representa 15% do genoma viral e contém sequências

estimuladoras e repressoras da transcrição viral (ZHENG *et al.*, 2006; BURD, 2003; ROSA *et al.*, 2009).

1.3.2 Classificação dos HPVs

As relações entre os genótipos do HPV podem ser expressa sob a forma de árvores filogenéticas com base em sequências de DNA e em proteína homólogas, os quais servem como ferramentas na compreensão da classificação do HPV. Para serem considerados de um mesmo tipo não podem variar mais do que 2% na região codificante ORF (*open reading frame*) e 5% na região LCR. Sendo assim, pequenas variações no seu genoma originam diferentes tipos de HPV (MUNOZ *et al.*, 2003).

Os HPVs foram divididos em dois grupos, de acordo com as propriedades biológicas, em cutâneo trófico e mucosa trófico (DE VILLIERS, 1997). Atualmente mais de 180 tipos de HPV já foram descritos na literatura (BERNARD; BURK; CHEN *et al.*, 2010; SONG; LI; LI *et al.*, 2015) Dentre os cutaneotróficos, encontram-se cerca de vinte ou mais tipos virais associados à epidermo displasia verruciforme. O HPV mucosa trófico pode infectar geralmente as mucosas da orofaringe, laringe, trato respiratório, colo uterino e epitélio anogenital (MUNOZ *et al.*, 2003). No grupo, os tipos de HPV 6, 11, 13, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 61, 62, 70, 72, 74 e 81, são considerados de baixo risco oncogênico (ZURHAUSEN, 2000; STANLEY, 2002; MUNOZ *et al.*, 2003; MADKAN *et al.*, 2007). Os tipos de HPV 39, 45, 58, 59, 67, 68, 73 e 82, embora menos frequentes, são considerados de alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical (WILBUR, REICHMAN e STOLER, 1988; VOGLIANO 2000). Cerca de 40 tipos de HPVs de alto risco atingem a região anogenital, dos quais aproximadamente, 18 são oncogênicos: HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 63, 66, 68 e 82, podendo ser frequentemente encontrados nas neoplasias malignas cervicais (MUNOZ *et al.*, 2003). Dentre os tipos clássicos de HPVs de alto risco estão o 16 e 18, sendo o HPV 16 o primeiro tipo viral mais frequente e o 18 o mais virulento (SCHNEIDER, 1990). Ainda os HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 45 foram associados ao desenvolvimento de neoplasias benignas no colo uterino (IFTNER; VILLA, 2003). Embora a maioria dos tipos conhecidos de HPV, por volta de 200, cause uma infecção assintomática na maioria das pessoas; os tipos de HPV de alto risco são agentes causadores de mais de 90% de casos de SCC, que é a segunda maior causa de morte entre as mulheres no mundo.

1.4 Patogênese do HPV

Inicialmente, para a ocorrência da infecção pelo HPV, o vírus necessita de células com capacidade proliferativa, como as células epiteliais da epiderme ou da mucosa, uma vez que, o ciclo de vida produtivo do vírus ocorre juntamente ao ciclo de diferenciação celular em células do hospedeiro infectado. Desta forma, na célula hospedeira infectada, a transcrição ocorre de maneira diferenciada entre as camadas do tecido epitelial, a qual depende da interação entre o genoma viral e celular, bem como do grau de diferenciação do epitélio.

A infecção por um vírus de alto risco oncogênico tem início a partir do contato do vírus com a membrana basal, o qual é exposto por micro-abrasões na superfície cervical. Alguns estudos mostram que vários receptores estão envolvidos neste processo. A entrada do vírus HPV no interior celular se dá por meio da interação entre a proteína do capsídeo viral com receptores celulares que promovem alterações conformacionais do capsídeo (SONG et al., 2015). O proteoglicano de sulfato de heparina específico do tecido (HSPG) é um membro da família dos glicosaminoglicanos, sendo um receptor para a proteína do capsídeo viral L1 (SURVILADZE; DZIDUSZHO; OZBUN, 2012; RAFF; WOODHAN; RAFF et al., 2013; SONG et al., 2015).

Dessa forma, os genes precoces são expressos na camada basal do tecido infectado e continuam nas linhagens celulares subsequentes, observados em células benignas e malignas. Por sua vez, os genes tardios L1 e L2, relacionados com a formação do capsídeo viral, são expressos somente em células ceratinizadas, resultando na produção de partículas virais completas e infectantes, sendo observados nas verrugas e condilomas (Figura 3).

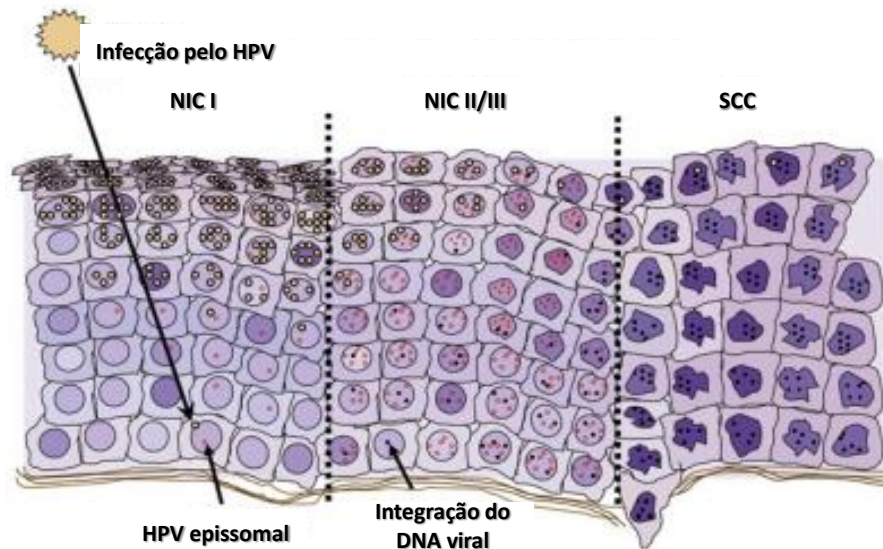


Figura 3. Efeitos do HPV na maturação do epitélio escamoso cervical. Adaptado de J. Thomison III et al., 2008.

Quando os vírions atingem as células da camada basal do epitélio, a infecção viral se inicia. O acesso às células basais acontece através de micro neoplasias causadas por diversas formas de trauma físico e pela interação com certos receptores como $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ integrina (YOONET *al.*, 2001; PSYRRIET *al.*, 2008). Quando as células basais se dividem, uma célula filha torna-se uma nova célula basal, enquanto que as outras migram para longe da camada basal e iniciam a diferenciação (CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010; BODILY; LAIMINS, 2011). A forma epissomal estável do genoma viral é mantida nestas células e num baixo número de cópias. Tais células infectadas formam o reservatório para o desenvolvimento de verrugas produtivas (DOOBAR, 2005; GRM, BERGANT E BANKS, 2009).

Os fatores de replicação, E1 e E2, são os primeiros genes virais a serem expressos, tais formam um complexo que se liga à origem de replicação e atuam no sentido de recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias que medeiam a replicação de DNA (CONGERET *al.*, 1999; STANLEY, 2008). A proteína E1 também exibe atividade helicase, permitindo a separação do DNA viral antes da replicação do complexo (HUGHES e ROMANOS, 1993). E2 é um sítio específico de ligação ao DNA, que ajuda recrutar E1 para a origem de replicação como também tem um papel na regulação da sua transcrição viral (CRIPE et al., 1987; LONGWORTH; LAIMINS, 2004). Vários sítios de ligação foram mapeados entre as proteínas regulatórias virais (produtos de E2) ou celulares (fatores de

transcrição da célula hospedeira), que em conjunto, determinam a regulação positiva ou negativa da transcrição dos genes virais. O gene E4 é expresso tardiamente na replicação do vírus e tem a função de induzir o colapso da rede de cito queratina, sendo esta responsável pela maturação e liberação do vírus da célula hospedeira (DOOBAR et al., 1991; PRAY e LAIMINS, 1995; ZHENG e BAKER,2006).

As regiões E5, E6 e E7 são as de maior importância na transformação celular. A proteína E5 do HPV pode contribuir no início do curso da infecção (ZURHAUSEN, 2002). Além disso, E5 estimula o crescimento celular formando complexos como receptor de fator de crescimento epidermal (epidermal growth factor receptor-EGFR), receptor do fator β de crescimento derivado de plaquetas e receptor de fator estimulante de colônia (HWANG, NOTTOLI; DIMAIO, 1995; ZURHAUSEN, 2002). Também pode ativar quinases (proteínas ativadoras de mitose), p38 e ERK1/2 (Quinases reguladoras de sinais extracelulares) em queratinócitos humanos e foi indicada como uma proteína capaz de inibir a apoptose devido a danos no DNA (CRUSIUS, RODRIGUES; ALONSO, 2000).

Aos genes E6 e E7 atribuímos um papel mais significativo para a transformação maligna (ZURHAUSEN,2002). E6 e E7 são pequenas proteínas, de aproximadamente 18 e 13 kDa de tamanho, respectivamente, localizadas no núcleo. As proteínas E6 são também encontradas no citoplasma e alguns estudos têm sugerido que E7 também possui um componente citoplasmático (HOWIE, KATZENELLEN; BOGEN; GALLOWAY, 2009; MCLAUGHLIN; DRUBIN; MÜNGER, 2009). A expressão das proteínas de alto risco E7 pode imortalizar queratinócitos humanos em uma baixa frequência, mas E6 não tem essa atividade. A combinação de E6 e E7, no entanto, é altamente eficiente, imortalizando a maioria dos tipos primários celulares (HAWLEY-NELSON et al., 1989; MÜNGER et al., 1989). Tal como a replicação do DNA viral depende quase totalmente dos fatores de replicação do hospedeiro, exceto pela helicase E1, outros genes precoces (E5, E6 e E7) são responsáveis por coordenar um ambiente adequado na célula hospedeira para a replicação do DNA viral, o que por vezes induz a síntese de DNA celular e impede a apoptose (STANLEY, 2008).

Para o desenvolvimento do câncer genital, a expressão das proteínas E6 e E7 são necessárias, mas não suficiente para a progressão maligna. E6 e E7 promovem a proliferação de células suprabasais indiferenciadas e diferenciadas e também permitem a evasão da apoptose. O acúmulo de danos ao DNA e as mutações podem resultar na transformação e no desenvolvimento de carcinomas.

A expressão de genes virais tardios (L1 e L2) é iniciada e as proteínas estruturais são expressas na seqüência da entrada para a camada superficial. As proteínas tardias promovem a montagem dos capsídeos icosaédricos que contêm o genoma viral e partículas virais maduras denominadas vírions, estes são liberados das camadas do alto epitélio quando as células já estão diferenciadas para infectar outra célula suscetível (LEDWABA et al., 2004; MUNGER et al., 2004; ZHENG, BAKER, 2006).

Uma vez que os vírions são partículas dotadas de alta imunogenicidade, estas são sintetizadas apenas nas camadas superficiais do epitélio escamoso estratificado, sendo então submetidas a uma vigilância relativamente limitada por células do sistema imune. Em contrapartida, E6 e E7 inativam interferons (IFNs) e fatores regulatórios (IRF) a fim de que o vírus HPV permaneça de forma assintomática no hospedeiro (RONCO et al., 1998; UM et al., 2002).

1.4.1 Infecção pelo HPV e resposta imunológica

A infecção pelo HPV promove o recrutamento para a derme de uma grande quantidade de células do sistema imunológico. Na epiderme escamosa, há a migração de várias células, como por exemplo, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas (APC), linfócitos T, células NK e linfócitos B, que terão fundamental papel na resposta imune contra vírus. No entanto, pode ocorrer tolerância por parte do sistema imune do hospedeiro, assim propiciando um microambiente imunossupressor ideal para a progressão da Neoplasia intraepitelial cervical. (JÚNIOR; TAVARES; MACEDO, 2016)

No decorrer de todo o processo infeccioso, o sistema imune promove a ativação das células T efetoras que vão favorecer a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, INF- γ , TNF, IL-12, IL-3) e quimiocinas que vão promover a resposta imune inata, além do mais, ocorre liberação de macromoléculas pró-apoptóticas e citotóxicas que favorecem a apoptose das células infectadas pelo HPV. (FRAZER, 2009; GUIMARÃES; MICHELIN; LUCENA et al., 2011) . Por outro lado, verificou-se também que o vírus apresenta mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro, como por exemplo, a não liberação de citocinas pró-inflamatórias, em decorrência do ciclo de vida do HPV, no qual infecta os queratinócitos, porém não leva a sua lise. Outro mecanismo é o da não liberação de Interferons do tipo 1($\alpha\beta$), os quais apresentam algumas ações importantes (imunoestimulatórias, antivirais, antiangiogênicas), além de que são responsáveis pela

ligação entre a resposta imune mediada por células e a resposta imune humoral, também sendo responsáveis pela ativação das células dendríticas imaturas, velendo-se desses mecanismos, o HPV consegue passar despercebido das ações imunes do hospedeiro, conseguindo dessa forma sobreviver e contribuir para a persistência da infecção.(MIDDLETON; PEH; SOUTHERN et al.,2003)

Os receptores do tipo Toll- likes (TLR) são uma importante família de receptores responsáveis pelo reconhecimento de padrões localizado nos compartimentos endolissômicos, com função na identificação de patógenos (vírus e bactérias) e com isso desencadeando uma resposta imunológica contra os mesmos (SONG et al., 2015).

A partir do momento em que o HPV de alto risco entra em contato com o epitélio da mucosa, a imunidade inata, por intermédio da barreira epitelial dá início ao seu combate. As células de Langerhans são células dendríticas imaturas, e ocorre uma diminuição significativa do seu número; o mecanismo proposto para isso é a interação direta da proteína E7 com a proteína de ligação ao intensificador β / CCAAT, um fator de transcrição ao ligante da quimiocina 20(CCL20)- (ligação C-C), o qual apresenta um papel decisivo na migração dos precursores das células de Langerhans para a epiderme, o que inibe a transcrição da quimiocina 20 e dificulta o seu recrutamento-células de Langerhans. (BORGNE; ETCHART; GOUBIER et al., 2006; SONG et al., 2015).

Durante a infecção, ocorre inibição do sistema imunológico por meio de alguns mecanismos que vão contribuir para a persistência do vírus no organismo, como por exemplo, a redução do receptor Toll like (TRL), mas especificamente do TLR9, um receptor para DNA viral, sendo fundamental para ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs), nas quais o TLR9 promove o início de uma via de sinalização que culmina na produção de IFN do perfil TH1 e citocinas próinflamatórias que ao serem liberadas, ativarão as respostas imunológicas contra a infecção. (HAJAN; ZANETTI; PARROCHE et al., 2013).

Pacientes que apresentaram lesões provocadas pelo HPV, e têm um perfil de citocinas da resposta Th1, obtiveram melhor desfecho clínico ao serem comparadas com as que tiveram um perfil Th2(GUIMARÃES; MICHELIN; LUCENA et al., 2011) Alguns estudos que têm como objetivo a investigação dos perfis de citocinas apresentados por mulheres portadoras de lesões advindas do vírus HPV, como por exemplo no estudo de LEE et al.,2004 verificou-se que pacientes que apresentaram lesão de alto grau(HSIL) detinham menor quantidade de células TCD4+ produtoras de IL-2, INF- γ , TNF- α que as

do grupo controle, ou seja, um menor de perfil de resposta Th1. No estudo de BAIS et al., 2007 foi observado uma mudança do perfil de citocinas Th1 para Th2 de mulheres com NIC-3 e carcinoma, no qual a concentração de INF- γ foi inferior nesse grupo em comparação aos casos controle e de NIC-2. Em outro estudo realizado por SHARMA et al., 2007 verificou-se uma mudança do padrão de resposta imunológico de Th1 para Th2 de acordo com a progressão da lesão.

Alguns pesquisadores demonstraram em experimentos com cobaias que ocorre uma regressão das lesões cervicais com a resposta imune mediada por células. A resposta imunológica individual é influenciada por diversos fatores endógenos e exógenos, dentre os quais estão os polimorfismos dos antígenos do sistema de histocompatibilidade (MHC), o perfil de células T, o estado nutricional, tabagismo entre outros. (CONTI; PETERSON; BRANE et al., 2014). Na neoplasia cervical invasiva verificaram que os linfócitos infiltrantes no tumor são predominantemente linfócitos T citotóxicos (CTLs) (WANG; HILDESHEIM, 2003).

1.4.1.1 Marcadores imunológicos de NIC e Câncer cervical

Os marcadores imunológicos (células imunes, citocinas, quimiocinas, e receptores solúveis) durante a infecção persistente por um HPV de alto risco oncogênico e progressão da NIC não foram bem estudados ainda (KOSHIOL; SKLAVOS; WENTZENSEN et al., 2014) Os estudos que observam as citocinas envolvidas na persistência viral e progressão das lesões, abrangem uma pequena quantidade de citocinas. Devido a isso, são necessários estudos que avaliem os marcadores relacionados à imunidade de uma forma simultânea, com alto rendimento e com pouca quantidade de amostra. (KOSHIOL; SKLAVOS; WENTZENSEN et al., 2014).

As medições de proteínas que são secretadas por meio das células do sistema imunológico, como citocinas, quimiocinas, e receptores solúveis podem ajudar na detecção de mudanças precoces na resposta imune que predizem se uma infecção pelo vírus HPV irá progredir até o câncer cervical. (KOSHIOL; SKLAVOS; WENTZENSEN et al., 2014).

O percentual de células T regulatórias (Tregs) não é somente utilizado como marcador do estado imunológico do tumor, mas também considerado como um possível marcador para a destruição imunológica provocada pela infecção do HPV. A expressão do marcador Foxp3 definitivo das células Tregs, apresenta um gradativo aumento entre

os níveis de NIC1 para NIC3, o que mostra que o mesmo encontra-se envolvido no desenvolvimento do câncer cervical. (ZENG; YAO; JIE et al., 2013) Ao passo que o aumento da sua expressão, parece estar correlacionado com a expressão de um outro marcador essencial para a integração do HPV no interior das células hospedeiras – P16^{INK4a}, a expressão do Foxp3 foi correlacionada ao tamanho do tumor. (ZENG; YAO; JIE et al., 2013)

Um outro marcador, a HMGB1, uma proteínas de ligação ao DNA, é crítica para a supressão imunológica do hospedeiro. Existe uma correlação direta entre a sua expressão e o potencial maligno da NIC. (KOSHIOL; SKLAVOS; WENTZENSEN et al., 2014) Um outro estudo anterior, também provou que níveis elevados de HMGB1 podem ser utilizados como um marcador de prognóstico precoce em pacientes que apresentam recorrência de câncer cervical (SHENG; DU; ZHANG et al., 2009).

Os mecanismos pelos quais, a HMGB1 induz a tolerância imunológica pelo HPV de alto risco, são os seguintes: Ocorre supressão imunitária, devido ao aumento das células Tregs e produção de IL-10, há ainda inibição das funções das células T, por meio da regulação da sinalização do NF-KB e polarização dos perfis TH1 e TH2. (PANG; ZHANG; WEI, 2014).

A expressão do P16^{INK4a} é induzida pela integração do DNA do (HR-HPV) no genoma do hospedeiro, ele é inibidor de quinase dependente de ciclina, e mais exposto na NIC (HALLOUSH; AKPOLAT; JIM ZHAI; 2008). A expressão do P16INK4a tem uma correlação positiva com o grau do NIC, e pode ser utilizada para diferenciar diferentes graus de NIC em biópsias cervicais (KOSHIOL; SKLAVOS; WENTZENSEN et al., 2014). Geralmente, a proteína L1 do capsídeo do HR-HPV é expressa em todos os níveis da NIC, apresentando uma associação negativa com os graus de NIC (IZADI-MOOD; SARNADI; EFTERKHAR et al., 2014). A partir da perspectiva imunológica, a proteína L1 do HR-HPV promove a indução de respostas imunológicas por parte dos linfócitos TCD8+ e TCD4+ contra a infecção pelo HR-HPV (PINTO; EDWARDS; CASTLE et al., 2003).

1.5. Células $T\gamma\delta$

1.5.1 Origem e classificação

As células $T\gamma\delta$ e as células $T\alpha\beta$ surgem de uma mesma célula progenitora comum no timo. Os eventos moleculares que conduzirão na decisão para o desenvolvimento da linhagem dos timócitos $CD4^- CD8^-$ para diferenciação em células $T\gamma\delta$ ou $T\alpha\beta$ ainda não foram ainda bem estabelecidos e esclarecidos. (XIONG; RAULET, 2007).

Ao contrário das células $T\alpha\beta$ tradicionais, que resultam principalmente em órgãos linfoides secundários e desempenham um papel central nas respostas imunes adaptativas, muitas células $T\gamma\delta$ residem em camadas epiteliais de tecidos subjacentes às superfícies internas e externas do corpo, como a pele, o pulmão, o epitélio intestinal, língua, na qual funcionam como uma primeira linha de defesa. (XIONG; RAULET, 2007)

As Células T são classificadas em $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ de acordo com o seu receptor para linfócito T para o reconhecimento de antígenos, enquanto as primeiras são reconhecidas nas respostas imunes adaptativas, as $\gamma\delta$ não são restritas ao complexo de Imunohistocompatibilidade (MHC), além de não dependerem do processamento e apresentação de antígenos, elas apresentam uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, além do mais têm função no sistema imune de mucosa do trato respiratório. (XUEKUN; QINTAI; YULIAN et al., 2014).

Depois do surgimento de um progenitor comum no timo, as vias de maturação das células $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ divergem. Notavelmente, o desenvolvimento de timócitos $\gamma\delta TCR^+$ não requer a expressão de Aire, um regulador transcricional crucial para a seleção negativa de células T autoreativas $\alpha\beta$. O mecanismo pela qual as células T se tornam comprometidas com a linhagem $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ ainda não é totalmente compreendido como os timócitos reorganizam os genes β , γ e δ ao mesmo tempo, o que pode levar à expressão simultânea do TCR $\gamma\delta$ e do pré-TCR ($T\alpha$ invariante emparelhado com o TCR- β) (LEGUT; COLE; SEWELL, 2015). No entanto, evidências sugerem que os timócitos adotam a linhagem $T\gamma\delta$ após receberem um forte sinal via TCR $\gamma\delta$, que pode ser aditivamente reforçado pela sinalização adicional via Pré-TCR, permitindo assim ligantes fracos para conduzir o comprometimento da linhagem de células $T\gamma\delta$ também.

1.6.1 Populações de células T $\gamma\delta$

Nos seres humanos, as células T $\gamma\delta$ constituem 0,5 a 10% das células T no sangue periférico, mas encontra-se em maior quantidade nos tecidos epiteliais, como por exemplo, na pele, pulmões, intestino. A maioria das células T $\gamma\delta$ no sangue periférico expressam a cadeia V δ 2, enquanto que as células T $\gamma\delta$ presentes nos tecidos são principalmente V δ 1^{pos} ou V δ 3^{pos}. As razões precisas para essa especificidade tecidual e os mecanismos que a sustentam ainda não foram elucidados. As descobertas mais recentes sugerem que as células T $\gamma\delta$. As descobertas mais recentes sugerem que os linfócitos T $\gamma\delta$ desempenham papel na imunidade contra o câncer, e sabe-se que camundongos que não têm o TCR $\gamma\delta$ são mais susceptíveis a alguns cânceres por meio de mecanismos ainda não conhecidos. (LEGUT; COLE; SEWELL, 2015).

As células T $\gamma\delta$ humanas podem ser divididos em três populações principais, com base na expressão da cadeia δ . As células T $\gamma\delta$ expressando cadeias V δ 1 expressando cadeias V δ 1 são presentes principalmente na cama intraepitelial das superfícies de mucosas, onde estão envolvidas na manutenção da integridade do tecido epitelial quando enfrentam dano, infecção ou transformação, respondendo a antígenos de estresse em células epiteliais e produzindo IL-10, mas pouca ou nenhuma IL-2, IL-4 ou INF- γ . (WU; DING; TANAKA, 2014).

A segunda população de células T $\gamma\delta$ expressa os produtos da cadeia V δ 2, representando a maioria dos linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes em adultos humanos saudáveis, compreendendo até 50% a 90% da população periférica das células T $\gamma\delta$. A cadeia V δ 2 combina-se quase que exclusivamente com V γ 9 - também denominada V γ 2. O aparecimento da V γ 9V δ 2 estar presente apenas em humanos e primatas não humanos. (WU; DING; TANAKA, 2014).

A terceira população de células T $\gamma\delta$ é a V δ 3, estão em 0,2% das células T circulante, incluindo subgrupos CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻. Encontram-se em pequena quantidade no sangue, porém são ricas no fígado de pacientes com leucemias e algumas infecções virais crônicas, elas expressam CD56, CD161, HLA-DR e NKG2D, sem NKG2A e NKG2C (WU; DING; TANAKA, 2014)

1.6.1.1 Funções dos linfócitos T $\gamma\delta$

As células T $\gamma\delta$ constituem uma população heterogênea de células que têm cada vez mais reconhecida suas complexidades funcionais e de desenvolvimento, muitas vezes associado com a sua migração tecidual ou localização. (CARDING; EGAN; 2002). As células T $\gamma\delta$ de camundongos e humanos compartilham muitas propriedades funcionais e de desenvolvimento, por exemplo, as células TV δ 1 das duas espécies apresentam linfócitos intra-epiteliais T $\gamma\delta$ e possuem capacidade para reconhecer MHC de classe 1 ligado às cadeias A e B que são induzidos sobre as células epiteliais e tumorais por estresse ou dano estrutural. (HAYDAY, 2009; BONNEVILLE; O'BRIEN; BORN, 2010; WITHERDEN; HAVRAN, 2011; VANTOUROUT; HAYDAY, 2013) Elas apresentam a propriedade de matar as células tumorais, por meio da produção de Interferon gama, inibindo a angiogênese e melhorando a expressão de MHC classe 1 pelas células tumorais, além de liberação de granzimas e perforinas que vão promover ações citotóxicas, como lise das membranas celulares, e consequente morte celular, além de expressão de ligantes de morte celular como por exemplo o TRAIL e o CD95, mas em outros casos podem promover o crescimento tumoral por meio da produção de IL-17 através de alguns subtipos de células T gama delta, o que acarreta uma imunossupressão promovida pelas células da linhagem mielóide (MDSCs) ou de pequenos macrófagos peritoneais, promovendo angiogênese, crescimento tumoral e indução da diferenciação das células T regulatórias (Tregs). Além disso, há produção por parte das células T gama delta das citocinas IL-4, IL-10 e/ou TGF β o que parece suprimir a maturação celular das células dendríticas e/ou funções efetoras das células T $\gamma\delta$. (SANTOS-SILVA; SERRE; NORELL; REI, 2015; PENNINGTON; SILVA-SANTOS, 2015).

O mecanismo imunológico a respeito das progressões das lesões intraepiteliais e câncer ainda não está bem estabelecido. Sabe-se que as células T gamma delta exercem um papel contraditório no câncer. Os estudos descritos até o momento na literatura científica apontam ainda para um papel bem diversificado a depender do tipo de tumor estudado, e para o objeto de estudo, no caso se foi um estudo em camundongo (maioria dos trabalhos) ou em humanos, em que mecanismos protumorais e antitumorais foram observados a partir da produção de citocinas como IL-17, diferenciação de células T regulatórias (Tregs), INF- γ , TNF, IL-10, IL-4, TGF- β por parte de algumas subpopulações de células T $\gamma\delta$. Em concordância com essas propriedades,

observou-se que animais knockout para subpopulação das células T $\gamma\delta$ ocorre um maior desenvolvimento de tumores em modelos transplantáveis de melanoma B16(GAO; YANG; PAN; SCULLY; GIRARDI; AUGENLICHT, 2003; LANÇA; COSTA; GONÇALVES-SOUSA et al., 2013). No entanto, deve-se notar que os subgrupos das células T $\gamma\delta$ diferem bastante de forma funcional entre humanos e camundongos, de maneira que as conclusões só podem ser levadas em consideração neste modelo, não podendo ser levadas em consideração para modelos em humanos. (REI; PENNINGTON; SILVA-SANTOS, 2015).

Em humanos, os dois principais subtipos de células T $\gamma\delta$: V δ 1+ predominante nos tecidos e o subtipo V δ 2+ predominante na circulação também promovem citólise em tumores sólidos e hematológicos, além da produção das citocinas INF γ e TNF após serem ativadas. (REI; PENNINGTON; SILVA-SANTOS, 2015). Apesar dessas descobertas do papel antitumoral das células T $\gamma\delta$ infiltrantes no tumor, um estudo realizado em 2007 com células tumorais isoladas de câncer de mama relatou uma capacidade de inibição in vitro e in vivo da função imunológica de muitas populações de células, o que conseqüentemente contribuiu para um efeito pró-tumoral. (PENG; WANG; KINIWA et al., 2011). Em concordância com esses resultados, verificou-se em um estudo realizado por MA e colaboradores que a presença das células T $\gamma\delta$ foi atribuída a uma pior sobrevida de mulheres com câncer de mama e um agravamento do tumor, tornando as células T $\gamma\delta$ um marcador para avaliação do prognóstico e severidade da doença (MA; ZHANG; YE, et al., 2012).

Até o presente momento, os trabalhos publicados recentemente em câncer, não são elucidativos e são restritos aos estudos em animais, sendo assim se faz necessário explorar os estudos das células T $\gamma\delta$ produtoras no contexto do câncer cervical e correlacionar estes dados com *outcome* clínico em uma abordagem única. Como supracitado, fica evidente a necessidade em se avaliar o papel destas diferentes populações no local onde esta ocorrendo a resposta imunitária no câncer cervical.

O papel das células T $\gamma\delta$ no campo do câncer ainda não foi elucidado, entender e caracterizar os mecanismos que controlam ou favorecem a presença das células T $\gamma\delta$ no microambiente tumoral associada a eventos imunopatogênicos do câncer cervical é relevante.

2. HIPÓTESE

Acredita-se que os casos de câncer cervical podem ser caracterizados por um aumento da expressão das células T gamma delta associado aos piores estadiamento tumoral e associado à presença de HPVs oncogênicos e uma diminuição das citocinas IL-17 e IL-6 quando comparado as pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a contribuição da expressão proteica das células T gamma delta em mulheres estratificadas em grupos com neoplasia intraepitelial cervical e câncer cervical. Além disso, pretende-se correlacionar essas variáveis com a presença do HPV, citocinas, dados demográficos, clínicos, laboratorial e histopatológico e avaliar o impacto desses achados na patogênese das neoplasias de colo uterino e do câncer cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar e quantificar as células t gamma delta em pacientes que apresentarem NICS e SCC.

Uma vez que há ausência de um biomarcador no câncer cervical, o papel da diferenciação de células T gamma delta em diferentes tipos de câncer ainda não está estabelecido. Espera-se investigar a presença das células T gamma delta em pacientes com diferentes graus de neoplasia e câncer cervical comparando-se com indivíduos saudáveis, através da técnica de Citometria de fluxo.

- ✓ Avaliar o perfil de citocinas em nível sistêmico como um biomarcador, em NIC e SCC, verificando a associação com a presença do HPV, mediante variáveis clínicas e epidemiológicas e a presença das células T gamma delta.

Tendo em vista a participação e a contribuição da resposta imune em vários tipos de cânceres, torna-se imprescindível determinar o perfil de citocinas sistêmica com a finalidade de se determinar um biomarcador nas pacientes com NIC e SCC. Para esse propósito, utilizaremos a técnica de ELISA para quantificar no soro das pacientes com NIC e SCC as concentrações séricas de IL-6 e IL-17.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa deste trabalho foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes/HUOL da Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, e enquadrado como APROVADO, de acordo com o Processo nº. 526/11.

4.2 Delineamentos do estudo

Para a análise da contribuição das células T gamma delta, assim como das citocinas e a presença do HPV na progressão da NIC para o SCC foram utilizadas pacientes provenientes do Setor de Ginecologia do Hospital Dr. Luiz Antônio e do ambulatório de Patologia Cervical da MEJC para responder todos os questionamentos elencados nesta proposta, espécimes e raspado cervical, além do sangue periférico foram necessários para proceder as análises. As biópsias foram coletadas após a paciente ter sido submetida à exames citológicos e colposcópicos, os quais sugeriram alguma alteração indicativa de biópsia. Com estes espécimes foram realizados o exame histopatológico e com o raspado cérvico-vaginal será avaliado a tipagem do HPV. O sangue periférico foi destinado para quantificação das células T gamma delta, e o soro obtido desta amostra será realizado a técnica de ELISA, na qual será quantificado sistematicamente as citocinas.

A seleção dos pacientes para este estudo foi realizada durante o período de novembro de 2014 até o presente momento. Os critérios para inclusão das pacientes no estudo foram: a) Paciente imunocompetente; b) Ausência de sangramento durante o exame da citologia; c) Não utilização de antibióticos orais, fungicidas ou cremes vaginais; d) Nenhuma atividade sexual por pelo menos dois dias antes do dia da coleta das amostras. Depois de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram coletadas amostras de sangue periférico para realizar a imunofenotipagem da população de células T $\gamma\delta$, coleta do raspado cérvico-vaginal, biópsias cervicais. As pacientes foram estratificadas em grupo sem neoplasia, com lesão Intraepitelial cervical e câncer cervical, sendo este último ainda em andamento.

As pacientes inclusas no estudo foram inseridas de forma voluntária e informadas sobre o propósito da pesquisa, somente foram admitidas àquelas que concordaram e assinaram o TCLE.

4.3 Casuística

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foram coletadas amostras biológicas de 92 mulheres atendidas na rotina ambulatorial do setor de Patologia Cervical da MEJC. As mulheres foram estratificadas em grupo com neoplasia e sem neoplasia. Dentre essas mulheres, 39 de 92 (42,4%) foram enquadradas dentro do grupo sem NIC, enquanto que 53 de 92 (57,6%) foram enquadradas no grupo com NIC. Este último grupo de mulheres tiveram indicação de biópsia cervical após rigoroso exame clínico e citológico. Após coleta dos espécimes cervicais as mesmas foram estratificadas, de acordo com o resultado histopatológico, em 23 casos de NIC I e 30 casos de NIC II/III. Em relação às coletas referentes às pacientes com câncer cervical, as mesmas ainda estão sendo arroladas no setor de ginecologia da Unidade do Hospital Dr. Luiz Antônio (LIGA), até o presente momento foram coletas apenas dezoito pacientes (18) com câncer cervical (Ler o item perspectivas futuras).

Ademais, as pacientes recrutadas para o estudo foram submetidas a um questionário, no qual foram colhidas informações sobre idade, história de tabagismo, consumo de álcool, uso de métodos contraceptivos, paridade, número e hábito de parceiros, entre outros. Adicionalmente, foi realizada nestas pacientes, a coleta do raspado da endocérvice com o kit DNA *collection device* (DIGENE, EUA, Califórnia) com a finalidade de detectar o HPV. A coleta dos espécimes cervicais foi restrita as pacientes que apresentaram alterações na citologia e colposcopia, após a coleta os espécimes foram submetidos a cortes histológicos, nos quais foram corados com hematoxilina-eosina e encaminhados para análise histopatológica. A partir das amostras de sangue periférico obteve-se o soro e sangue total. A obtenção do soro permitiu a quantificação sistêmica das citocinas IL-17 e IL-6. E em paralelo, o sangue total foi utilizado para quantificar as células T gamma delta nos grupos supracitados.

4.4 Análises histológicas

Após obtenção dos espécimes cervicais, as amostras foram fixadas e inseridas em blocos de parafina. A análise histopatológica foi realizada em cortes de 4µm de espessura, corado em hematoxilina/eosina. Todas as análises ópticas foram processadas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e analisadas pelo mesmo patologista. O estudo histopatológico seguiu os critérios estabelecidos conforme a classificação de Richard (1968). Dois observadores independentes avaliaram a hematoxilina e eosina (H & E)- as lâminas coradas e os diagnósticos iniciais, em seguida, determinado com base nas características histológicas segundo a OMS Classification 2014. Estes diagnósticos incluíram as lesões benignas, como a metaplasia escamosa ou NIC1 e lesões pré-cancerosas, tais como NIC 2 e NIC3.

4.5 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Todas as amostras de sangue periférico foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo, utilizando um painel de anticorpo diretamente conjugado com até dois diferentes fluorocromos por tubo, contendo isotiocianato de fluoresceína, FITC (do inglês, *fluoresceinisothiocyanate*) e/ou PE (Ficoeritrina) que detectam as fluorescências verde e laranja respectivamente, possibilitando a marcação de dupla marcação por tubo em uma única etapa de marcação (imunofluorescência direta).

Para melhor caracterização das células T $\gamma\delta$ foi necessário a montagem de um painel combinando os diferentes anticorpos monoclonais (AcMo) por tubo, de acordo com a especificidade e conjugação dos mesmos, conforme a tabela 1. Foram utilizados 2 tubos para cada amostra de sangue, cada tubo contém uma combinação específica de anticorpos de superfície. Foram adquiridos 100.000 eventos para cada amostra

4.6 Detecção molecular do HPV

4.6.1 Extração do DNA do HPV

Para detecção do HPV através da técnica de PCR, as amostras de células da mucosa cervical foram coletadas com auxílio de escovas endocervicais associadas a tubos contendo solução conservante (kit DNA *collectiondevice*/DIGENE, EUA, California). Até momento da extração, as amostras estão armazenadas em tubos coletores contendo uma solução conservante de composição não revelada no freezer a (-) 80°C. Todo o conteúdo do tubo de coleta será transferido a um tubo tipo eppendorf de 1,5mL, previamente identificados com o número da amostra correspondente. As amostras serão centrifugadas sob-refrigeração (4°C) a uma velocidade de 13.000rpm por 5 minutos, e em seguida, o sobrenadante será descartado vertendo-se o eppendorf com cuidado para não perder o pellet. Três lavagens sucessivas serão realizadas adicionando 1mL de solução salina no interior de cada tubo coletor ainda contendo a escova dentro dele, agitando-se conforme descrito anteriormente, repetindo o procedimento de centrifugar após cada lavagem. Adicionar 300µL do buffer de digestão a cada eppendorf contendo a amostra; e em seguida colocará em banho-maria a 56°C para prosseguir a digestão enzimática durante uma hora, realizando uma agitação no vortex de 15 segundos a cada 15 minutos. Os tubos serão transferidos para o banho a 95°C com o objetivo de proceder à inativação da enzima durante 30 minutos, realizando pelo menos duas agitações de 15 segundos, a cada 15 minutos. Ao término, as amostras serão diluídas com água destilada estéril (1/10) e colocadas em outro tubo eppendorf devidamente identificado com o número e a diluição correspondente; armazenando-as em freezer a (-) 80°C até a realização da PCR.

4.6.2 Amplificação do DNA do HPV pela técnica de PCR e visualização do material amplificado

O DNA do HPV será amplificado com os primers GP5+ e GP6+ (Invitrogen, São Paulo, Brasil) conforme descrito por Roda Husman et al.4. Na reação de amplificação para pesquisa do DNA do HPV utilizará um volume final de 50µL, sendo constituído por 50 mM KCl; 10mM Tris-HCL (pH 8,3); 3,5 mM de MgCl₂; 200µM de cada desoxinucleotídeotrifosfato (dNTP); 1U de Taq DNA polimerase, 50 pmoles de

cada primer e 5µL da solução contendo o DNA extraído. Após o preparo, cada PCR será colocada em termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) com a seguinte programação: pré-aquecimento a 94 °C por 4 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto; 40 °C por 2 minutos; 72°C por 1 minuto e etapa final a 72 °C por 4 minutos.

Para visualização do produto final amplificado serão utilizados 5µL do mesmo e 2µL de loading buffer (0,25% de azul de bromofenol; 15% de Ficoll tipo 400). Essa mistura será aplicada em gel de agarose 2% (m/v) corado com gel red (Uniscience, São Paulo, Brasil) e submetido à corrida eletroforética em cuba horizontal a 110 v durante 45 minutos. Em todas as corridas eletroforéticas será utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas). Os fragmentos de DNA amplificados serão visualizados através de um transiluminador com luz ultravioleta e posteriormente fotografados.

A fim de se evitar resultados falso-positivos, uma amostra positiva para HPV (controle positivo) será adicionada na corrida. Já a qualidade do DNA amplificado será testada através da amplificação do gene da beta-globina humana. Para cada reação utilizará 1 µg de DNA da amostra, 100 micro µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmol de cada iniciador, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 2,5 U de *Taq* polimerase para um volume final de 50 µL (Invitrogen, New York, USA). O par de iniciadores será utilizados foi GL1(5'-TGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCA-3') e GR2 (5'- TGAAGTTCTCAGGATCCACGTGC-3'), os quais amplificarão um segmento de 185 pb (FERRE; GARDUNO,1989) (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

A reação de amplificação será realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 1 minuto à 94°C(desnaturação), 1 minuto à 55°C (anelamento) e 2 minutos à 72 °C(extensão). Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final de 10 minutos à 72°C.

Para a visualização dos *amplicons*, 10 µL do produto da amplificação será submetido à eletroforese (100 v/60 minutos) em gel de agarose à 2,0% , em tampão TBE 1x (Tris 0,089 M, ácido bórico, 0,089M, EDTA 0,01 M pH 7,5) e corado com gel red. Posteriormente os géis serão visualizados à luz ultravioleta e detectados utilizando o sistema de foto-documentação UVP. O tamanho dos amplicons será determinado por comparação com um marcador de 50 pb (1,0µg/µL- Invitrogen, New York, USA).

Os controles positivos, também chamados de amostra padrão, para amplificação da região consenso do HPV e beta-globina serão amostras sabidamente infectadas. Como controle negativo, todos os reagentes da PCR serão adicionados em um microtubo 0,2ml, porém sem adicionar amostra de DNA.

4.7. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Com o intuito de quantificar sistemicamente a presença das citocinas pró-inflamatórias IL-17 (Bioscience, San Diego, CA, USA) e IL-6 (eBioscience, San Diego, CA, USA) no grupo em estudo, será utilizada a técnica de ELISA. Para esta técnica utilizará o protocolo do fabricante (eBioscience, San Diego, CA, USA). A leitura da reação será realizada em uma leitora automatizada utilizando filtro de 405 nm e a concentração correspondente a cada valor da densidade ótica (D.O.) obtida, foi determinada pela comparação com curva-padrão, com concentrações variando de 100 a 5000 pg/mL.

4.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa IBMSPSS Statistics versão 20. Foi utilizado o teste do ANOVA com intervalo de confiança. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Neoplasias cervicais e parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos das pacientes selecionadas para este estudo estão sumarizados na tabela 1. Realizou-se uma comparação entre a idade média das pacientes, nível sócio-econômico, escolaridade, consumo de tabaco e álcool, paridade, início da atividade sexual, uso de preservativos e contraceptivos orais nos diferentes grupos estudados.

Quando se avaliou a variável: número de parceiros sexuais, constatou-se que 70% das mulheres com lesões de alto grau (NIC-1 e 2) tiveram mais de 2 parceiros sexuais durante a vida ($p=0,077$). No estudo verificou-se que 50% das mulheres do grupo lesão de alto grau têm apenas o nível primário de escolaridade, em comparação a 28,2% no grupo sem lesão (0,318).

Com o intuito de avaliar a participação sistêmica das células T gamma delta em pacientes com NIC e sem neoplasia avaliou-se a participação dessas células nesse grupo estudado. Evidenciou-se uma tendência de um maior percentual das células T gamma delta no grupo sem lesão ($p=0,062$ (ver gráfico 1).

Tabela 1. Características demográficas e epidemiológicas de pacientes dos grupos sem lesão e com neoplasia cervicais.

| VARIÁVEIS | | GRUPOS | | | | Valor de p | | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|------|----------------|------|------------|--------------------|-------|
| | | Grupo saudável n= 39 | % | NIC 1 n= 23 | % | | NIC 2 e 3 n= 30 | % |
| Estado Civil | Solteria, divorciada, viúva, | | 33,3 | | 34,8 | | 36,7 | 0,959 |
| | Casada | | 66,7 | | 65,2 | | 63,3 | |
| Nível de escolaridade | Básico | | 28,2 | | 47,8 | | 50,0 | 0,318 |
| | Médio | | 61,5 | | 47,8 | | 40,0 | |
| | Superior | | 10,3 | | 4,3 | | 10,0 | |
| Uso de método contraceptivo | Nunca | | 25,6 | | 26,1 | | 40,0 | 0,420 |
| | Apenas previne gravidez | | 53,8 | | 52,2 | | 53,3 | |
| | Método de barreira | | 20,5 | | 21,7 | | 6,7 | |
| Uso do preservativo | Nunca | | 69,2 | | 47,8 | | 76,7 | 0,102 |
| | Às vezes | | 20,5 | | 43,5 | | 23,3 | |
| | Sempre | | 10,3 | | 8,7 | | 0,0 | |
| Uso de Cigarro | Sim | | 7,7 | | 13,0 | | 16,7 | 0,514 |
| | Não | | 92,3 | | 87,0 | | 83,3 | |
| Sexarca | Faixa etária (12- 15anos) | | 28,2 | | 39,1 | | 50,0 | 0,180 |
| | (16-26anos) | | 71,8 | | 60,9 | | 50,0 | |
| Idade | Faixa etária (18 –35anos) | | 53,8 | | 56,5 | | 56,7 | 0,966 |
| | (36- 76anos) | | 46,2 | | 43,5 | | 43,3 | |
| Número de parceiros sexuais | ≤ 2 | | 56,4 | | 52,2 | | 30,0 | 0,077 |
| | >2 | | 43,6 | | 47,8 | | 70,0 | |

Legenda: n: Número de pacientes; **Grupo Sem lesão:** Negativo para lesão intraepitelial e malignidade; **NIC1:** Neoplasia intra-epitelial cervical 1, **NIC 2 e NIC3:** Neoplasia cervical intraepitelial 2 e 3. **Valor de p.**

Tabela 2. Painel de AcMo com diferentes fluorescências para realização da imunofenotipagem das células T $\gamma\delta$ por citometria de fluxo.

| Tubo | Combinação das cadeias de anticorpos |
|------|--|
| 1 | Controle Negativo (Apenas PBS) |
| 2 | TCRV δ 2FITC + TCRV γ 9 PE |

As células T $\gamma\delta$ foram quantificadas pelo auxílio do citômetro de fluxo de 3 cores FACSCalibur (Beckton Dickinson, EUA) em plataforma machintosh (Apple), utilizando o programa Cell Quest (Cell Quest software Beckton Dickinson) com aquisição (leitura) de um total de 20.000 células por tubo, levando-se em conta os parâmetros ForwardScatter (FSC) em escala linear avalia o tamanho celular, e SideScatter (SSC) também em escala linear, avalia a complexidade e granulosidade celular, FL1 e FL2 em escala logarítmica que detectam as fluorescências verde, laranja e vermelha, ou seja, a reação antígeno-anticorpo conjugado ao FITC e PE respectivamente.

Gráfico 1 - **Percentual dos linfócitos T $\gamma\delta$ obtidos pelo citometria de fluxo nos grupos.** O Teste estatístico utilizado foi o ANOVA e o intervalo utilizado foi o intervalo de confiança de 95%. NILM: Negativo para lesão intra-epitelial; NIC1: Lesão de baixo; NIC2-3: Lesão de alto grau.

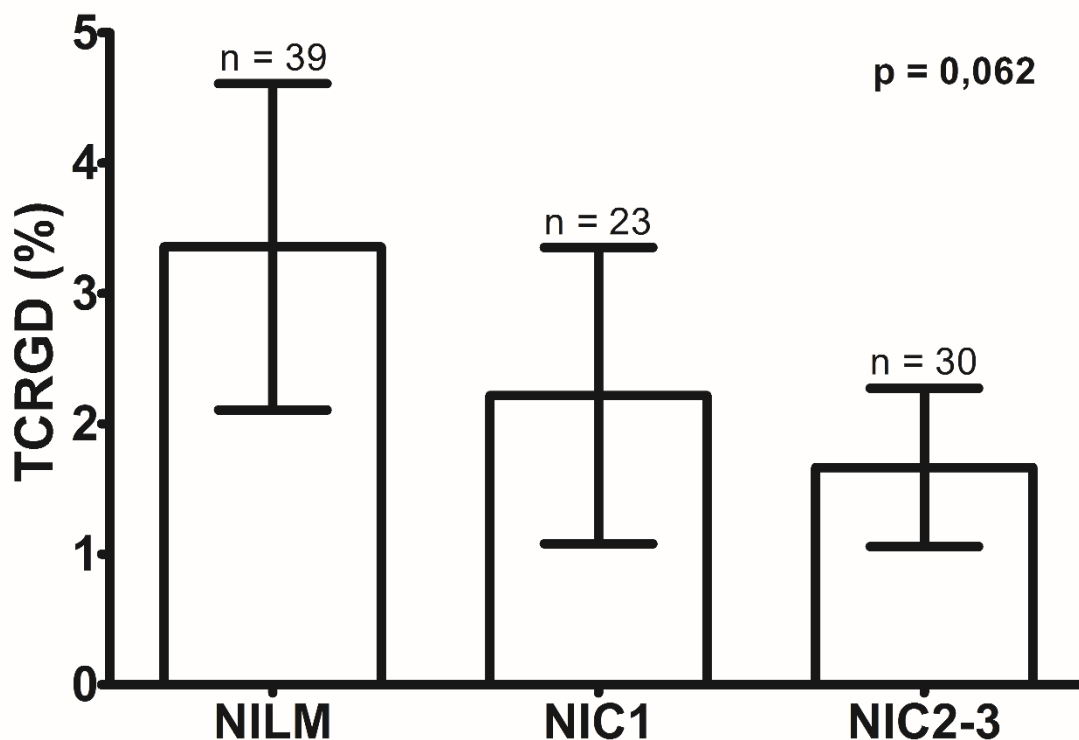
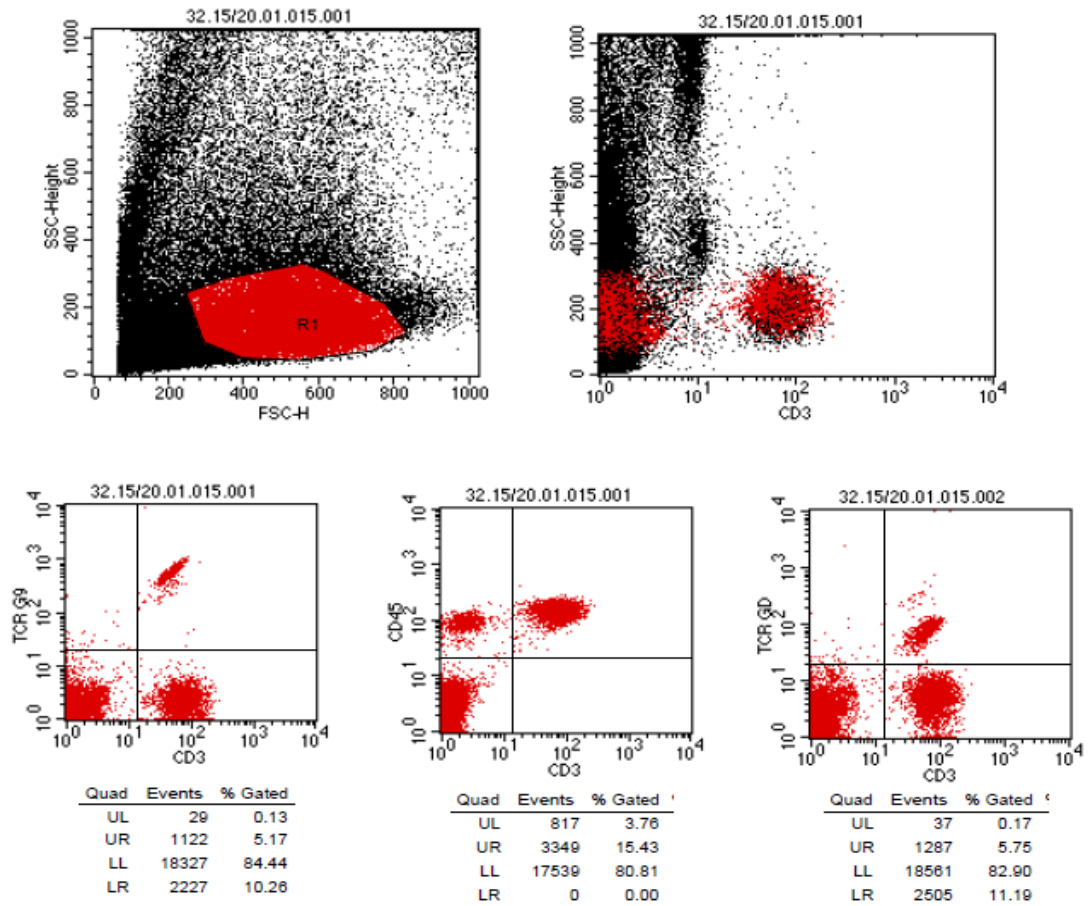


Figura 4. Histogramas apresentando a intensidade da marcação FSC e SSC para células T $\gamma\delta$ em uma amostra de paciente com lesão de alto grau. A região em vermelho representa a área de marcação para linfócitos



6. DISCUSSÃO

O estudo da resposta imune local e sistêmica em pacientes com neoplasias intra-epiteliais cervicais de baixo e alto grau até a progressão para o câncer cervical é alvo de intensos estudos pela comunidade científica. Com objetivo de se entender os mecanismos imunes contra a infecção, à busca de biomarcadores que possam prever o “comportamento” tumoral é especialmente importante no contexto do câncer, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença. Escassos são os estudos que correlacionam o papel das células T $\gamma\delta$ com as neoplasias cervicais intraepiteliais de alto grau e câncer cervical, visto que até o presente momento não há um estudo na literatura que observe a relação entre as células T $\gamma\delta$ e as neoplasias intra-epiteliais cervicais e câncer cervical.

Os dados epidemiológicos observados sugerem que o câncer cervical e as neoplasias precursoras são patologias de grande importância em Saúde Pública, visto que a cada ano são diagnosticados 500.000 casos em todo mundo, configurando-se o segundo tipo mais comum entre as mulheres. Em relação aos fatores de risco relacionados à oncogênese cervical podemos dividi-los em dois grandes grupos, a saber: os documentados experimentalmente e os clínicos ou epidemiológicos. Dentre os classificados no primeiro grupo, podem-se citar os fatores imunológicos (resposta imune local e sistêmica), o *background* genético (como o polimorfismo da proteína p53), o tabagismo, o uso prolongado de contraceptivos orais e as co-infecções, como por exemplo, a associação com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). No que se refere aos fatores de risco clínicos ou epidemiológicos, destaca-se o início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros, a baixa escolaridade e renda familiar, a multiparidade, a história de DST, higiene íntima inadequada, tais variáveis têm sinalizado como co-fatores que favorecem a persistência da infecção por HPV e as neoplasias precursoras para o carcinoma cervical.

Em nosso estudo, a comparação entre as variáveis sócias demográficas (estado civil, uso de preservativo, contraceptivos, idade, escolaridade, uso de cigarro) entre os grupos de pacientes com neoplasias cervicais intra-epiteliais e as do grupo sem lesão, assim como para a quantificação da subpopulação dessas células nos grupos estudados, não se encontrou diferenças estatisticamente significativas, com valores de $p > 0.05$ para todas as variáveis analisadas. Por mais que a imunofenotipagem das

células T $\gamma\delta$ presentes no sangue periférico (plasma) tenham sido realizados por meio da técnica da citometria de fluxo, que é uma metodologia quantitativa e bastante confiável, provavelmente o que contribuiu para os valores de $p>0.05$ encontrados trabalho, é o n amostral reduzido de pacientes arrolados no estudo (92 pacientes); pretende-se aumentar o número de pacientes nos grupos estudados, a fim de, obterem-se resultados significativos para as variáveis selecionadas, além de que acrescentar um grupo de pacientes com o câncer cervical, a fim de quantificar os percentuais de linfócitos T $\gamma\delta$ nesse grupo, observando se há diferenças com os grupos sem lesões e com as NICs. Um outro fator que pode explicar valores de $p> 0,05$ foi o grau de dispersão dentro de cada grupo, o que justificar ampliar e continuar os estudos, a fim de buscar valores de $p<0,05$.

No estudo de CORNELIS et al.,2003 observou que, as mulheres com neoplasias cervicais intra-epiteliais de NIC1 e que usaram preservativo durante a relação sexual tiveram uma regressão da lesão cervical em torno de 53%, contra 35% no grupo que não usou, com resultado estatisticamente significativo ($p = 0,03$). No nosso estudo foi verificado que nenhuma paciente com lesão de alto grau não costuma utilizar sempre o preservativo durante as relações sexuais. ($p=0,102$). Com relação às variáveis uso de tabaco e uso de método contraceptivos, não encontrou-se resultados estatisticamente significativos, com valores de $p =0,524$ e $p=0,420$ respectivamente, embora no estudo realizado por MURTA et al.,2001 constatou-se que a infecção pelo HPV foi mais frequente em adolescentes que eram usuárias de contraceptivos orais($p<0,01$). No estudo de APPLEBY et al., 2007, observou-se com base em 24 estudos ao redor do mundo, que 16.573 mulheres com Câncer cervical e 35.509 sem a doença; viu-se que o risco relativo para o desenvolvimento do câncer cervical foi maior nas mulheres que utilizavam contraceptivos orais e fumantes, variáveis que estão intimamente correlacionados ao aumento do risco para desenvolvimento e progressão das lesões cervicais até o câncer cervical. De acordo com MORENO et al., 2002 o uso a longo prazo de contraceptivos orais pode ser um cofator que aumenta o risco de carcinoma cervical em até quatro vezes em mulheres que são positivas para DNA do HPV no colo do útero. Ao que tudo indica mecanismos hormonais presentes nos anticoncepcionais, promoveriam a persistência da infecção pelo HPV, além da manutenção da forma epissomal viral, que posteriormente se integraria ao genoma do hospedeiro (CASTELLSAGUÉ, 2001). Por outro lado, em estudos realizados por SCHIFFMAN et al., 2005; LACEY et al., 1999 não foi encontrado relação entre aumento do risco para

desenvolvimento de neoplasias intra-epiteliais cervicais e câncer cervical em mulheres que faziam uso de contraceptivos orais. Estudos epidemiológicos observaram uma relação entre o hábito de fumar e o aparecimento de neoplasias intra-epiteliais cervicais (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006). O tabaco promove a diminuição do número das células de Langherans no colo uterino, importantes células apresentadoras de antígenos e ativadoras das respostas imunes pelas células T; o que estar intimamente relacionado a persistência viral (VILLA, 1997).

Com relação à expressão das células T $\gamma\delta$ ainda não é conhecido os mecanismos de ação exercidos no câncer cervical. Já em alguns trabalhos com esta subpopulação celular, apontam para algumas ações protumorais, tanto em camundongos como em humanos através da modulação de algumas células do sistema imunológico, em trabalhos abrangendo outros tipos de câncer, como por exemplo, com pacientes com câncer de mama, cólo retal, observou-se em um estudo realizado por REI et al., 2015 que os linfócitos T $\gamma\delta$ regulatórios promoveram o bloqueio da maturação das células dendríticas e inibição das respostas imunes mediadas pelos linfócitos TCD4+ e TCD8+, assim como o recrutamento de células supressoras da linhagem mielóide(MDSC) respectivamente.

Há pouca informação disponível sobre o comportamento da expressão das células T $\gamma\delta$ nas neoplasias intraepiteliais cervicais. Um estudo relatou que as ações das células T $\gamma\delta$ em modelos com murinos e humanos ainda permanece incerta, enquanto que em alguns experimentos elas apresentaram atividades antitumorais, por meio da produção de citocinas antitumorais, como INF-y e TNF que provocaram a morte das células tumorais. Por outro lado, um efeito protumoral exercido por meio da produção de IL-17 foi capaz de sobrepor-se ao efeito exercido pelo INF-y (REI; PENNINGTON; SILVA-SANTOS, 2011) As funções tumorais obtidos pela produção da IL-17 promovem crescimento tumoral por meio da produção de certos subtipos de células T $\gamma\delta$, que promovem imunossupressão por meio do recrutamento de células imunossupressoras da linhagem mielóide e/ou pequenos macrófagos peritoniais do sangue periférico, promovendo angiogênese, crescimento tumoral por meio da diferenciação das células T regulatórias (Tregs). Além disso, as células T $\gamma\delta$ produzem citocinas, como IL-4, IL-10 e/ou TGF- β que promovem a supressão da maturação das células dendríticas e/ou funções efetoras das células T $\gamma\delta$. (SANTOS-SILVA; SERRE; NORELL, 2015; PENNINGTON; SILVA-SANTOS, 2015).

Observou-se em nosso estudo que a percentual dos linfócitos T $\gamma\delta$ foi um pouco maior no grupo de pacientes sem neoplasias intra-epiteliais cervicais (3,26%) do que nos grupos com lesões cervicais de baixo (3,12%) e alto grau (2,35)% (Tabela 3), o que pode-se inferir que essa subpopulação poderia estar conferindo um efeito protetor contra a progressão das lesões, o que poderia ser confirmado com mais técnicas que refletissem o microambiente das lesões intraepiteliais cervicais, o perfil de citocinas que são encontradas atuando à nível tecidual e periférico. De acordo com LAFONT et al., 2014 as células T $\gamma\delta$ podem contribuir para uma resposta imune antitumoral em uma grande variedade de tumores, como por exemplo: Linfomas, melanomas, mama, colon, pulmão, ovário, próstata por meio da produção de citocinas citotóxicas e estímulo sobre outras células, como linfócitos TCD8+ e células dendríticas.

Dado o impacto putativo na bioatividade das células T $\gamma\delta$, os nossos dados sugerem que as células T $\gamma\delta$ podem desempenhar um papel na patogênese das lesões intra-epiteliais cervicais através da modulação da resposta imune, favorecendo a progressão de lesões. Isto implica que as células epiteliais e endoteliais podem ter um papel importante imunomodulador produzindo as células T $\gamma\delta$ e possivelmente outras moléculas com funções semelhantes, para controlar a inflamação e células do sistema imunológico no meio do colo do útero.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho é de grande relevância e originalidade, contudo tivemos alguns atrasos na logística para execução das etapas o que culminou no não fechamento de todos os experimentos propostos no trabalho em tela. No presente momento, as pacientes com câncer cervical estão sendo arroladas no Hospital da LIGA Norte-riograndense contra o câncer, hospital de referência do estado no tratamento do câncer. No início, acordou-se apenas arrolar as pacientes diagnosticadas com câncer cervical e sem tratamento, a fim de quantificar nesse grupo o percentual de células Ty δ e comparar estes resultados com os obtidos no trabalho nos grupos de pacientes com neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs 1, 2 e 3) e em pacientes sem neoplasia. Em virtude da dificuldade de encontrar pacientes com esse perfil, resolveu-se inserir no grupo as pacientes diagnosticadas com câncer cervical e que já tinham iniciado tratamento. No total, pretende-se arrolar trinta pacientes com câncer cervical, contudo até o momento, observou-se a partir dos resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo na população estudada um aumento da subpopulação de células Ty δ no grupo de pacientes com câncer cervical, contudo devido o pequeno número de amostras analisadas ainda é muito precoce fechar uma conclusão nessa casuística.

A tipagem do papilomavírus humano (HPV) é outra meta a ser feita a curto prazo, no presente momento, já foram coletada as escovas endocervicais das pacientes com NICs e sem neoplasias. Para concluir essa etapa falta inserir as coletas das pacientes com câncer cervical e a entrega dos iniciadores adquiridos para que se possa realizar a tipagem dos HPVs, e assim associar nesses grupos o HPV mais prevalentes e oncogênicos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 69). Os dados obtidos com a tipagem do HPV serão correlacionados com a quantificação das células Ty δ e a presença de neoplasia e câncer cervical. Além do mais, com o propósito de se encontrar um biomarcador sistêmico a quantificação das citocinas serão realizadas.

Somada a todas essas informações supracitadas, serão compilados todos os dados demográficos, laboratoriais, clínicos e Histológicos das pacientes acometidas com câncer cervical para que possamos comparar com as pacientes com neoplasia e sem neoplasias, e qual a implicação dessa subpopulação nesses diferentes grupos estratificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDÉ, S.; ALMEIDA, G.; DO VAL.; I, et al. Neoplasia cervical intraepitelial. *Jbras Doenças Sex Transm.* v.21, n.4, p.166-170,2009.
- ALMONTE, M. et al. Cervical screening by visual inspection, HPV testing, liquid-based and conventional cytology in Amazonian Peru. *Int J Cancer*, v. 121, n. 4, p. 796-802, Aug 15 2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2016.
- ANKATHIL, R.; TAN, S. C. OP0015 Polymorphisms in apoptosis-related genes and risk of HPV-mediated cervical cancer: A case-control study. *European Journal of Cancer*, v.51, n. 2, p. 4–5, 2015.
- APPLEBY P, BERAL V, DE GONZÁLEZ BA, COLIN D. Cervical cancer prevention and hormonal contraception. *Lancet.*, v.370, n. 9599, p. 1591-1592, 2007.
- AZEVEDO, V. N. D. G. et al. Frequência das neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana adquirida. *Revista Paraense de Medicina*, v. 20, p. 35-39, 2006.
- BARTON, S. E. et al. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet*, v. 2, n. 8612, p. 652-4, 1988.
- BELINSKY, A.S; NIKULA, N,J; PALMISANO, A,W. Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis, v.95, n.20, 1998.
- BERNARD HU; BURK RD; CHEN Z et al. Classification of papillomavirus(PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendmens. *Virology*, v.25, n.401, p.70-9, 2010.
- BONDS, L. et al. Immunohistochemical localization of cdc6 in squamous and glandular neoplasia of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med*, v. 126, n. 10, p. 1164-8, Oct 2002.
- BONNEVILLE, M., O'BRIEN, R. L. & BORN, W. K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* v.10, p. 467–478, 2010.
- BORGNE, M, L; ETCHART, N; GOUBIER, A. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell cross priming in vivo. *Immunity*, v.24, n.2, p. 191-201, 2006.
- BOSCH, F. X. A scientific response to prevent cervical cancer in the world. *Vaccine*, v. 26 Suppl 12, p. v, Aug 19 2008.
- BOUVARD V, BAAN R, STRAIF K, et al: A review of human carcinogens-Part B: Biological agents. *Lancet Oncol*, v.10, p. 321-322, 2009.
- BRONOWICKA-KŁYS, E, A; LIANERI, M; JAGODZIŃSKI, P, P. The role and impact of strogens and xenostrogen on the development of cervical cancer, v. 84, p. 1945-1953, 2016.
- BUCK, C. B. et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol*, v. 82, n. 11, p. 5190-7, Jun 2008.
- BURK, R.D.; CHEN, Z.; HARARI, A.; SMITH, B.C.; KOCJAN, B.J.; MAVER, P.J.; POLJAK, M. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* v.20 p.113-23, 2011.

- CANCER FACTS AND FIGURES 2010. American Cancer Society, v. Atlanta: American Cancer Society; 2010, 2010.
- CARDING, S. R. & EGAN, P. J. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* v.2, p.336–345, 2002.
- CASTELLSAGUÉ X. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. 19^o International Papillomavirus Conference. Florianópolis, Brasil, 2001.
- CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUNOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*, v. 89, n. 2, p. 191-9, Nov 2002.
- CASTLE PE, SCHIFFMAN M, WHEELER CM, SOLOMON D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol.* v.113, n.1, p.18-25, 2009.
- CLIFFORD, G. M.; GONCALVES, M. A.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS*, v. 20, n. 18, p. 2337-44, Nov 28 2006.
- COMMITTEE ON PRACTICE BULLETINS—GYNECOLOGY ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. *Obstet. Gynecol.* v. 120, p. 1222–1238, 2012.
- COUILLÉE, F, ROULEAU D, PETIGNAT P, et al: Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGM1 primers and the linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, v.44, p.1998-2006, 2006.
- CORNELIS et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: A randomized clinical trial. *v.107, n.5, p. 811–816, 2003*
- CURIEL, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* v.117, p. 1167–117, 2007.
- D'SOUZA, G.; KREIMER, A.R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W.M.; WESTRA, W.H.; GILLISON, M.L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* v. 356, p. 1944–1956, 2007.
- DA ROSA, M, I. O papilomavírus humano e lesões do colo uterino, Tese de doutorado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- DALING, J.R.; MADELEINE, M.M.; JOHNSON, L.G.; SCHWARTZ, S.M.; SHERA, K.A.; WURSCHEER, M.A.; CARTER, J.J.; PORTER, P.L.; GALLOWAY, D.A.; MCDUGALL, J.K. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*, v. 101, p. 270–280, 2004.
- DE SANJOSÉ, S et al., Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta- analysis. *The lancet infectious diseases* , v.7, n.7, p.453-459, 2007.
- DE VILLIERS, E.M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 445, p. 2–10, 2013.
- DEHN, D.; TORKKO, K. C.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, v. 111, n. 1, p. 1-14, Feb 25 2007.
- DOORBAR, J. et al. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*, v. 178, n. 1, p. 254-62, Sep 1990.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, Mar 2005.
- DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I.G.; STOLER, M.; BROKER, T.R.; STANLEY, M.A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*.v.20,n. 30, p.55-70, 2012.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, v. 127, n. 12, p. 2893-917, 2010.

FONSECA-MOUTINHO, J. A. Smoking and cervical cancer. *ISRN Obstet Gynecol*, v. 2011, p. 847684, 2011.

FRAZER IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship. *Virology*, v.384, n.2, p.410-414, 2009.

GAO Y, YANG W, PAN M, SCULLY E, GIRARDI M, AUGENLICHT LH, et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med*, v.198, p. 433-442, 2003

GROSS, G. AND TYRING, S.K. *Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases*. Springer Verlag, Heidelberg, 2011.

HALLOUSH MD, RUBA A et al. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 Immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervico vaginal material. *Cancer cytopatology*,v.114, n.6, p. 474–480, 2008.

HARRIS, T. G. et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and human papillomavirus test results. *JAMA*, v. 293, n. 12, p. 1471-6, 2005.

HASAN UA, ZANNETTI C, PARROCHE P, et al: The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med*, v. 210, p.1369-1387, 2013.

HAYDAY, A. C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*, v.31, p.184–196, 2009.

HEISE, A. The clinical significance of HPV. *Nurse Pract*, v. 28, n. 10, p. 8-19; quiz 20-1, Oct 2003.

HELLBERG, D. et al. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol*, v. 158, n. 4, p. 910-3, Apr 1988

HERRERO, R. et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*, v. 191, n. 11, p. 1796-807, Jun 1 2005

HOLMES, K.; EGAN, B.; SWAN, N.; MORAIN, C.O. Genetic mechanisms and aberrant gene expression during the development of gastric intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *Curr Genomics*, v.8, p. 379–97, 2007.

HASAN, U, A; ZANNETTI, C; PARROCHE,P et al. The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *The journal of experimental Medicine*, v.210, n.7, p. 1369, 2013.

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomavirus. Lyon. v.64 1995.

INCA, Instituto Nacional de Câncer, 2016.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13541 women with carcinoma of the cervix and 23017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*, v.118, p.1481-1495, 2006.

INTERNACIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans human papillomavirus. V.90, p.636, 2007).

IZADI-MOOD, N; SARMADI, S; EFTEKHAR, Z. Immunohistochemical expression of p16 and HPV L1 capsid proteins as predictive markers in cervical lesions. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v.289, n.6, p. 1287–1292, 2014

LIMA JUNIOR, Sérgio Ferreira de et al. Influence of IL-6, IL-8, and TGF- β 1 gene polymorphisms on the risk of human papillomavirus-infection in women from Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 111, n. 11, p. 663-669, Nov. 2016.

JUNG, HUN SOON; RAJASEKARAN, NIRMAL; JU, WOONG; SHIN, YOUNG KEE. Human Papillomavirus: Current and Future RNAi Therapeutic Strategies for Cervical Cancer. *J. Clin. Med*, v.4, n.5, p.1126-1155, 2015.

KIM H, KWON B AND SIN JI: Combined stimulation of IL-2 and 4-1BB receptors augments the antitumor activity of E7 DNA vaccines by increasing Ag-specific CTL responses. *PLoS One* 8: e83765, 2013.

KIM,H,D ;NELSON ;H,H ;WIENCKE et al. *Molecular Biology and Genetics.*, v.61,n.8, 2001.

KONTOSTATH ; ZOIDAKIS ; MAKRIDAKIS et al. Cervical Cancer Cell Line Secretome Highlights the Roles of Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein ig-h3, Peroxiredoxin-2, and NRF2 on Cervical Carcinogenesis. *Hindawi*, v. 2017, p.15, 2017.

KOSHIOL,J ; SKLAVOS,M ; WENTZENSEN, N. Evaluation of a multiplex panel of immune-related markers in cervical secretions: A methodologic study. *Internacional Journal of cancer* , v.134,n.2,p. 411–425,2014.

LACEY JV, BRINTON LA, ABBAS FM et al. Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 4, p.459-467, 1999.

LANÇA T, COSTA MF, GONÇALVES-SOUSA N, REI M, GROSSO AR, PENIDO C, et al. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic T $\gamma\delta$ lymphocytes to tumor beds. *J Immunol*, v.190, p.6673-6680, 2013.

LANÇA, T,; SILVA-SANTOS B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: implications for cancer surveillance and immunotherapy. *Onco immunology*, v.1, p.717-725, 2012.

LEA, J. S. et al. Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol*, v. 190, n. 3, p. 674-9, 2004.

LEBORGNE, F; LEBORGNE, JH; DOLDAN,R. Induction chemotherapy and radiotherapy of advanced cancer of the cervix: a pilot study and phase III randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v.37, n.2, p.343–350, 1997.

LEE, BN, FOLLEN, M, SHEN DH, MALPICA A, ADLER-STORTHZ K, SHEARER WT, et al. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesion. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 11, n.2, p. 239-244, 2004.

LEGUT, M; COLE, D, C; SEWELL,A,K. The promise of $\gamma\delta$ T cells and the $\gamma\delta$ T cell receptor for cancer immunotherapy. *Cellular and molecular immunology*, v.12, p. 656–668, 2015.

MA C, ZHANG Q, YE J, WANG F, ZHANG Y, WEVERS E, et al. Tumor-infiltrating T gamma delta lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol*, v. 189, p. 5029-5036, 2012.

MCCBRIDE, A.A. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, v. 445, p.57-79, 2013.

MCCREDIE MR, SHARPLES KJ, PAUL C, BARANYAI J, MEDLEY G, JONES RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*,v.9, n.5, p.425-434, 2008.

MIDDLETON K, PEH W, SOUTHERN S, GRIFFIN H, SOTLAR K, NAKARA T. et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol*, v.77, n.19, p. 101-201, 2003.

MOODY, C.A.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer*, v.10, p. 550-560, 2010.

MORENO et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. v.359, n.9312, p. 1085–1092, 2002.

MUNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, v. 89, n. 2, p. 213-28, Nov 2002.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, v. 348, n. 6, p. 518-27, 2003.

MURTA et al. Infecção pelo Papilomavírus Humano em Adolescentes: Relação como método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos. *RBGO* - v. 23, nº 4, 2001.

NGUYEN, HN; NORDQVIST, SR. Chemotherapy of advanced and recurrent cervical carcinoma. *Semin Surg Oncol*, v.16, n.3, p.247–250, 1999.

NISHAT, R; BEHURA, SS; RAMACHANDRA, S; HARISH, KUMAR , A B. Human Papilloma Virus (HPV) Induced Head & Neck Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Retrospect. 2015, v. 9, n. 6, p. ZE01 - ZE04.

PANG, X; ZHANG, Y; WEI, H et al. Expression and Effects of High-Mobility Group Box 1 in Cervical Cancer. v. 15, n.5, p. 8699-8712,2014.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, v. 55, n. 2, p. 74-108, Mar-Apr 2005

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin*, v.55, p.74-108, 2005.

PECORELLI, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, v.105, n.2, p. 103-104, 2009.

PENG G, WANG HY, PENG W, KINIWA Y, SEO KH, WANG R-F. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity*, v.27, p.334-348, 2007.

PINTO,A,L; EDWARDS,J; CASTLE,P. Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 in Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles. *The journal of infectious diseases*, v.188, n.2, 327-338, 2003.

- POPPE, W. A. et al. Langerhans' cells and L1 antigen expression in normal and abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. *Gynecol Obstet Invest*, v. 41, n. 3, p. 207-13, 1996.
- RAFF AB; WOODHAM AW, RAFF LM. The evolving field of human papillomavirus receptor research: A review of binding and entry. *J Virol*, v.87, n.11, p.6062-6072, 2013.
- REI, M., PENNINGTON, D. J. & SILVA-SANTOS, B. The emerging protumor role of $\gamma\delta$ T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. *American association of Cancer research*, v.75, n.5, 2015.
- RICHART RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*, v. 75, p.131-133, 1990.
- RILEY, R.R.; DUENSING, S.; BRAKE, T.; MUNGER, K.; LAMBERT, P.F.; ARBEIT, J.M. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res*, v.63, p.4862-4871, 2003.
- SALAZAR, E. L. et al. [Influence of the use of oral contraceptives as risk factors for human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia]. *Ginecol Obstet Mex*, v. 73, n. 2, p. 83-9, Feb 2005.
- SANTOS-SILVA B.; SERRE, K.; NORELL, H. $\gamma\delta$ T cells in câncer. *Nature reviews immunology*, v. 15, 2015.
- SCHIFFMAN M, HERRERO R, DESALLE R et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, v.337, p.76-84, 2005.
- SCHIFFMAN M, RODRIGUEZ AC. Heterogeneity in CIN3 diagnosis. *Lancet Oncol*, v.9, n.5, p.404-406, 2008.
- SCHLICHTE, J, M; GUIDRY, J. Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines. *J Clin Med*, v.4, n.5, p.918-932, 2015.
- SCHNEIDER, A. The value of morphological procedures for HPV diagnosis. *Gynakologe*, v. 23, n. 6, p. 341-8, Dec 1990.
- SHARMA A, RAJAPPA M, SAXENA A, SHARMA M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int J gynecol Cancer*, v. 17, n.4, p.879-885, 2007.
- SHENG et al. Clinical Value of Serum HMGB1 Levels in Early Detection of Recurrent Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix: Comparison with Serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA Levels. v.50,p.455-464,2009.
- SIMONS, A. M.; PHILLIPS, D. H.; COLEMAN, D. V. Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. *BMJ*, v. 306, n. 6890, p. 1444-8, May 29 1993.
- SOLOMON D, DAVEY D, KURMAN R et al. The 2001 Bethesda system.
- SONG, S.; PITOT, H.C.; LAMBERT, P.F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J. Virol*, v.73, p. 5887-5893, 1999.
- STANLEY MA. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology.*, v. 109, p.15-21, 2008.
- STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*, v. 117, n. 2 Suppl, p. S5-10, May 2010.

SONG, D; LI,H; LI,H. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncology Letters*, v.10, 2015.

SURVILADZE ,Z; DZIDUSZKO,A; OZBUN,MA et al. Essential Roles for Soluble Virion-Associated Heparan Sulfonated Proteoglycans and Growth Factors in Human Papillomavirus Infections. *Plos pathogens*, v.9,2012.

TANAKA, T; YUKAWA, K,; UMESAKI, N.Effective chemoradiotherapy protocol with 5-fluorouracil for cervical squamous cell carcinoma in vitro. *Eur J Gynaecol Oncol*, v. 27, n.3, p.243-246, 2006.

Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, v.287, p.2114-2129, 2002

THOMISON, J., 3RD; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*, v. 39, n. 2, p. 154-66, Feb 2008.

TORNESELLO, M. L; BUONAGURO, L; ROSSI, D. G; BUONAGURO, M. F. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed research International*, v.10, p.10, 2013.

VANTOUREOUT, P. & HAYDAY, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* v.13, p. 88–100, 2013.

VILLA LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Cancer Research*, v.71, p.321-325, 1997.

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. *Lancet*, v. 361, n. 9376, p. 2217-25, 2003.

WANG SS, HILDESHEIM A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*.v. 31, p. 35-40, 2003.

WANG, H. Y., R. F. WANG. Regulatory T cells and cancer. *Curr. Opin. Immunol*, v.19, p. 217–223, 2007.

WHEELER, C. M. Advances in primary and secondary interventions for cervical cancer: human papillomavirus prophylactic vaccines and testing. *Nat Clin Pract Oncol*, v. 4, n. 4, p. 224-35, Apr 2007.

WITHERDEN, D. A., W. L. HAVRAN. Molecular aspects of epithelial $\gamma\delta$ T cell regulation. *Trends Immunol*, v. 32, p. 265–271, 2011.

WRIGHT TC JR, MASSAD LS, DUNTON CJ, SPITZER M, WILKINSON EJ, SOLOMON D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol*, v.197, n.4, p.346-355, 2007.

WORD HEALTH ORGANIZATION: Ico Information center on human papilloma virus (HPV) and cervical cancer human papillomavirus and related cancers in Brazil. Disponível em www.who.int/centre Acesso em 2010 em 17 de Novembro.

WORDL HEALTH ORGANIZATION Internaonal Agency for research and cancer world cancer report 2008. Acesso em 18 de Novembro de 2016.

XIONG, N; RAULET, D, H. Development and selection of $\gamma\delta$ T. *Immunological reviews*, v.215, n.1, 2007.

XUEKUN H, QINTAI Y, YULIAN C, GEHUA Z. Correlation of gammadelta-T-cells, Th17 cells and IL-17 in peripheral blood of patients with allergic rhinitis Asian Pac J Allergy Immunol v.32, p.235-239, 2014. .

ZANETTA, G; FEI, F; MANGIONI, C. Chemotherapy with paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin for the treatment of squamous cell cervical cancer: the experience of Monza. *Semin Oncol*, v.27, n.1, p, 23-27, 2000.

ZEIDEL, A. et al. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand*, v. 46, n. 8, p. 959-64, Sep 2002.

ZENG, C; YAO, Y; JIE, W. Up- regulation of Foxp3 participates in progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v.62, n.3, p. 481–487, 2013.

ZHENG, N. et al. Up-regulation of HLA-G expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Tissue Antigens*, v. 77, n. 3, p. 218-24, Mar 2011.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002