

PAULO JOSÉ MALUF

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE E DO TIPO DE PAPILOMAVÍRUS
HUMANO NA EVOLUÇÃO DE PACIENTES CONIZADAS POR
NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL GRAU III**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração Patologia Ginecológica e Obstétrica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin

Março, 2007

Catálogo-na-fonte: Biblioteca da UFTM

M227e Maluf, Paulo José.

Estudo da resposta imune e do tipo de papilomavírus humano na evolução de pacientes conizadas por neoplasia intra-epitelial cervical grau III / Paulo José Maluf. - - 2007.

91 f. : tab. ; graf. ; fig. ; il.

Tese (Doutorado em Patologia Ginecológica e Obstétrica) –
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG,
2007.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta.

1. NEOPLASIA DO COLO UTERINO. 2. INFILTRADO INFLAMATÓRIO. 3.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gontran (*in memoriam*) e Maria,
pelos ensinamentos e exemplos de vida.

À minha esposa Angela e aos meus filhos Paulo
e Elisa, pelo auxílio, compreensão e incentivo
constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pelo exemplo de dedicação à pesquisa, pelo auxílio e orientação na realização deste estudo.

À Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin, pelo incentivo e pela co-orientação do projeto.

À Dra. Renata Margarida Etchebehere, pela colaboração em todas as fases do trabalho e, em especial, pelos ensinamentos de patologia e imunoistoquímica.

À Profa. Sheila Jorge Adad, pela disponibilidade em auxiliar sempre que solicitada.

À Dra. Ana Paula Sarreta Terra, pela colaboração e apoio na realização da tipagem viral realizada no trabalho.

Ao Prof. Dr. Cléber Sérgio da Silva, pelo companheirismo e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Vicente de Paula Antunes Teixeira, ex-coordenador de pós-graduação, pelo estímulo e apoio desde o meu ingresso no curso.

À Eliângela de Castro Côbo, pelo apoio técnico e ensinamentos no laboratório de imunoistoquímica.

Às funcionárias da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, Kelly, Aparecida e, em especial, à Viviane, pela contribuição no desenvolvimento deste projeto.

À bibliotecária Elisabete Perez Caramori Ambrósio, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas.

A todos os funcionários do Serviço de Patologia Cirúrgica e do Curso de Pós-graduação em Patologia, pelo carinho e pela atenção.

Aos meus colegas de trabalho: residentes, médicos, professores, enfermeiras e demais componentes da equipe de saúde, pelo convívio diário na assistência aos casos de Ginecologia e Obstetrícia.

Às pacientes, por representarem a razão de ser de todo nosso trabalho.

A todos aqueles que, mesmo não citados, contribuíram de alguma forma para esta realização.

A Deus, que a tudo nos conduz.

SUMARIO

INTRODUÇÃO.....	1
HIPÓTESE	20
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL E MÉTODO.....	24
<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</i>	34
<i>ASPECTOS ÉTICOS.....</i>	34
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	52
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração de peça cirúrgica de cone do colo uterino, ainda sem fixação, apresentando mucosa avermelhada, lisa e brilhante e face cruenta predominantemente branco-rosada e esfarpada. Ponto com fio de sutura colocado às 12 horas para orientação..... 32
- Figuras 2 e 3.** Fotomicrografias de cortes histológicos de colo uterino com neoplasia intra-epitelial escamosa cervical grau III (NIC III). Hematoxilina-eosina – aumentos de 100 e 400X, respectivamente..... 33
- Figura 4.** Gráfico da distribuição de marcação forte de linfócitos B (CD20), linfócitos T (CD3, CD45RO e CD8), macrófagos (CD68) e células que expressam iNOS em mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva 40
- Figura 5.** Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar linfócitos B corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD20, grau 3 – aumento de 200X..... 42
- Figura 6.** Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar macrófagos corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD68, grau 1 – aumento de 200X..... 42
- Figura 7.** Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar linfócitos T corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD45 RO, grau 3 – aumento de 200X..... 42
- Figura 8.** Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar linfócitos T CD3 positivos corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD3, grau 2 – aumento de 200X..... 42
- Figura 9.** Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar ausência de linfócitos T CD8 positivos corados através da imunistoquímica pelo anticorpo CD8, grau 0 – aumento de 200X..... 42
- Figura 10.** Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar ausência de células coradas através da imunistoquímica pelo anticorpo iNOS, grau 0 – aumento de 200X..... 42

- Figura 11** – Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do fragmento de 110bp do gene da β -globina..... 44
- Figura 12.** Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e na penúltima canaleta, amplificação do fragmento de 150bp GP5/GP6 (controle positivo)..... 44
- Figura 13.** Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 2, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do DNA do HPV 6/11..... 44
- Figura 14.** Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do DNA do HPV 16..... 44
- Figura 15.** Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do DNA do HPV 18..... 44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca para CD20, marcador de linfócitos B..... 37
- Tabela 2.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca para macrófagos (CD68)..... 37
- Tabela 3.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células T CD45RO positivas..... 38
- Tabela 4.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células T CD3 positivas. 38
- Tabela 5.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células T CD8 positivas. 39
- Tabela 6.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células que expressam iNOS. 39
- Tabela 7.** Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a tipagem do HPV 6/11, 16 e 18. 43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos utilizados, classes, subclasses, diluições e marcação proposta	26
Quadro 2. Opção terapêutica nos 9 casos que apresentaram recidiva de NIC III durante o seguimento clínico.....	36
Quadro 3. Resultados dos exames anátomo-patológicos dos 9 casos que apresentaram recidiva durante o seguimento clínico.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula apresentadora de antígeno

CD – *Cluster of differentiation*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HPV – Papilomavírus humano

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical

NK – *Natural killers*

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

PBS – *Phosat busser saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

TCR – Receptor de célula T

INTRODUÇÃO

1. O câncer do colo uterino

Há 50 anos o carcinoma cervical era a principal causa de morte por câncer nos Estados Unidos. Entretanto, as taxas de incidência e de mortalidade declinaram significativamente desde 1960 (KUMAR *et al.*, 2005). Acredita-se que a diminuição da incidência, bem como da morbidade e da mortalidade, decorrem em parte do rastreamento através da citologia esfoliativa, que permitiu o diagnóstico de lesões precursoras tratáveis (GRAY, 1995).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta o câncer de colo do útero como a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo superado apenas pelo câncer de pele (não melanoma) e pelo câncer de mama, constituindo a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres. Estimam-se ainda cerca de 19.260 novos casos dessa doença para o ano de 2006 no Brasil (INCA, 2007).

A *American Cancer Society* (ACS) estima em 11.150 o número de novos casos de câncer cervical invasivo nos Estados Unidos para 2007, e em 3.670 o número de mortes (ACS, 2007). Nos casos de estadiamento inicial o prognóstico é bom, porém geralmente um terço das pacientes evolui para a morte (SAUER *et al.*, 2003).

As neoplasias escamosas intra-epiteliais cervicais representam por ano quase 1 milhão de novos casos nos Estados Unidos (KUMAR *et al.*, 2005).

Desde 1974, um possível papel do papilomavírus humano (HPV) na etiologia do câncer ano-genital tem sido suspeitado, reconhecendo-se sua capacidade de induzir lesões no trato genital feminino, que podem evoluir como neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e posteriormente carcinoma invasivo (ZEHBE *et al.*, 1996; MOTA *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2005).

O HPV é considerado agente causal do câncer cervical em mulheres, bem como de outros órgãos genitais, mucosas e pele (FEOLI – FONSECA *et al.*, 2001). É um ácido desoxirribonucléico (DNA) vírus epiteliotrófico, pertencente à família *Papovaviridae*, na maioria das vezes transmitido sexualmente, que causa cerca de 30 milhões de novas infecções por ano (BOSCH *et al.*, 1992; MERKELBACH-BRUSE *et al.*, 1999).

A infecção pelo HPV é reconhecida como uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns (MUÑOZ *et al.* 1994; GJOEN *et al.*, 1996). Há significativa variação na prevalência da infecção pelo HPV, de 4 a 70% em pacientes com citologia normal, e de 25 a 100% em mulheres com citologia positiva para HPV e/ou displasia (GJOEN *et al.*, 1997).

Pacientes que entram em contato com o HPV, na sua maioria, apresentam-se livres do vírus dentro de um ano, devido à resposta imune (DE JONG *et al.*, 2004; AULT, 2006).

A NIC pode permanecer em um estágio não invasivo por até vinte anos e desprender células anormais que podem ser detectadas pelo exame citológico, o que aumenta a eficácia da citologia na prevenção desse câncer. Não evolui necessariamente para um câncer, podendo inclusive regredir espontaneamente. O risco de persistir ou evoluir para um câncer aumenta de acordo com a gravidade da displasia (KUMAR *et al.*, 2005). Além disso, vários estudos indicam que a persistência da infecção pelo HPV, principalmente de alto risco, é necessária para o desenvolvimento e progressão da NIC para carcinoma invasivo (MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006).

Nas neoplasias intra-epiteliais, o arranjo das células escamosas da ectocérvice fica desorganizado, e as células, atípicas. Quando a desorganização ocorre apenas no terço profundo, temos a displasia leve ou NIC grau I. Quando a desordenação envolve os dois terços profundos da espessura do epitélio, preservando apenas as camadas mais

superficiais, temos a displasia moderada ou NIC II. Se o desarranjo é observado em toda a espessura, envolvendo mais de dois terços do epitélio, temos a NIC III ou o carcinoma *in situ*. A lesão intra-epitelial escamosa cervical de alto grau compreende as NIC graus II, III e carcinoma *in situ* (NEVES *et al.*, 2005).

2. A infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV é o maior fator de risco para o desenvolvimento de NIC e do carcinoma invasivo. Clinicamente os vírus têm sido subdivididos entre grupos de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 44) e de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33). O grupo de baixo risco não tem sido associado ao carcinoma cervical e NIC de alto grau (SHEPHERD *et al.*, 1996; LERTWORAPREECHA *et al.*, 1998; KLEINE-LOWINSKI *et al.*, 1999; MERKELBACH-BRUSE *et al.*, 1999; TER HARMSEL *et al.*, 1999). Os subtipos 16 e 18 são detectados em 93% dos casos de câncer cervical e 65% dos casos de NIC III (NIMAKO *et al.*, 1997). Infecção por HPV de alto risco tem sido reconhecida como principal fator de risco para desenvolvimento de NIC e carcinoma invasivo (MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006). TER HARMSEL *et al.* (1999) detectaram o HPV em torno de 93% dos esfregaços cervicais de pacientes com NIC I, 95% com NIC II e 96% com NIC III; e nos carcinomas cervicais, o HPV foi detectado entre 84 e 100% dos casos.

A presença do HPV como infecção do colo uterino por si só não é suficiente para a oncogênese, sendo necessárias mudanças adicionais na célula hospedeira (BOS, 1995; LIN *et al.*, 2000; MUÑOZ, 2000). Processos genéticos múltiplos levam à transformação da célula e ao desenvolvimento de tumores malignos. No entanto, há necessidade de alguns eventos moleculares ocorrerem, para que se dê a progressão da doença (JOHNSON *et al.*, 1991).

Apesar dos carcinomas *in situ* e invasivo serem sem sombra de dúvidas ligados à infecção pelo HPV 16 e outros HPV de alto risco, a atenção médica para o HPV não é muito realçada nesses casos avançados. A maior importância é dada às neoplasias intra-epiteliais cervicais. A tipagem do HPV tem um importante significado no prognóstico e terapêutica das NIC pela distinção entre os tipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico (FEOLI-FONSECA *et al.*, 2001).

O papel do HPV na carcinogênese e progressão de lesões cervicais de baixo grau para alto grau, apesar de muito estudado, ainda é controverso, necessitando investigação por técnicas sensíveis e específicas para detecção e tipagem do HPV, por vezes considerada pré-requisito essencial para estudos clínicos que associam o HPV à carcinogênese (ZEHBE *et al.*, 1996; GJOEN *et al.*, 1997; MERKELBACH-BRUSE *et al.*, 1999).

As técnicas de biologia molecular modificaram o conhecimento sobre o perfil epidemiológico da infecção por HPV e permitiram seqüenciar o DNA-HPV, bem como reconhecer os diferentes subtipos do vírus (KOUTSKY *et al.*, 1988).

A hibridização *in situ*, a captura híbrida e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são técnicas moleculares comumente usadas para detecção e tipagem do HPV. Atualmente, a PCR é considerada o método mais sensível para a detecção da infecção pelo HPV, uma vez que a hibridização *in situ* é limitada pelo número de cópias de HPV (ZEHBE *et al.*, 1996; GJOEN *et al.*, 1997; MERKELBACH-BRUSE *et al.*, 1999).

A captura híbrida é um método de fácil realização e com boa sensibilidade. Entretanto, uma das limitações para seu emprego rotineiramente é o alto custo (JORDÃO *et al.*, 2003). NOMELINI (2005), em estudo realizado em nosso serviço, observou que a PCR detectou mais HPV de alto risco em relação à captura híbrida. Observou ainda que

tanto a PCR quanto a captura híbrida têm alto valor preditivo negativo para lesões de alto grau, porém a sensibilidade da PCR é melhor e o custo é menor.

Não é possível prever, com base nos aspectos cito e histológico, qual é o tipo de HPV responsável pela infecção. Os estudos sobre a relação entre o HPV e o câncer do colo uterino concentram-se principalmente nos subtipos 16 e 18, que são os mais prevalentes. Por outro lado, é comum observar infecção por mais de um tipo de HPV em um mesmo epitélio, particularmente em lesões de baixo grau (RICHART *et al.*, 1998; VERAS *et al.*, 2005). Em material de conização por NIC III em nosso serviço, detectou-se, através da PCR, DNA-HPV 16 e/ou 18 na maioria dos casos positivos (87,9%) e, apenas em 9,1% dos casos havia HPV 6 e 11 concomitantemente. Nesse estudo, o HPV 18 foi o mais frequente (78,79% dos casos), porém muitas vezes associado ao HPV 16 e raramente ao HPV 6/11 (TERRA *et al.*, 2002; TERRA, 2003). OLIVEIRA *et al.* (2003), em estudo utilizando PCR, encontraram alta taxa de HPV de alto risco tanto em lesões benignas como em lesões malignas e integração do DNA do HPV 16 em quase todos os casos de câncer cervical.

CAMARA *et al.* (2003), encontraram HPV 16 em 43,8% dos casos de NIC de alto grau e neoplasias do colo uterino. O subtipo 58 foi encontrado em 12,5% dos casos, o 31 em 10%, o 53 em 6,3% e o 18 e o 33 em 3,8% dos casos.

RABELO-SANTOS *et al.* (2003), em estudo realizado em Goiás, Brasil, detectaram DNA-HPV através da PCR em casos de NIC III e de câncer de colo uterino. O HPV 16 foi o subtipo mais freqüentemente encontrado, seguido dos subtipos 33, 18 e 31. A prevalência de HPV com subtipo não classificado foi de 6%.

ROBERTS *et al.* (2006) encontraram, através da PCR, prevalência de 32,3% de HPV 16, e 6 % de HPV 18 em 1848 biópsias cervicais. O HPV 16 foi detectado em 47,5%

e o HPV 18 em 5,9% dos casos de NIC II e NIC III. Cerca de 12% dos casos continha HPV de dois subtipos e 2,5% três subtipos. Os autores concluíram ainda que a prevalência do HPV 16 aumenta paralelamente com o grau da NIC. Por outro lado, a prevalência do HPV 18 não se altera significativamente com o aumento do grau da NIC.

3. Fatores relacionados com a recidiva da displasia após conização

A conização do colo uterino é uma cirurgia realizada para o tratamento de NIC III (WONG & CLARK, 1969). Frequentemente, também é utilizada para diagnóstico com a finalidade de exclusão de invasão (HUSSEINZADEH *et al.*, 1989). Após a conização, o comprometimento das margens cirúrgicas de ressecção por NIC ou carcinoma pode ocorrer em 10 a 45% das vezes (ENTERLINE *et al.*, 1963; SALUM *et al.*, 1995). A variabilidade desta porcentagem deve-se principalmente à experiência do cirurgião e a não visualização da margem endocervical de ressecção, sendo esta última de importância para o seguimento da paciente (SALUM *et al.*, 1995).

O envolvimento das margens cirúrgicas por NIC no resultado anátomo-patológico é frequentemente usado para prever clinicamente a presença de lesão residual. Um dos tratamentos propostos quando isso ocorre é a realização da histerectomia total. Alguns autores encontraram uma correlação direta entre o envolvimento das margens do cone e a presença de NIC residual na peça da histerectomia (ENTERLINE *et al.*, 1963; AHLGREN *et al.*, 1975; BURGHART & HOLZER, 1980; MALUF *et al.*, 2004). Entretanto, outros autores não detectaram nenhuma correlação entre estes fatores (MOORE *et al.*, 1961; SCHULMAN & CAVANAGH, 1961; OSTERGARD, 1980).

DEMOPOULOS *et al.* (1991) estudaram a influência da extensão da NIC III para as criptas e verificaram um aumento no índice de recidiva de NIC à histerectomia nessas

pacientes. Seus achados sugerem que o envolvimento glandular tem potencial de recidiva em NIC III, tendo assim valor preditivo na recidiva e/ou na doença residual.

MOURITIS *et al.* (1992) verificaram que mitoses atípicas tripolares podem ser consideradas como um critério morfológico para a progressão da NIC e por isso podem ter valor prático. Em áreas de NIC, adjacentes a carcinoma microinvasivo do colo uterino de 28 mulheres submetidas a conizações, identificaram mitoses tripolares em 93% dos casos. Nosso grupo de pesquisa em trabalho prévio verificou que o maior número de mitoses está relacionado ao maior índice de recidiva da NIC. Entretanto, não foi possível demonstrar se existe relação entre a extensão às criptas e a recidiva, como sugerem alguns autores (MALUF *et al.*, 2004).

MOORE *et al.* (1995) realizaram estudo *cohort* com 1.272 mulheres submetidas a conizações, das quais 311 foram levadas a histerectomia dentro de até um ano por doença residual. Avaliaram como possíveis fatores preditivos de doença residual os seguintes parâmetros: grau de NIC, envolvimento de margens, envolvimento de glândulas, *status* da curetagem endocervical, idade, raça, gestações e partos, *status* sócio-econômico, tabagismo e estado civil. Concluíram que o aumento da idade e da gravidade da doença foram fatores preditivos para doença residual. Em estudo semelhante, os achados de PIRES *et al.* (2000) corroboram os dados anteriores e acrescentam a associação de NIC com HPV como fator preditivo de doença residual.

Um dos motivos pelos quais não se encontra lesão residual em algumas peças de histerectomia pós-conização com margens comprometidas poderia ser o trauma cirúrgico, que pelo processo regenerativo suscitaria uma resposta imunológica (WHITE *et al.*, 1991; PHELPS *et al.*, 1994).

Não encontramos em revisão bibliográfica trabalhos que correlacionem a resposta imune local com recidiva de NIC III.

4. A resposta imunológica

O sistema imune é parcialmente derivado dos componentes do sistema hematopoiético. Estes componentes são divididos em linfócitos que especificamente reconhecem antígenos, e células efectoras que atacam microorganismos estranhos ou produtos celulares oriundos de células infectadas e estimuladas por linfócitos. Os linfócitos podem ser classificados em células B e células T. A função das células B é a secreção de anticorpos. As células T, por sua vez, são divididas em dois tipos principais que são identificadas na superfície por moléculas de diferenciação – “*cluster of differentiation*” (CD) – auxiliares (T *helper*/Th ou T CD4) e citotóxicos (Tc ou T CD8). Os linfócitos T CD4 auxiliam na resposta imune promovendo a secreção de citocinas e mediadores que ativam células da resposta imune, tais como os macrófagos e linfócitos B. Os linfócitos T citotóxicos promovem a morte de células infectadas ou tumorais, através de grânulos tóxicos (TERR & STITES, 1992). As células T CD4 reconhecem antígenos presentes no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II. As células TCD8 reconhecem antígenos presentes no MHC I. Enquanto as moléculas do MHC I são ativadas por antígenos endógenos, as do MHC II são ativadas por antígenos exógenos (STANLEY, 2005).

Existem dois tipos principais de imunidade adaptativa: a imunidade celular, responsável pela defesa contra micróbios intracelulares e a imunidade humoral, que protege contra micróbios extracelulares e suas toxinas. A imunidade celular é mediada por linfócitos T e a imunidade humoral é mediada por linfócitos B e por seus produtos

secretados, os anticorpos. Cada célula T é programada geneticamente para reconhecer um antígeno específico ligado a uma célula por intermédio de um receptor de célula T (TCR) antígeno-específico (ABBAS *et al.*, 2005).

A imunidade inata reconhece alterações, como por exemplo, aquelas causadas por células infectadas por um determinado microorganismo, e suscita a resposta imune adaptativa (antígeno-específica) (ABBAS *et al.*, 2005).

As células T citotóxicas e as células *natural killers* (NK) reconhecem e lisam as células do hospedeiro que são infectadas (DIEFENBACH & RAULET, 2002). Somado a isso, células dendríticas imaturas estão prontas para completar seu desenvolvimento sob ativação pela exposição aos antígenos (WALKER & ABBAS, 2002). Essas células são responsáveis pela apresentação de antígenos para ativação das células T, por diferentes meios que resultam em apresentação de antígenos mediados pelo MHC classes I e II. Ao contrário, as células somáticas podem apresentar somente antígenos endógenos no contexto do MHC classe I. As células T CD4 auxiliam a potencialização da resposta humoral mediada pelos linfócitos B, e a intensidade e durabilidade da resposta das células T CD8 pela síntese de citocinas (GERMAIN, 1995).

A integração da resposta imune por imunoglobulinas antígeno-específicas com receptores específicos em neutrófilos, células NK e macrófagos, promove um caminho alternativo para a resposta citotóxica mediada por células (anticorpos ou complemento). Esta integração da imunidade inata e adaptativa por células dendríticas e moléculas de imunoglobulina sugere que a associação sinérgica entre os efetores do sistema imune antígeno-específico e o inato certamente resultem na efetiva resposta de rejeição às neoplasias (EMENS *et al.*, 2005).

O CD20 é o mais usado marcador de linfócitos B, altamente específico e sensível (ALVES *et al.*, 1999), e representa a maioria ou todos os linfócitos B (ABBAS *et al.* 2005).

Na linhagem T, além da expressão da proteína CD3, são expressas também as chamadas moléculas acessórias, que incluem as CD4 e CD8. A CD4 é expressa em aproximadamente 60% das células T maduras CD3 positivas, enquanto a CD8 é expressa em cerca de 30% das células T (KUMAR *et al.*, 2005). A molécula CD3 é um dos marcadores mais sensíveis e específicos para demonstração de diferenciação T (ALVES *et al.*, 1999). O CD45, também conhecido como antígeno comum leucocitário, é específico das células hematopoiéticas e sua expressão está associada à resposta a doenças infecciosas e auto-imunes (TCHILIAN & BEVERLY, 2006). Em roedores, a expressão da isoforma do CD45 de baixo peso molecular (CD45RO) está associada às células T de memória e a uma maior diferenciação de função dessas células. Sua expressão insuficiente relaciona-se com diversas formas de imunodeficiências. A expressão do CD45 é importante para a função imune. Estudos sugerem que a alteração na sua expressão poderia mediar modificações nos receptores antigênicos dos linfócitos, desencadeando a produção de citocinas ou agindo no controle da apoptose (TCHILIAN & BEVERLY, 2006).

A memória imunológica pode ser definida como uma rápida e forte resposta de um animal que foi re-exposto a um mesmo antígeno. Por esta definição, é uma propriedade operacional de todo animal ou sistema imune. As células de memória expressam um padrão diferente de marcadores de superfície, e respondem de diversas maneiras, sendo funcionalmente diferentes das desenvolvidas pelas células maduras (*naive*). As células T de memória nos seres humanos são CD45RO positivas (DUTTON *et al.*, 1998).

O macrófago é uma das principais células na inflamação crônica e integra o sistema fagocitário mononuclear (sistema reticuloendotelial). Produzidos na medula óssea, os macrófagos estão difusamente espalhados no tecido conjuntivo ou localizados em órgãos como por exemplo o fígado e os pulmões. O macrófago tissular sobrevive por vários meses ou anos, diferentemente dos monócitos sanguíneos, que têm meia-vida curta, cerca de um dia. Quando o monócito chega ao tecido extravascular, transforma-se em uma célula fagocitária maior, o macrófago. A sua ativação ocorre por uma variedade de estímulos, incluindo as citocinas como a interferon (IFN) γ , secretadas pelos linfócitos T ativados e pelas células NK, endotoxinas bacterianas e outros mediadores químicos. Os macrófagos ativados apresentam metabolismo mais ativo e uma maior habilidade em fagocitar e matar os microrganismos ingeridos. Também secretam uma variedade de produtos biologicamente ativos que, se não forem controlados, resultam na lesão tecidual e fibrose, características da inflamação crônica. Os macrófagos exercem papéis importantes tanto na indução das respostas imunes quanto em sua fase efetora. Atuam tanto nas respostas mediadas por células quanto nas respostas mediadas pela imunidade humoral (ABBAS *et al.*, 2005). O CD68 é um dos marcadores de macrófagos mais usados e é muito sensível (ALVES *et al.*, 1999).

5. Mecanismos efetores imunológicos anti-tumorais

Os tumores expressam moléculas que estão normalmente presentes nas células de origem. Estes antígenos são chamados de antígenos de diferenciação porque são específicos para linhagens particulares ou estágios de diferenciação dos diversos tipos celulares. São muito importantes como alvos potenciais para imunoterapia e para identificar o tecido de origem dos tumores. Por exemplo, alguns linfomas são identificados

como derivados das células B pela detecção dos marcadores de superfície característicos desta linhagem, como o CD20 (KUMAR *et al.*, 2005).

Muito do conhecimento atual sobre antígenos tumorais é limitado aos antígenos reconhecidos pelos linfócitos T CD8 positivos (citólíticos ou citotóxicos) e apenas recentemente foram feitas tentativas de identificação de antígenos reconhecidos pelas células auxiliares CD4 positivas (ABBAS *et al.*, 2005).

Tanto a imunidade mediada por células como a imunidade humoral demonstram atividade anti-tumoral. Entretanto, o principal mecanismo de imunidade tumoral é a eliminação das células tumorais pelas células T CD8 positivas (KUMAR *et al.*, 2005).

O efeito anti-tumoral das células T citotóxicas que reagem contra os antígenos tumorais já foi bem estabelecido em tumores induzidos. Nos humanos, desempenham um papel protetor contra os tumores associados com os vírus Epstein Barr e o HPV. As células NK são linfócitos capazes de destruir células tumorais sem uma sensibilização anterior. As células T e NK produzem a IFN γ , uma citocina que ativa os macrófagos colaborando, assim, com a reatividade anti-tumoral. Os macrófagos ativados são eficazes na destruição de células tumorais *in vitro*. Os hospedeiros portadores de tumores podem produzir anticorpos contra diversos antígenos tumorais (KUMAR *et al.*, 2005)

6. A resposta imunológica e o câncer do colo uterino

O papel da imunidade mediada por células no controle da infecção pelo HPV foi avaliado em várias observações clínicas concernentes a lesões de pele e do trato genital. Estes incluem a regressão espontânea das lesões após uma infiltração de células mononucleares na derme e epiderme, e um aumento na incidência de HPV relacionado a

lesões de pele e do trato genital em pacientes com baixa imunidade (SHEPHERD *et al.*, 1996).

Após a infecção da célula epitelial pelo vírus, ele é replicado dentro dela. O efeito da infecção viral é a ativação de citocinas e dos genes dos receptores das citocinas, como por exemplo, a IFN- α (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

A IFN- α inibe a replicação viral e a regulação das moléculas da classe I do MHC. A infecção viral resulta na morte da célula e na replicação do vírus. As citocinas liberadas localmente ativam os macrófagos e as células apresentadoras de antígenos (APC). Estas fagocitam o vírus e apresentam as proteínas virais, assim como os restos celulares. Algumas APC profissionais transportam o antígeno para os linfonodos locais via linfáticos. As citocinas regulam a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais. As citocinas locais com atividade quimiotática, como a interleucina (IL) 8, também estão presentes. Os macrófagos liberam algumas citocinas como a IL 1, e o fator de necrose tumoral α que entram na corrente sanguínea, desencadeando um efeito sistêmico. As células que estão apresentando o antígeno entram nos linfonodos. A resposta inflamatória local leva à regulação das moléculas de adesão. Muitos linfócitos ficam presos no linfonodo e, conseqüentemente, surgem sinais de flogose (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

As células dendríticas e outras APC são circundadas no centro germinativo do linfonodo pelas células T CD4, onde ocorre a apresentação dos peptídeos virais. As células T CD4 que possuem TCR complementares são ativadas. As células B virgens, adquirindo partículas virais através de ligação à imunoglobulina (Ig) M ou IgD de superfície, processam e apresentam os peptídeos virais às células Th2. Como resultado, o anticorpo IgM antiviral é produzido (resposta primária de anticorpos), enquanto algumas células B se

diferenciam e mudam de classe, levando, mais tarde, à produção de IgG antiviral de alta afinidade (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

Um peptídeo viral é apresentado pelas moléculas da classe II do MHC a um TCR complementar na célula T CD4. A interação é estabilizada pelas ligações CD4/molécula da classe II do MHC, que também fornecem sinais co-estimuladores para as células T CD4 (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

Os linfócitos T CD4 e T CD8 deixam o linfonodo e entram no sangue. Nesse estágio, exibem TCR vírus específicos e promovem regulação positiva das moléculas de adesão, permitindo a migração para os tecidos inflamados e mantêm a atividade celular. As células NK podem ser recrutadas. Inicialmente elas têm um papel antiviral inato, quando da ativação pelas citocinas derivadas do epitélio. Posteriormente elas são ativadas pelas células Th1 específicas para o vírus (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

As células T citotóxicas ativadas mostram as células infectadas com vírus. As células Th1 e Th2 locais organizam, em seguida, a resposta imune antiviral (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

As células infectadas pelo vírus secretam e expressam proteínas virais, as quais podem ser neutralizadas ou removidas pelo anticorpo na forma de imunocomplexos, eliminados pelo sistema fagocítico mononuclear, ou o anticorpo pode ser usado para guiar as células NK, expressando o receptor de superfície celular específica (PEAKMAN & VERGANI, 1999; ABBAS, *et al.*, 2005).

Após a cura da infecção, as células T e B de memória vírus-específicas permanecem por longo período nos linfonodos, baço e medula óssea. Os plasmócitos garantem, por um tempo prolongado, a circulação de anticorpos protetores, vírus-neutralizantes (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

Por outro lado, a imunidade mucosa contra a infecção pelo HPV é pouco compreendida (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

A infecção pelo HPV pode ser pobre imunologicamente. Metade das pacientes com detecção do HPV 16 no câncer cervical não exhibe anticorpos precocemente contra proteínas do HPV. Mesmo quando os anticorpos são detectados cedo ou tardiamente, eles não se correlacionam com o resultado clínico. Entretanto, linfócitos T citotóxicos são protetores contra células tumorais transplantadas com genes de HPV - E6 e E7 - em modelos animais. Estas observações, somadas à alta incidência de HPV e à malignidade em pacientes imunocomprometidas, sugerem um importante papel protetor da resposta mediada por linfócitos T citotóxicos (NIMAKO *et al.*, 1997; TINDLE, 2002).

Num estudo recente em 2005, DANIEL *et al.*, verificaram uma diminuição de câncer cervical e de NIC em modelos animais submetidos a imunoterapia.

O sistema imune, apesar de apresentar capacidade para controlar um tumor, frequentemente falha em prevenir a progressão tumoral (PINZON-CHARRY *et al.*, 2005). Estudos têm proposto que o microambiente tumoral é capaz de controlar a resposta imune local, por meio da liberação de mediadores específicos, pela migração de leucócitos e por outras funções desempenhadas por essas células após sua chegada ao sítio do tumor (FINE *et al.* 2001; BALKWILL & MANTOVANI, 2001).

BUCK *et al.* (2006) mostrou recentemente que α -defensinas, conhecidas como peptídeos de neutrófilos humanos, bloqueiam a infecção pelo HPV, o que leva a crer que a presença local dessas substâncias seria uma barreira natural à transmissão sexual do HPV.

Estudos sobre a resposta inflamatória nas NIC são controversos. Uma diminuição do número de células T CD4 positivas e uma inversão na razão CD4/CD8 foram relatadas na infecção cervical pelo HPV e em todos os graus de NIC. Inversamente, um aumento do

número total dos linfócitos foi relatado em 18 casos de NIC II e NIC III. Além disso, três estudos usando diferentes marcadores mostraram diminuição de macrófagos, quando comparados com controles normais (DAVIDSON *et al.*, 1997).

MONNIER-BENOIT *et al.* (2006) demonstraram, através de imunoistoquímica, que a distribuição dos linfócitos T difere nas NIC e no carcinoma do colo uterino. Em pacientes com regressão de NIC grau I havia predomínio de células T CD4 positivas no estroma e no epitélio, sugerindo que os linfócitos T CD4 possam representar um marcador de regressão. Além disso, observaram um infiltrado CD8 e CD45RO no estroma mais intenso nos casos de NIC I que progrediram para lesões mais graves. Demonstraram também que há predomínio de linfócitos T CD8 e CD45RO no estroma de carcinoma invasivo e diminuição das células T CD4 positivas.

SILVA (2006) observou, através da imunoistoquímica, infiltrado inflamatório em todos os casos de NIC III e carcinoma invasivo. Observou ainda que o infiltrado inflamatório peritumoral era maior que o intratumoral nos casos de carcinoma invasivo. Demonstrou também uma expressão crescente de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sugerindo a produção de grandes quantidades de óxido nítrico (NO) durante a carcinogênese e envolvimento deste mediador nesse processo, e um aumento da população de linfócitos T CD3 positivos no córion de pacientes com NIC III em relação ao grupo controle.

LEE *et al.* (2004), em um estudo com 98 mulheres portadoras de lesão de alto grau, verificaram uma porcentagem significativamente menor na ativação de células T CD4, quando comparadas com grupo controle negativo.

A infecção pelo HPV leva a alteração da cinética celular e da maturação do epitélio escamoso *in vivo*. Anticorpos monoclonais relacionados com antígenos tais como o Ki-67

(MIB-1) e o antígeno nuclear de proliferação celular têm sido identificados através da imunistoquímica, permitindo identificar proliferação celular em tecidos humanos fixados em formol. Estudos com estes marcadores têm sido descritos, relacionando atividade proliferativa, grau de NIC e expressão do HPV (RESNICK *et al.*, 1996).

FERNANDES JÚNIOR (2006), em nosso meio, estudando alterações no número e capacidade funcional dos neutrófilos circulantes em pacientes portadoras de neoplasia de colo uterino, verificou que estas alterações estão associadas ao estadiamento invasivo e indicam a participação daquelas células na resposta imune ao tumor. Acrescenta ainda que, mesmo em estadiamentos pré-invasivos, o câncer do colo uterino deveria ser visto como uma doença com repercussões sistêmicas. BAIS *et al.* (2005) demonstraram que a displasia severa apresenta alterações sistêmicas semelhantes ao câncer invasivo e que isso reforçaria a evolução para carcinoma invasivo se não tratadas.

Em outro estudo semelhante, também em pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos, GARCIA (2006) analisou alterações no número e função de células mononucleares circulantes. Verificou que no momento do diagnóstico os valores absolutos de linfócitos num grupo de portadoras de NIC III ou carcinoma microinvasivo apresentavam-se normais, diferentemente do grupo com carcinoma invasivo que apresentavam alterações. Nesse estudo a autora verificou que, após o tratamento cirúrgico ou quimioterápico, houve alterações no número e na capacidade funcional das células mononucleares apenas nos casos com estadiamento avançado, sugerindo a produção de fatores circulantes pelas células neoplásicas.

Estudos sobre a resposta imune local em pacientes portadoras de NIC III, quando se considera a evolução pós-tratamento por conização do colo uterino, são controversos e

escassos. Assim, resolvemos avaliar a resposta imune na evolução de pacientes conizadas por NIC III.

7. Óxido Nítrico

O NO é um mediador pleiotrópico da inflamação, descoberto como um fator liberado pelas células endoteliais que causava vasodilatação, relaxando o músculo liso vascular. O NO é um gás solúvel produzido por células endoteliais, macrófagos e alguns neurônios do cérebro. A meia-vida do NO *in vivo* é de apenas alguns segundos, por isso ele age somente nas células próximas ao local em que é produzido (KUMAR *et al.*, 2005).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem 3 tipos diferentes de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), que se expressam de 2 maneiras: a eNOS e a nNOS são expressas constitutivamente em níveis baixos e podem ser ativadas rapidamente pelo aumento do cálcio intracelular. O influxo de cálcio nas células causa a rápida produção de NO; a iNOS é induzida quando os macrófagos e outras células são ativados pelas citocinas ou outros agentes (KUMAR *et al.*, 2005).

O NO desempenha um papel importante nos componentes vascular e celular das reações inflamatórias. Ele é um importante vasodilatador pela sua ação no músculo liso vascular. Age ainda reduzindo a agregação e a adesão plaquetárias, inibindo algumas atividades inflamatórias dos mastócitos e regulando o recrutamento leucocitário. A produção de NO é um mecanismo compensatório endógeno que reduz as respostas inflamatórias. Na aterosclerose, diabete melito e hipertensão arterial ocorrem anormalidades na produção de NO (KUMAR *et al.*, 2005).

O NO e seus derivados também são microbicidas e, assim, o NO também é um mediador de defesa do hospedeiro contra infecções e, provavelmente, neoplasias (KUMAR *et al.*, 2005).

A participação do NO na infecção cervical pelo HPV, na carcinogênese do colo uterino e na evolução das lesões precursoras é pouco conhecida.

Dessa forma, resolvemos verificar se há diferença na positividade para NO entre as pacientes com NIC III submetidas à conização com e sem recidiva.

HIPÓTESE

Testamos no presente estudo a hipótese de que haja diferença entre a resposta imunológica local em mulheres portadoras de NIC III submetidas a conizações do colo uterino com e sem recidiva após o seguimento. Testamos ainda a hipótese de que o tipo de HPV influencia na recidiva da NIC III após a conização.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Determinar o tipo de HPV e caracterizar o infiltrado inflamatório local em mulheres portadoras de NIC III submetidas à conização com e sem recidiva.

2. Objetivos específicos

1. Verificar através da utilização de PCR a presença de HPV 6/11, 16 e 18 em mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva.
2. Verificar se o tipo de HPV relaciona-se ou não com a recidiva.
3. Identificar através da imunistoquímica e quantificar a presença de linfócitos B, macrófagos, linfócitos T CD45RO, CD3 e CD8 positivos e a presença de células que expressam a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva.
4. Verificar se o tipo do infiltrado inflamatório local relaciona-se ou não com a recidiva.

MATERIAL E MÉTODO

1. Material

No período de janeiro de 1985 a dezembro 1991, foram realizadas 79 cirurgias de conização do colo uterino no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em mulheres com diagnóstico prévio de NIC III pela citologia oncológica e biópsias cervicais guiadas por colposcopia. Dessas, 63 tiveram o mesmo diagnóstico no exame anátomo-patológico da peça do cone e 16 apresentaram diagnóstico diferente da biópsia inicial, sendo excluídas desse estudo. Dos 63 casos restantes, 5 pacientes não realizaram controle ambulatorial e também foram excluídas. Excluímos ainda 8 pacientes que apresentaram, à época do tratamento, peça operatória com margens comprometidas e submetidas a histerectomia total complementar, não sendo possível avaliar recidiva cervical com o seguimento, restando assim 50 pacientes. Outras 15 pacientes foram também excluídas em função de não apresentarem focos suficientes de lesão para avaliação imunohistoquímica após processamento histoquímico e revisão das lâminas. Com isso, restaram 35 pacientes que constituíram o número final avaliado nesse estudo e que apresentaram seguimento por um período mínimo de 4 anos. A idade dessas pacientes variou de 22 a 62 anos, com média e desvio padrão de $34,85 \pm 9,78$ (Intervalo de Confiança de 95% variando de 31,49 a 38,22).

Realizamos análise dos prontuários de todas as pacientes, buscando citologias, biópsias e os exames anátomo-patológicos de re-conizações ou histerectomias eventualmente realizadas no seguimento das pacientes. Com estes dados buscamos a caracterização da cura ou da recidiva da doença. A seguir, correlacionamos a evolução com a resposta imune de cada caso. O seguimento clínico foi feito durante um período maior ou igual a quatro anos.

2. Seleção do material

Precedendo a avaliação imunoistoquímica, foi feita a análise de todos os casos, analisando-se lâminas coradas, pela coloração de hematoxilina-eosina para caracterizar os melhores focos de NIC III, para posterior avaliação do infiltrado linfocitário estromal subjacente. Foram utilizadas para essa finalidade as amostras de tecidos que se encontravam arquivadas emblocadas em parafinas. Esses blocos foram separados, desparafinados em estufa e novamente incluídos em parafina para o estudo histológico proposto. Realizou-se em cada caso um corte histológico com 5µm de espessura e corados segundo a técnica de hematoxilina-eosina.

3. Método imunoistoquímico

Em nosso estudo, utilizamos os anticorpos CD20, CD68, CD45RO, CD3, CD8 e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) para caracterizar a resposta inflamatória local. Realizamos cortes histológicos com 4µm de espessura, em lâminas silanizadas ATPS (Silano), Sigma® A3648, e estes corados empregando-se a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase (ALVES *et al.*, 1999). O quadro 1 mostra os anticorpos utilizados, seus clones, subclasses, diluição utilizada e células marcadas.

Quadro 1. Anticorpos utilizados, classes, subclasses, diluições e marcação proposta

Anticorpo	Clone	Subclasse	Diluição	Marcação
CD20	L26	IgG1, Kappa	1:600	PAN Linfócito B
CD68	KP1	IgG1, Kappa	1:1000	Macrófago
CD45RO	OPD4	IgG1, Kappa	1:50	Linfócito T
CD3	Policlonal	IgG1, Kappa	1:400	PAN Linfócito T
CD8	1A5	IgG1, Kappa	1:50	Linfócito T citotóxico
NOS2	Policlonal	IgG	1:250	Enzima NOS Induzida

3.1. Técnica de imunistoquímica

A resposta inflamatória local foi verificada através da técnica de imunistoquímica nas amostras emblocadas em parafina, conforme ALVES *et al.* (1999).

As lâminas contendo cortes histológicos com 4 μ m de espessura permaneceram na estufa a 56°C por um período de 24 horas, em seguida foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo cerca de 5 minutos em cada, e hidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%, cerca de 10 segundos em cada.

Posteriormente as lâminas permaneceram em um banho de solução salina tamponada, o *phosat busser saline* (PBS) – pH 7,2, durante 5 minutos para hidratação. Logo depois, o excesso de tampão foi removido e a borda do corte secada, cuidadosamente, com papel absorvente. As lâminas foram colocadas em uma bandeja, onde foi adicionada água oxigenada a 3% sobre cada corte, durante 10 minutos, para que houvesse bloqueio da peroxidase endógena. Novamente procedeu-se a lavagem em PBS.

A seguir foi realizada a recuperação dos antígenos, colocando as lâminas em tubos de citologia contendo solução tampão citrato 10mM (pH 6,0), que foram vedados com papel alumínio e colocados dentro de uma panela a vapor (marca ARNO®), durante 30 minutos. A seguir, os tubos foram retirados da panela e colocados sobre a bancada para seu resfriamento. Após esta etapa as lâminas foram novamente lavadas em 3 banhos de tampão PBS e incubadas com seus devidos anticorpos primários em torno de 18 horas, em câmara úmida com temperatura entre 3°C e 4°C.

Os anticorpos foram diluídos em soro de albumina bovina (Sigma®) de acordo com as indicações presentes em suas especificações.

Após a incubação *overnight*, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente, em torno de 15 minutos, lavadas em PBS e secadas como anteriormente. O

anticorpo secundário biotilado (marca DAKO LSAB+Peroxidase) foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos, à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida ocorreram lavagens em PBS, as lâminas foram secadas e o complexo estreptoavidina peroxidase (marca DAKO LSAB+Peroxidase) foi adicionado por 30 minutos nas mesmas condições acima.

Após lavagem em PBS, as lâminas foram reveladas, através da adição de uma solução cromógena, o diaminobenzidina – DAB (marca DAKO) , por 5 minutos. Concluído o tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas em hematoxilina de Harris, por 2 segundos.

Finalmente as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10 segundos cada, para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol, por 5 minutos cada. Foi adicionado sobre as lâminas as lamínulas com entellan para análise.

3.2. Critério de análise

Através da técnica de imunoistoquímica foram avaliados os linfócitos, os macrófagos e a iNOS presentes no tecido subjacente à displasia em um microscópio de luz comum. Para a contagem das células linfóides utilizamos o critério de pontuações descrito por GEORGIANNOS *et al.* (2003), que gradua a quantidade de células inflamatórias em:

- 0 - ausência de células inflamatórias;
- 1 - raras células inflamatórias;
- 2 - moderado número de células inflamatórias;
- 3 - numerosas células inflamatórias.

Para fins estatísticos, consideramos como marcação fraca as pontuações 0 e 1 e

como marcação forte as pontuações 2 e 3.

Inicialmente as células foram observadas em pequeno aumento (100 vezes) para avaliarmos a distribuição geral, e em seguida, examinada em detalhes (aumento de 400 vezes) no estroma subjacente a um foco de NIC III para obtermos a pontuação final. A análise de todos os casos foi realizada por dois observadores independentes. A concordância entre os dois observadores foi calculada utilizando o coeficiente de Kappa (ARANGO, 2001). O coeficiente de Kappa para os 6 marcadores foi de 0,83. O resultado final foi obtido após avaliação conjunta dos casos discordantes, mostrando um valor único por consenso.

4. Método da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para identificação e tipagem dos HPV oncogênicos 6/11, 16 e 18. Utilizou-se técnica de extração de DNA do HPV contido em material parafinado. Realizamos extração de DNA dos fragmentos incluídos em parafina de 14 casos para realização de PCR para β -globina e HPV. Vinte e um casos foram excluídos por problemas técnicos e/ou escassez do material.

4.1. Extração de DNA das amostras parafinadas

Para extração de DNA dos fragmentos incluídos em parafina, utilizamos a técnica de fenol-clorofórmio proposta por FONG *et al.* (1994). As amostras emblocadas em parafina foram submetidas a microtomia, obtendo-se cortes seriados com 5 μ m de espessura, que foram colocados em tubos *ependorfs* de 2ml. Posteriormente foi feita microdissecção para a eliminação de grande parte do tecido normal dos blocos, obtendo-se material mais rico em epitélio displásico. As amostras foram mantidas em temperatura

ambiente até o processamento.

4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada segundo o método descrito por CABALLERO *et al.* (1995). O termociclador utilizado para as ciclagens foi o miniciclador – modelo PTC – 150-16/1993 – MJ Research, INC. United States of América.

4.3. Ciclo de amplificação

Realizou-se amplificação do fragmento genérico do gene E6 e E7 do genoma do HPV, usando-se os iniciadores específicos para os tipos de HPV 6/11 amplificando 157bp, HPV 16 amplificando 98bp e HPV 18 amplificando 80bp. Nas amostras que resultaram negativas para estes tipos testados, usaram-se os iniciadores genéricos para HPV GP5 e GP6. A reação iniciou com uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, o emparelhamento e a extensão a 72°C por 2 minutos e a partir daí foram realizados 34 ciclos de 94°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e 1 ciclo de 94°C por 30 segundos e 72°C por 8 minutos. As condições de PCR incluíram um aquecimento inicial mediado por parafina (utilizando o Kit Hot Start 50TM, da MβP), procedimento para impedir o início da reação antes que a mistura atinja 80°C, para aumentar a especificidade da reação (CHOU *et al.*, 1992). Todos os experimentos foram feitos com dois controles negativos, um sem DNA e o outro com um DNA humano negativo para HPV. Foram usados como controle positivo, DNA de Caski e Hila. Quatro microlitros dos produtos amplificados após a PCR foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 8% e corados pela prata.

4.4. Método de detecção dos produtos amplificados

Após a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e corado com prata (SANGUINETE *et al.*, 1994).

Preparo do gel de poliacrilamida a 8% para o volume final de 10ml:

Bis-acrilamida 30%	1,99ml
Persulfato de amônio	100 μ L
Temed	10 μ L
TBE 10x	1ml
Água destilada e deionizada	5,93ml

4.5. Método de coloração do gel de poliacrilamida a 8% pela prata (DNA)

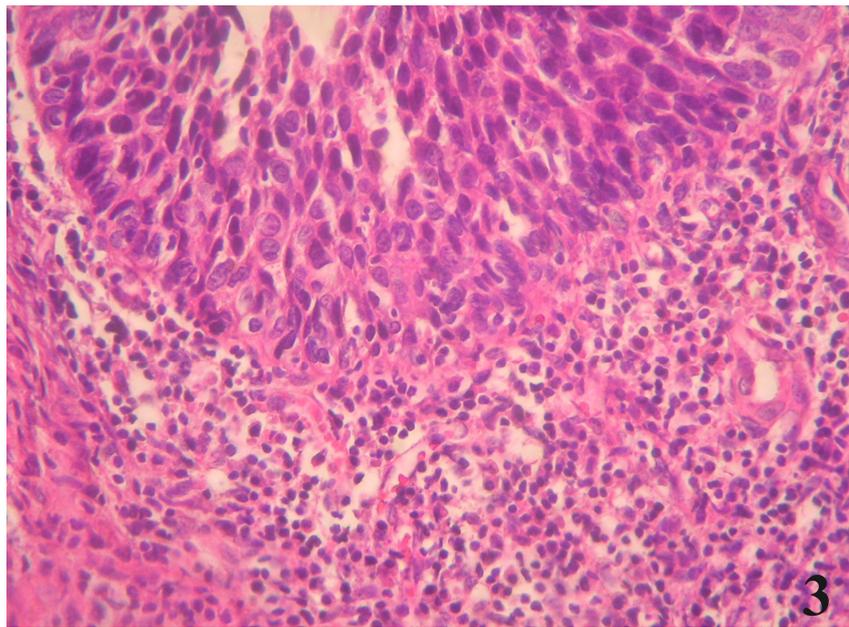
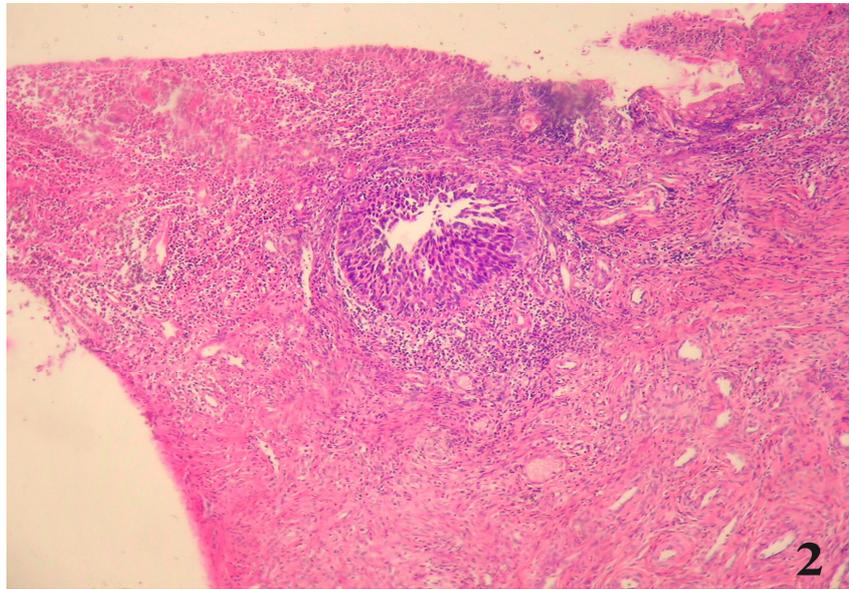
O gel foi fixado após a corrida eletroforética em solução fixadora (10% etanol, 0,5% ácido acético) por 3 minutos. A seguir, o fixador foi desprezado e o gel colocado em solução corante (0,2% nitrato de prata) por 5 minutos. Em seguida foi lavado com água *Milli-Q* por 2 minutos e depois colocado por aproximadamente 5 minutos em solução reveladora (3% de NaOH e 0,1% de formaldeído). Logo em seguida o gel foi retornado à solução fixadora por mais 5 minutos e enxaguado com água *Milli-Q*. O gel com o experimento foi colocado sobre uma placa de vidro com papel celofane hidrofílico por aproximadamente 24 horas (clima quente) para a secagem.

O gel foi analisado quanto à presença de bandas do gene da β -globina e do HPV. No primeiro gel, com a β -globina apresentando 110bp, verificou-se a amplificação e a qualidade do DNA extraído. Já no segundo gel, foi analisada e observada a presença de bandas do gene de HPV.

Nas figuras 1 a 3 observam-se alguns aspectos técnicos descritos anteriormente.



Figura 1. Ilustração de peça cirúrgica de cone do colo uterino, ainda sem fixação, apresentando mucosa avermelhada, lisa e brilhante e face cruenta predominantemente branco-rosada e esfarpada. Ponto com fio de sutura colocado às 12 horas para orientação.



Figuras 2 e 3. Fotomicrografias de cortes histológicos de colo uterino com neoplasia intra-epitelial escamosa cervical grau III (NIC III). Hematoxilina-eosina – aumentos de 100 e 400X, respectivamente.

5. Análise estatística

Para análise estatística foi elaborado um banco de dados eletrônico. As variáveis foram analisadas através do programa GRAPHPAD INSTAT versão 3.0. As proporções foram comparadas através do teste do Qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

6. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFTM (ANEXO C) em 01/11/2002 sob o nº 313.

RESULTADOS

Das 35 pacientes que compuseram esse estudo, 26 (74,3%) não apresentaram recidiva, enquanto 9 (25,7%) apresentaram. Dentre estes 9 casos, o intervalo de ocorrência da recidiva após o tratamento cirúrgico inicial foi menor que 4 anos em 8 casos (88,88%).

Após o diagnóstico cirúrgico, a opção terapêutica escolhida na época está ilustrada no Quadro 2.

Quadro 2. Opção terapêutica nos 9 casos que apresentaram recidiva do NIC III durante o seguimento clínico.

TERAPIA	NÚMERO DE CASOS
Histectomia	5
Reconização	1
Nenhuma	2
Cauterização	1
TOTAL	9

O resultado do exame anátomo-patológico das biópsias guiadas por colposcopia nas pacientes que apresentaram recidiva está descrito no Quadro 3.

Quadro 3. Resultados dos exames anátomo-patológicos dos 9 casos que apresentaram recidiva durante o seguimento clínico.

DIAGNÓSTICO	NÚMERO DE CASOS
Neoplasia intra-epitelial cervical grau III	8
Carcinoma microinvasivo	1

No Anexo A estão descritas individualmente as quantificações dos linfócitos B (CD20), macrófagos (CD68), linfócitos T (CD45RO, CD3 E CD8) e das células que expressam a iNOS das pacientes portadoras de NIC III com e sem recidiva.

O coeficiente de Kappa para os 6 marcadores foi de 0,83. O resultado final foi obtido após avaliação conjunta dos casos discordantes, mostrando um valor único por consenso.

A Tabela 1 mostra a distribuição da quantificação forte e fraca de linfócitos B CD20 positivos em pacientes com diagnóstico de NIC III que apresentaram ou não recidiva no período de seguimento.

Tabela 1. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca para CD20, marcador de linfócitos B.

	NIC III com recidiva n (%)	NIC III sem recidiva n (%)
CD20 Forte	01 (11,1)	05 (19,2)
CD20 Fraco	8 (88,9)	21 (80,8)
TOTAL	9 (100)	26 (100)

χ^2 (Yates): p=0,96

A análise dessa Tabela mostra que não houve diferença estatística em relação à marcação forte e fraca para linfócitos B CD20 positivos em pacientes com e sem recidiva de NIC III após a conização.

A Tabela 2 mostra a distribuição da quantificação forte e fraca de macrófagos (CD68) em pacientes com diagnóstico de NIC III que apresentaram ou não recidiva no período de seguimento.

Tabela 2. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca para macrófagos (CD68).

	NIC III com recidiva n (%)	NIC III sem recidiva n (%)
CD68 Forte	0 (0)	0 (0)
CD68 Fraco	9 (100)	26 (100)
TOTAL	9 (100)	26 (100)

χ^2 (Yates): p=1

A análise dessa Tabela mostra que não houve diferença estatística em relação à marcação forte e fraca para macrófagos CD68 em pacientes com e sem recidiva de NIC III.

A Tabela 3 mostra a distribuição da quantificação forte e fraca de linfócitos T CD45RO positivo em pacientes com diagnóstico de NIC III que apresentaram ou não recidiva no período de seguimento.

Tabela 3. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células T CD45RO positivas.

	NIC III com recidiva n (%)	NIC III sem recidiva n (%)
CD45RO+ Forte	08 (88,9)	18 (69,2)
CD45RO+ Fraco	1 (11,1)	8 (30,8)
TOTAL	9 (100)	26 (100)

χ^2 (Yates): p=0,47

A análise dessa Tabela mostra que não houve diferença estatística em relação à marcação forte e fraca para linfócitos T CD45RO positivos em pacientes com e sem recidiva de NIC III.

A Tabela 4 mostra a distribuição da quantificação forte e fraca de linfócitos T CD3 positivos em pacientes com diagnóstico de NIC III que apresentaram ou não recidiva no período de seguimento.

Tabela 4. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células T CD3 positivas.

	NIC III com recidiva n (%)	NIC III sem recidiva n (%)
CD3 Forte	09 (100)*	13 (50)*
CD3 Fraco	0 (0)	13 (50)
TOTAL	9 (100)	26 (100)

χ^2 (Yates): *p=0,022

A análise dessa Tabela mostra que houve diferença estatística entre o infiltrado forte de linfócitos T CD3 positivos em pacientes que apresentaram recidiva de NIC III em relação às pacientes sem recidiva, havendo maior marcação nas pacientes com recidiva.

A Tabela 5 mostra a distribuição da quantificação forte e fraca de linfócitos T CD8 positivos em pacientes com diagnóstico de NIC III que apresentaram ou não recidiva no período de seguimento.

Tabela 5. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células T CD8 positivas.

	NIC III com recidiva N (%)	NIC III sem recidiva n (%)
CD8 Forte	0 (0)	05 (19,2)
CD8 Fraco	9 (100)	21 (80,8)
TOTAL	9 (100)	26 (100)

χ^2 (Yates): p=0,38

A análise dessa Tabela mostra que não houve diferença estatística em relação à marcação forte e fraca para linfócitos T CD8 positivos em pacientes com e sem recidiva de NIC III.

A Tabela 6 mostra a distribuição da quantificação forte e fraca de células que expressam iNOS em pacientes com diagnóstico de NIC III que apresentaram ou não recidiva no período de seguimento.

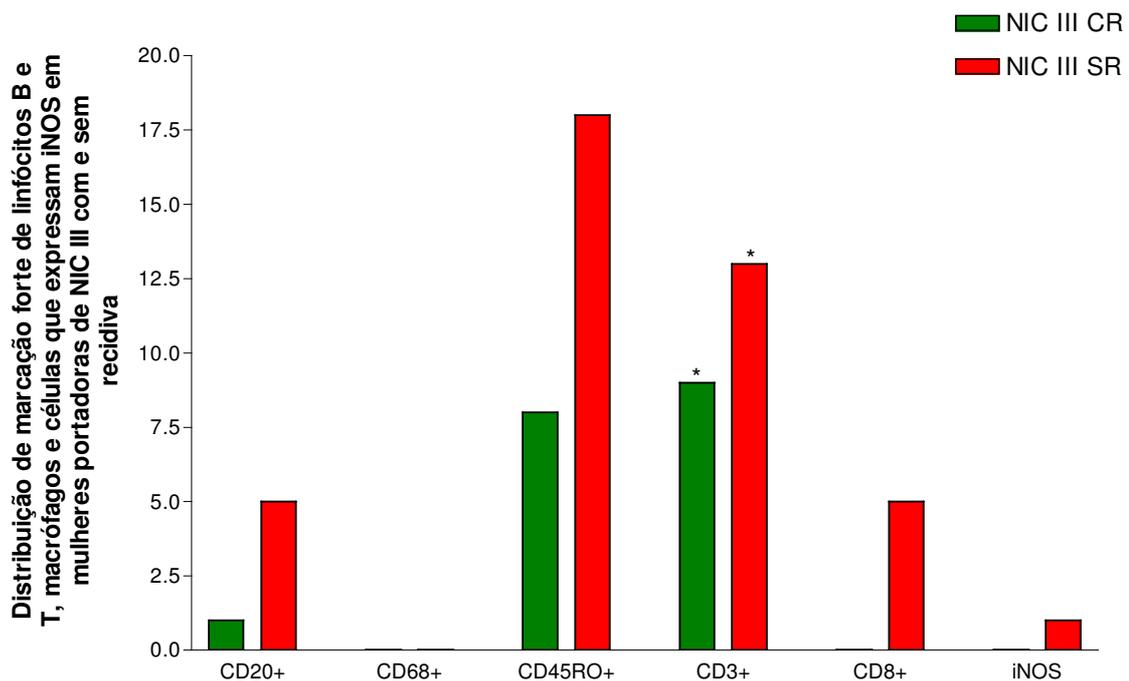
Tabela 6. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a marcação imunoistoquímica forte e fraca de células que expressam iNOS.

	NIC III com recidiva n (%)	NIC III sem recidiva n (%)
iNOS Forte	0 (0)	01 (3,8)
iNOS Fraco	9 (100)	25 (96,2)
TOTAL	9 (100)	26 (100)

χ^2 (Yates): p=1

A análise dessa Tabela mostra que não houve diferença estatística em relação à marcação forte e fraca para células que expressam iNOS em pacientes com e sem recidiva de NIC III.

O Gráfico abaixo resume a marcação forte para todos os marcadores estudados nas mulheres com NIC III que apresentaram ou não recidiva.



χ^2 (Yates):
 p = 0,96 (CD20)
 p = 1 (CD68)
 p = 0,47 (CD45RO)
 * p = 0,022 (CD3)
 p = 0,38 (CD8)
 p = 1 (iNOS)

Figura 4. Gráfico da distribuição de marcação forte de linfócitos B (CD20), linfócitos T (CD3, CD45RO e CD8), macrófagos (CD68) e células que expressam iNOS em mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva.

Nas figuras 5 a 10 ilustramos alguns aspectos microscópicos dos resultados de imunistoquímica descritos anteriormente.

Figura 5. Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar linfócitos B corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD20, grau 3 – aumento de 200X.

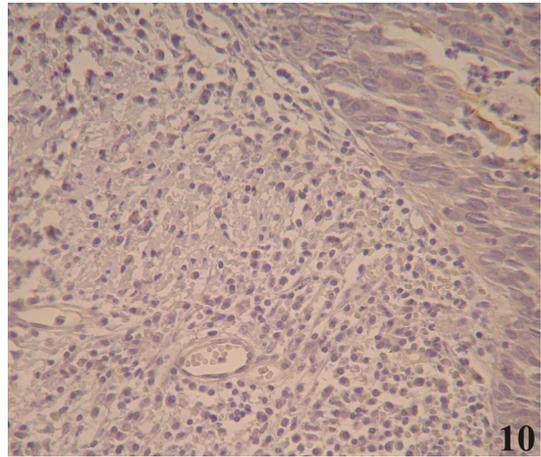
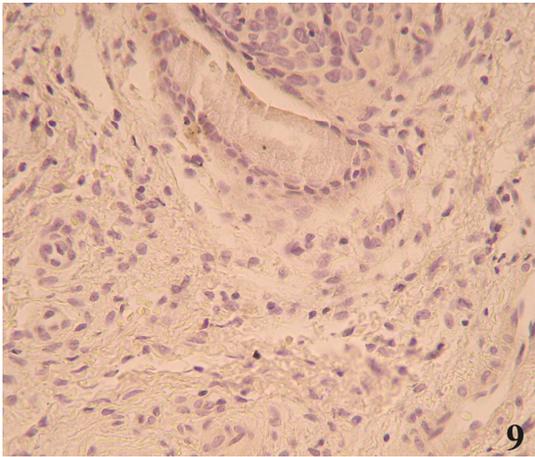
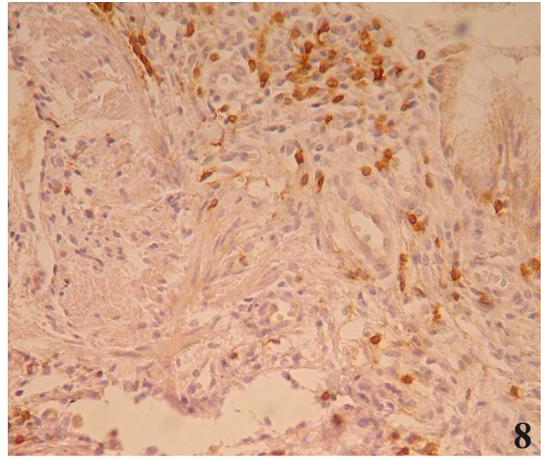
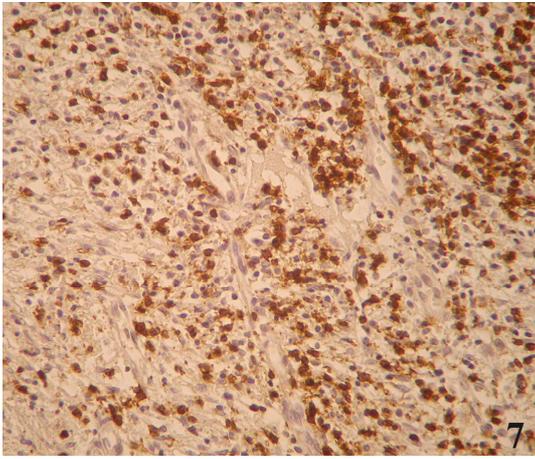
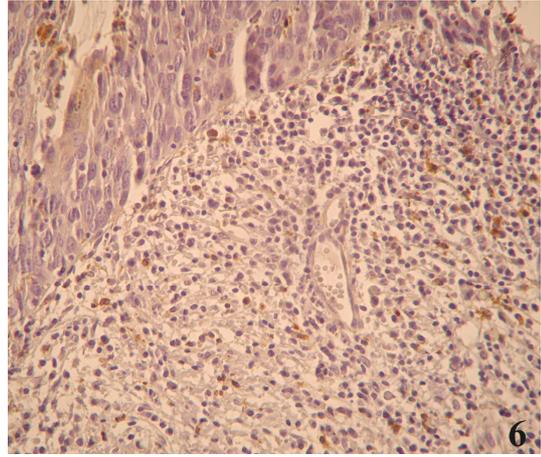
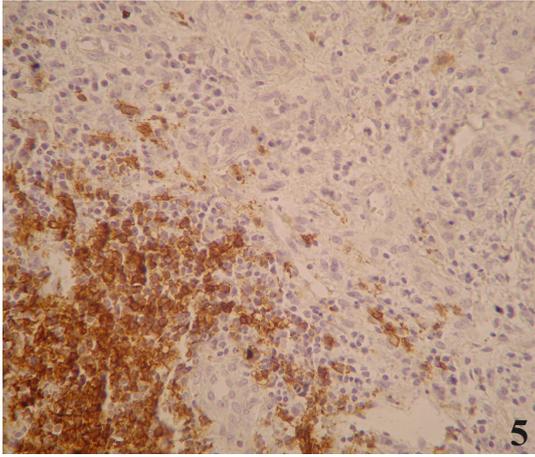
Figura 6. Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar macrófagos corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD68, grau 1 – aumento de 200X.

Figura 7. Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar linfócitos T corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD45 RO, grau 3 – aumento de 200X.

Figura 8. Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar linfócitos T CD3 positivos corados através da imunistoquímica em marrom pelo anticorpo CD3, grau 2 – aumento de 200X.

Figura 9. Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar ausência de linfócitos T CD8 positivos corados através da imunistoquímica pelo anticorpo CD8, grau 0 – aumento de 200X.

Figura 10. Lâmina própria subjacente a foco de NIC III. Notar ausência de células coradas através da imunistoquímica pelo anticorpo iNOS, grau 0 – aumento de 200X.



Das 14 pacientes em que houve a extração de DNA para realização da PCR com o objetivo de identificar os HPV 6/11, 16 e 18, 9 (64,3%) não apresentaram recidiva durante o período de seguimento, enquanto que os 5 casos restantes (35,7%) apresentaram recidiva.

A Tabela 7 mostra a distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva em relação à tipagem de HPV.

Tabela 7. Distribuição das mulheres portadoras de NIC III com e sem recidiva segundo a tipagem do HPV 6/11, 16 e 18.

	NIC III com recidiva	NIC III sem recidiva
	n (%)	n (%)
HPV 6/11	0 (0)	2 (22,2)
HPV 6/11 e 16	0 (0)	2 (22,2)
HPV 6/11 e 18*	2 (40)	0 (0)
HPV 16	0 (0)	4 (44,5)
HPV 16 e 18*	2 (40)	1 (11,1)
HPV 18*	1 (20)	0 (0)
TOTAL	5 (100)	9(100)

Fisher: *p=0,003

A análise dessa Tabela mostra que o DNA-HPV é mais encontrado nas pacientes que apresentaram recidiva da NIC III (estatisticamente significante), particularmente o subtipo 18, de alto risco, em relação às mulheres onde não houve recidiva após o seguimento. Mostra ainda que o subtipo 16 foi encontrado em 9 dos 14 casos (64,29%) e o subtipo 18 em 6 dos 14 casos (42,86%).

As figuras 10 a 14 ilustram alguns resultados da tipagem do HPV descritos anteriormente.

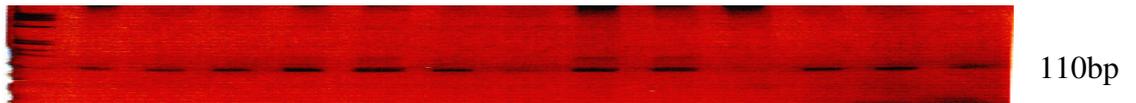


Figura 11. Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do fragmento de 110bp do gene da β -globina.



Figura 12. Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e na penúltima canaleta, amplificação do fragmento de 150bp GP5/GP6 (controle positivo).



Figura 13. Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 2, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do DNA do HPV 6/11.



Figura 14. Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do DNA do HPV 16.



Figura 15. Gel de poliacrilamida a 8% corada pela prata. Observamos na canaleta 1, ϕ X Hae III, e nas outras canaletas, amplificação do DNA do HPV 18.

DISCUSSÃO

A incidência, a morbidade e a mortalidade do câncer do colo uterino têm apresentado diminuição nas últimas décadas. Acredita-se que essa diminuição decorra em grande parte do rastreamento das lesões precursoras tratáveis, pela citologia esfoliativa. Apesar disso, ainda é a terceira neoplasia mais comum e a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres brasileiras (GRAY, 1995; KUMAR *et al.*, 2005; INCA, 2007).

O papilomavírus humano é relacionado com o câncer do colo uterino desde a década de 70, podendo induzir lesões que podem ou não evoluir como NIC e posteriormente carcinoma invasivo (ZEHBE *et al.*, 1996; MOTA *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2005).

A NIC pode permanecer em um estágio não invasivo por até 20 anos e não evoluir necessariamente para um câncer, podendo, inclusive, regredir espontaneamente (KUMAR *et al.*, 2005). Os fatores associados com a regressão ou progressão das NIC para carcinoma invasivo têm sido objeto de estudos há décadas. Sabe-se que quanto maior o grau da NIC, menor a chance de regressão espontânea. Vários estudos indicam que a persistência da infecção pelo HPV, principalmente de alto risco, é necessária para o desenvolvimento de NIC para carcinoma invasivo.

A conização é uma técnica cirúrgica empregada para o tratamento de lesões intra-epiteliais de alto grau/NIC III, para diagnóstico ou para exclusão de carcinoma invasivo (WONG & CLARK, 1969; HUSSEINZADEH *et al.*, 1989).

O envolvimento das margens cirúrgicas na conização por NIC é considerado um dos fatores relacionados com a recidiva da displasia (ENTERLINE *et al.*, 1963; MALUF *et al.*, 2004). Além disso, extensão da NIC III para as criptas e o maior número de mitoses são relacionados ao maior índice de recidiva da NIC (DEMOPOULOS *et al.*, 1991; MALUF *et al.*, 2004).

A resposta imune local e sistêmica em pacientes com câncer de colo uterino e suas lesões precursoras têm sido estudadas há algum tempo e é motivo de controvérsias. DANIEL *et al.* (2005), verificaram uma diminuição de câncer cervical e de NIC em modelos animais submetidos à imunoterapia, sugerindo importante papel protetor do sistema imune. Por outro lado, outros autores observaram que o sistema imune, apesar de apresentar capacidade para controlar um tumor, freqüentemente falha em prevenir a progressão tumoral (PINZON-CHARRY *et al.* 2005).

Em revisão bibliográfica, não foram encontrados trabalhos correlacionando a resposta imune local com a recidiva de NIC III após conização. Assim, realizamos o presente estudo buscando comparar a resposta imune local e o tipo de HPV em pacientes submetidas a conização por NIC III com e sem recidiva após acompanhamento clínico durante pelo menos 4 anos.

A idade de nossas pacientes variou de 22 a 62 anos, com média e desvio padrão de $34,85 \pm 9,78$ (Intervalo de Confiança de 95% variando de 31,49 a 38,22).

Em estudo epidemiológico realizado no Brasil, CAVALCANTI *et al.* (2000) encontraram média de 36,7 anos para as mulheres com diagnóstico de lesão intra-epitelial de alto grau (NIC II e III) e de 47,3 anos para as pacientes com carcinoma invasivo. MOUGEN *et al.* (2001) observaram que os diagnósticos de NIC II e NIC III ocorrem preferencialmente em mulheres com idade entre 35 e 40 anos. Essas idades descritas na literatura são semelhantes às encontradas em nosso estudo.

Vários estudos publicados na literatura, inclusive realizados em nossa Instituição, demonstraram alterações imunes sistêmicas no câncer do colo uterino (BAIS *et al.*, 2005; FERNANDES JÚNIOR, 2006; GARCIA, 2006). Outros autores, porém, propõem que o

microambiente tumoral seja capaz de controlar a resposta imune local e assim interferir na evolução da doença (FINE *et al.*, 2001; BALKWILL & MANTOVANI, 2001).

Em nosso estudo encontramos maior positividade forte para linfócitos T CD3 positivos no córion das pacientes que apresentaram recidiva de NIC III após a conização. Todas as pacientes com recidiva apresentaram positividade forte para CD3.

A maior expressão forte de linfócitos T CD3 positivos nas pacientes com NIC III que apresentaram recidiva no seguimento clínico após a conização, observada em nosso estudo, sugere que a positividade forte para esse anticorpo poderia ser um fator de pior evolução. Apesar de presentes em grande número, estes linfócitos T CD3 positivos falham em impedir a recidiva da NIC. Talvez haja alguma falha na sua ativação ou na produção de citocinas.

A proteína CD3 é um dos marcadores mais sensíveis e específicos de diferenciação T. Cerca de 60% dos linfócitos T CD4 positivos expressam o CD3. Por outro lado, a CD8 é expressa em cerca de 30% das células T (ALVES *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2005).

MONNIER-BENOIT *et al.* (2006), em estudo utilizando imunoistoquímica em pacientes com lesões precursoras do câncer do colo uterino, e com biópsias sem NIC, demonstraram predomínio de linfócitos T CD4 positivos em pacientes com NIC grau I que apresentaram regressão da lesão, sugerindo que os linfócitos T CD4 positivos possam ser um marcador de regressão em lesões de baixo grau. Apontaram ainda diferença na distribuição dos linfócitos T nas NIC e no carcinoma invasivo. Entretanto, esses autores estudaram pacientes com diferentes graus de NIC, com carcinoma invasivo e com biópsias sem NIC (controles). Utilizaram os anticorpos CD4, CD8 e CD45RO em material de biópsia do colo uterino guiada pela colposcopia. Não estudaram apenas pacientes com NIC

III submetidas à conização como em nosso estudo. Além disso, os autores não compararam o infiltrado inflamatório nos casos tratados com e sem recidiva.

NIMAKO *et al.* (1997) e TINDLE (2002) observaram que os linfócitos T são protetores contra células tumorais transplantadas com genes de HPV em modelos animais. Essas observações, somadas à alta incidência de infecção pelo HPV e malignidade em pacientes imunocomprometidas, sugeriam um importante papel protetor da resposta imune mediada por linfócitos T.

SILVA (2006) observou, através da imunoistoquímica, infiltrado inflamatório em todos os casos de NIC III e carcinoma invasivo. Observou ainda que o infiltrado inflamatório peritumoral era maior que o intra-tumoral nos casos de carcinoma invasivo. Demonstrou também uma expressão crescente de iNOS, sugerindo a produção de grandes quantidade de NO durante a carcinogênese e envolvimento deste mediador nesse processo. Verificou também um aumento da população de linfócitos T CD3 positivos no córion de pacientes com NIC III e carcinoma invasivo em relação ao grupo controle. Esse achado coincide em parte com os resultados verificados em nosso trabalho, em que aquelas células apresentaram maior ocorrência de marcação forte nos casos de pior evolução (NIC III com recidiva).

Em nosso estudo não encontramos diferença estatisticamente significativa na expressão da iNOS entre as pacientes com NIC III com e sem recidiva.

Não encontramos diferença estatística na expressão de CD20 (linfócitos B), CD68 (macrófagos), CD45RO e CD8 (linfócitos T) e de iNOS entre as pacientes com NIC III que apresentaram ou não recidiva após conização.

O HPV é considerado agente causal do câncer cervical em mulheres, bem como de outros órgãos genitais, mucosas e pele (FEOLI-FONSECA *et al.*, 2001). Como já

mencionamos anteriormente, estudos indicam que a persistência da infecção pelo HPV, particularmente os de alto risco, é necessária para o desenvolvimento e a progressão de NIC para carcinoma invasivo (MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006).

Os subtipos 16 e 18 do HPV de alto risco, são detectados em 93% dos casos de câncer cervical e em 65% dos casos de NIC III (NIMAKO *et al.*, 1997), e são considerados os mais prevalentes nos casos de câncer do colo uterino (VERAS *et al.*, 2005). Infecção por HPV de alto risco tem sido reconhecida como o principal fator de risco para o desenvolvimento de NIC e de carcinoma invasivo (MONNIER-BENOIT, *et al.* 2006).

OLIVEIRA *et al.* (2003) encontraram integração do DNA-HPV subtipo 16 em quase todos os casos de câncer cervical através de PCR.

CAMARA *et al.* (2003) observaram positividade para HPV 16 em 43,8% dos casos de NIC de alto grau e de câncer do colo uterino, e apenas 3,8% dos casos para o subtipo 18.

Em nosso estudo encontramos positividade para DNA-HPV 16 em 9 dos 14 casos estudados através da PCR (64,29%) e para o subtipo 18 em 6 dos 14 casos (42,86%). A positividade para o subtipo 18 foi maior que a observada por CAMARA *et al.* (2003), estudo também realizado no Brasil (Brasília, DF) e utilizando a técnica de PCR.

ROBERTS *et al.* (2006) encontraram o subtipo 16 em 47,5% dos casos de NIC de alto grau estudados, e o subtipo 18 em 5,9% dos casos. Nosso percentual de positividade para os subtipos 16 e 18 foi maior que o encontrado por esses autores.

RABELO-SANTOS *et al.* (2003), em outro estudo brasileiro, também encontraram o subtipo 16 mais freqüentemente nos casos de NIC III e de câncer do colo uterino através da PCR.

TERRA *et al.* (2002) e TERRA (2003), utilizando material de conização por NIC III em nosso Serviço, através da PCR, encontraram DNA-HPV 16 e/ou 18 em todos os casos positivos (cerca de 90%) e, em apenas 9,1% dos casos encontraram HPV 6 e 11 concomitantemente. Nesse estudo, o HPV 18 foi o subtipo mais freqüentemente encontrado (78,79% dos casos).

Resolvemos verificar se o tipo de HPV relaciona-se ou não com a recidiva em pacientes com NIC III submetidas à conização. Nossos resultados apontaram que, das 14 pacientes em que houve extração de DNA-HPV para os subtipos 6, 11, 16 e 18 através da PCR, 64,3% (9 casos) não apresentaram recidiva durante o seguimento clínico. Os 35,7% (5 casos) restantes apresentaram recidiva. Apontaram ainda que a detecção do DNA-HPV, particularmente o subtipo 18, correlaciona-se, de modo estatisticamente significativa, com a recidiva da NIC após a conização. Não encontramos, em nossa revisão bibliográfica, trabalhos correlacionando a positividade para DNA-HPV, particularmente o subtipo 18, com a recidiva da NIC após a conização

Observamos maior prevalência do HPV 18, de alto risco, através da PCR em pacientes conizadas que apresentaram recidiva do NIC III após seguimento clínico durante, no mínimo, 4 anos. Esses dados sugerem que a positividade para o HPV 18 pode ser considerada um fator de risco para recidiva do NIC III após a conização.

CONCLUSÃO

A análise desse trabalho nos permite concluir que:

1. A maioria das pacientes com positividade para DNA-HPV subtipos 6/11, 16 e 18 (64,3%) não apresentou recidiva da NIC durante o acompanhamento clínico, enquanto que 35,7% dos casos apresentaram recidiva.
2. A infecção por HPV de alto risco, particularmente o subtipo 18, correlaciona-se com a recidiva da NIC após a conização, podendo ser considerado um marcador de pior evolução.
3. Não encontramos diferença estatisticamente significativa na expressão dos anticorpos CD20 (linfócitos B), CD68 (macrófagos), CD45RO e CD8 (linfócitos T), e de iNOS entre as pacientes com NIC III que apresentaram ou não recidiva.
4. Há uma maior positividade forte (expressão) para linfócitos T CD3 positivos nas pacientes com NIC III com recidiva após a conização, sugerindo que a positividade forte para esse anticorpo seja um fator indicativo de pior evolução.

RESUMO

O câncer do colo uterino ainda é a terceira neoplasia mais comum e a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres brasileiras, apesar de ter apresentado diminuição da incidência, da morbidade e da mortalidade nas últimas décadas. O HPV tem sido apontado como seu principal fator causal.

A resposta imune local e sistêmica parece desempenhar importante papel no controle da infecção pelo HPV e na progressão das NIC.

Analisamos 35 casos de NIC III de pacientes que foram submetidas à conização utilizando a imunohistoquímica para pesquisar os anticorpos CD3, CD8, CD45RO, CD20, CD68 e a enzima iNOS. As lâminas foram avaliadas por 2 observadores e a concordância entre eles, calculada através do coeficiente de Kappa, foi de 0,83. Realizamos ainda PCR para detectar o DNA-HPV subtipos 6, 11, 16 e 18 em 14 das 35 pacientes.

Encontramos uma maior positividade forte (expressão) para linfócitos T CD3 positivos nas pacientes com NIC III com recidiva após a conização, sugerindo que possa ser um fator indicativo de pior evolução. Não encontramos diferença estatística na expressão de CD20, CD68, CD45RO, CD8 e iNOS.

Observamos ainda que a infecção por HPV de alto risco, particularmente o subtipo 18, correlaciona-se com a recidiva da NIC após a conização, podendo ser considerado um marcador de pior evolução.

Palavras-chave: neoplasia de colo uterino, infiltrado inflamatório, NIC III, CD3, tipos de HPV.

ABSTRACT

Uterine cervix cancer remains the third most common neoplasia and the fourth cause of death due to cancer among Brazilian women, although a decreasing incidence, morbidity and mortality have been observed over the last decades. Human papillomavirus (HPV) has been indicated as its most important causal factor.

The local and systemic host immune response seem to play an important role in controlling HPV infection and the progression to cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

We analyzed 35 cases of CIN III in patients who have been undergone conization. Immunohistochemistry was used to detect CD3, CD8, CD45RO, CD20 and CD68 antibodies and the iNOS enzyme. The slides were evaluated by two observers and the agreement between them was calculated by means of the Kappa coefficient and established as 0,83. We also performed the polymerase chain reaction (PCR) to detect HPV DNA subtypes 6, 11, 16 and 18, in 14 out of the 35 patients.

We found a stronger expression of CD3-positive T lymphocytes in patients with CIN III who relapsed after conization, suggesting that this may be a predictive factor of a worse outcome evolution. We did not find any statistical differences in the expression of CD20, CD68, CD45RO, CD8 and iNOS.

We also observed correlation with high-risk HPV infection, particularly subtype 18, and relapse recurrence of CIN after conization, and this may also be considered a predictor of a worse outcome.

Key words: neoplasia of the uterine cervix, inflammatory infiltrate, CIN III, CD3, HPV types.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

AHLGREN, M.; INGEMARSSON, I; LINDBERG, L. G. *et al...* Conization as treatment of carcinoma in situ of the uterine cervix. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 46, n. 2, p. 135-40, ago. 1975.

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. (Ed.). **Manual de Imuno-Histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270 p.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer reference information. **Overview**: cervical cancer. How many women get cancer of the cervix? Disponível em: <<http://www.cancer.org/docroot/CRI/content>>. Acesso em: 27 fev. 2007.

ARANGO, E. G. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 3, p. 104-13.

AULT, K. A. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. **Infect Dis. Obstet Gynecol.**, New York, v. 14, n. 1, p. 1-5, mar. 2006.

BAIS, A. G.; BECKMANN, I; LINDEMANS, J. *et al...* A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 58, n. 10, p. 1096-100, out. 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, London, v. 357, n. 9255, p. 539-45, fev. 2001.

BOS, J. L. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, Chicago, v. 49, n. 17, p. 4682-89, set. 1995.

BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; de SANJOSE, S. *et al...* Risk factor for cervical cancer in Colombia and Spain. **Int. J. Cancer**, New York, v. 52, n.5, p. 750-8, nov., 1992.

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; THOMPSON, C. D. *et al...* Human α -defensins block papillomavirus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v. 103, n. 5, p. 1516-21, jan. 2006.

BURGHARDT, E.; HOLZER, E. Treatment of carcinoma in situ: evaluation of 1.609 cases. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 55, n. 5, p. 539-45, maio 1980.

CABALLERO, O. L. S. D.; VILLA, L. L.; SIMPSON, A. J. G. Low-stringency-PCR (LS-PCR) Allows entirely internally standardized DNA quantitation. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 1, p.192-93, jan. 1995.

CAMARA, G. N. L.; CERQUEIRA, D. M.; OLIVEIRA, A. P. G. *et al...* Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 879-83, out. 2003.

- CAVALCANTI, S. M. B.; PASSOS, J. V. M.; RAMOS, L. M. *et al.*. Human papillomavirus infection and p53 over expression associated to cervical cancer. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 257-62, out./dez. 2000.
- CHENG, W. F.; LEE, C. N.; SU, Y. N. *et al.*. Induction of human papillomavirus type 16-specific immunologic responses in a normal and an human papillomavirus-infected populations. **Immunology**, Oxford, v. 115, n. 1, p. 136-49, maio 2005.
- CHOU, Q.; RUSSELL, M.; BIRCH, D. E. *et al.*. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 20, n. 7, p. 1717-23, abr. 1992.
- DANIEL, D.; CHIU, C.; GIRAUDO, E. *et al.*. CD4+ T cell-mediated antigen-specific immunotherapy in a mouse model of cervical cancer. **Cancer Res.**, Chicago, v. 65, n. 5, p. 2018-25, mar. 2005.
- DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Pathol. Res. Practice**, New York, v. 193, n. 7, p. 491-5, 1997.
- DE JONG, A.; VAN POELGEEST, M. I.; VAN DER HULST, J. M. *et al.*. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Res.**, Chicago, v. 64, n. 15, p. 5449-55, ago. 2004.
- DEMOPOULOS, R. I.; HOROWITZ, L. E.; VAMVAKAS, E. C. Endocervical gland involvement by cervical intraepithelial neoplasia grade III: predictive value for residual and/or recurrent disease. **Cancer**, New York, v. 68, n. 9, p. 1932-6, nov. 1991.
- DIEFENBACH, A.; RAULET, D. H. The innate immune response tumors and its role in the induction of T-cell immunity. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 188, p. 9-21, out. 2002.
- DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 16, p. 201-23, 1998.
- EMENS, L. S.; REILLY, R. T.; JAFFEE, E. M. Breast cancer vaccines: maximizing cancer treatment by tapping into host immunity. **Endocr. Relat. Cancer**, Bristol, v. 12, n. 1, p. 1-17, mar. 2005.
- ENTERLINE, H. T.; ARVAN, D. A.; DAVIS, R. E. The predictability of residual carcinoma in situ from study of cervical cones. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 85, n. 7, p. 940-6, 1963.
- FEOLI-FONSECA, J. C.; OLIGNY, L. L.; BROCHU, P. *et al.*. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR – Direct Sequencing approach. **J. Med. Virol.**, Monteaux, v. 63, n. 4, p. 284-92, abr. 2001.
- FERNANDES JUNIOR, P. C. **Avaliação de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasia pré-invasiva e invasiva de colo uterino**. 2006. 106 f. Tese (Mestrado em Patologia Ginecológica e Obstétrica) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006.

FINE, J. S.; BYRNES, H. D.; ZAVODNY, P. J. *et al.*. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. **Inflammation**, New York, v. 25, n. 2, p. 61-7, abr. 2001.

FONG, K. M.; ZIMMERMAN, P. V.; SMITH, P. J. Correlation of loss of heterozygosity at 11p with tumor progression and survival in non-small cell lung cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 10, n. 3, p. 183-9, jul. 1994.

GARCIA, C. B. **Avaliação de células mononucleares em pacientes com neoplasia de colo uterino em diferentes estadiamentos**. 2006. 82 f. Tese (Mestrado em Patologia Clínica)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006.

GEORGIANNOS, S. T.; [RENAUT, A.](#); [GOODE, A. W.](#) *et al.*. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. **Surgery**, St. Louis, v. 134, n. 5, p. 827-34, nov. 2003.

GERMAIN, R. N. The biochemistry and cell biology of antigen presentation by MHC class I and class II molecules: implications for development of combination vaccines. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 754, p. 114-25, maio 1995.

GJOEN, K.; OLSEN, A. O.; MAGNUS, P. *et al.*. Prevalence of human papillomavirus in cervical scrapes, as analyzed by PCR, in a population-based sample of women with and without cervical dysplasia. **APMIS**, Copenhagen, v. 104, n. 1, p. 68-74, jan. 1996.

GJOEN, K.; [SAUER, T.](#); [OLSEN, A. O.](#) *et al.*. Correlation between polymerase chain reaction and cervical cytology for detection of human papillomavirus infection in women with and without dysplasia. **APMIS**, Copenhagen, v. 105, n. 1, p. 71-5, jan. 1997.

GRAY, W. **Diagnostic cytopathology**. London: Churchill Livingstone, 1995. 975 p.

HUSSEINZADEH, N.; SHBARO, I.; WESSELER, T. Predictive value of cone margins and post-cone endocervical curettage with residual disease in subsequent hysterectomy. **Gynecol. Oncol.**, San Diego, v. 33, n. 2, p. 198-200, maio 1989.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Câncer do colo do útero**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326>. Acesso em: 27 fev. 2007.

JOHNSON, T. J.; PLIETH, D. A.; CRISSMAN, J. D. *et al.*. Detection by polymerase chain reaction (PCR) in verrucous lesion of the upper aerodigestive tract. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 4, n. , p. 461, 1991.

JORDÃO, A. V.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R. *et al.*. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citomorfológico de papilomavírus humano. **J. Bras. Pat. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 81-9, jan./mar. 2003.

KLEINE-LOWINSKI, K.; GILLITZER, R.; KÜHNE-HEID, R. *et al.*. Monocyte-chemoattractant-protein (MCP-1) gene expression in cervical intraepithelial neoplasias and cervical carcinomas. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 82, n. 1, p. 6-11, nov. 1999.

- KOBAYASHI, A.; GREENBLATT, R. M.; ANASTOS, K. *et al.*. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Res.**, Chicago, v. 64, n. 18, p. 6766-74, set. 2004.
- KOUTSKY, L. A.; GALLOWAY, D. A.; HOLMES, K. K. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Epidemiol. Rev.**, Baltimore, v. 10, p. 122-63, 1988.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO N. (Ed.). **Robins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.
- LEE, B. N.; FOLLEN, M.; SHEN, D. Y. *et al.*. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, DC, v. 11, n. 2, p. 239-44, mar. 2004.
- LERTWORAPREECHA, M.; BHATTARAKOSOL, P.; NIRUTHISARD, S. Detection and typing human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v. 29, n. 3, p. 507-511, set. 1998.
- LIN, M. W.; MICHALOPULOS, E. A.; DHURANDER, N. *et al.*. Allelic loss and microsatellite alterations of chromosome 3p14.2 are more frequent in recurrent cervical dysplasias. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 6, n. 4, p. 1410-4, abr. 2000.
- MALUF, P. J.; ADAD, S. J.; MURTA, E. F. C.; Outcome after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III: relation with surgical margins, extension to the crypts and mitoses. **Tumori**, Milano, v. 90, n. 5, p. 473-7, set./out. 2004.
- MERKELBACH-BRUSE, S.; JAKOB, C.; TIETZE, L. *et al.* Consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for human papillomavirus detection and typing in cervical specimens. **Diagn. Mol. Pathol.**, New York, v. 8, n. 1, p. 32-8, mar. 1999.
- MONNIER-BENOIT, S.; MAUNY, F.; RIETHMULLER, D. *et al.*. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant lesions of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, San Diego, v. 102, n. 1, p. 22-31, jul. 2006.
- MOORE, B. C.; HIGGINS, R. V.; LAURENT, S. L. *et al.*. Predictive factors from cold-knife conization for residual cervical intraepithelial neoplasia in subsequent hysterectomy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 173, n. 2, p. 361-6, ago. 1995.
- MOORE, J. G.; MORTON, D. G.; APPLGATE, J. W. *et al.*. Management of early carcinoma. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 81, n. 6, p. 1175-82, jun. 1961.
- MOTA, F.; RAYMENT, N.; CHONG, S. *et al.*. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford., v. 116, n. 1, p. 33-40, abr. 1999.

MOUGIN, C.; DALSTEIN, V.; PRETET, J. L. *et al.*. Epidemiology of cervical papillomavirus infections: recent knowledge. **Med. Press**, London, v. 30, n. 20, p. 1017-23, jun. 2001.

MOURITS, M. J. E.; PIETERS, W. J.; HOLLEMA, H. *et al.*. Three-group metaphase as a morphologic criterion of progressive cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 167, n. 3, p. 591-5, set. 1992.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 19, n. 1-2, p. 1-5, out. 2000.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; de SANJOSE, S. *et al.*. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 305, n. 2, p. 293-301, mar. 1994.

NEVES, K.; FONSECA, C. S.; MENDONÇA, M. Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau do colo uterino: aspectos epidemiológicos e diagnósticos. **J. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 63-8, ago. 2005.

NIMAKO, M.; FIANDER, A. N.; WILKINSON, G. W. *et al.*. Human papillomavirus: specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Cancer Res.**, Chicago, v. 57, n. 21, p. 4855-61, nov. 1997.

NOMELINI, R. S. **Proposta de inserção de método de biologia molecular para diagnóstico de papilomavírus humano no trato genital inferior feminino na prevenção de câncer de colo uterino no Sistema Único de Saúde.** 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Ginecológica)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2005.

OLIVEIRA, L. do H. dos S.; RODRIGUES, E. de V. M.; LOPES, A. P. T. A. de S. *et al.*. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v. 121, n. 2, p. 67-71, mar. 2003.

OSTERGARD, D. R. Prediction of clearance intraepithelial neoplasia by conization. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 56, n. 1, p. 77-80, jul. 1980.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 327 p.

PHELPS, J. Y. 3rd.; WARD, J. A.; SZIGETI, J. 2nd. *et al.*. Cervical cone margins as a predictor for residual dysplasia in post-cone hysterectomy specimens. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 84, n. 1, p. 128-30, jul. 1994.

PINZON-CHARRY, A.; HO, C. S.; LAHERTY, R. *et al.*. Population of HLA-DR= Immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. **Neoplasia**, New York, v. 7, n. 12, p. 1112-22, dez. 2005.

PIRES, M. A.; DIAS, M.; OLIVEIRA, C. *et al.*. Factors of recurrence of intraepithelial lesions of the uterine cervix. **Acta Med. Port.**, Lisboa, v. 13, n. 5/6, p. 259-63, set./dez. 2000.

- RABELO-SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L. L. *et al.*. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 181-4, mar. 2003.
- RESNICK, M.; LESTER, S.; TATE, J. E. *et al.*. Viral and histopathologic correlates of MN and MIB-1 expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 234-9, mar. 1996.
- RICHART, R. M.; MASOOD, S.; SYRJÄNEN, K. J. *et al.*. International Academy of Cytology Task Force summary. Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: An International Expert Conference and tutorial. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 42, n. 1, p. 50-8, jan./fev. 1998.
- ROBERTS, C. C.; TADESSE, A. S.; SANDS, J. *et al.*. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assay **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 277-82, ago. 2006.
- SALUM, R.; MURTA, E. F. C.; PASCHOINI, M. C.; SOUZA, M. A. H. Neoplasia intraepitelial cervical grau III: diagnóstico e tratamento de 94 casos. **Acta Oncol. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 71-5, mar./abr. 1995.
- SANGUINETE, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, Natick, v. 17, n. 5, p. 914-21, nov. 1994.
- SAUER, G.; WINDISCH, J.; KURZEDER, C. *et al.*. Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 9, n. 17, p. 6426-31, dez. 2003.
- SCHULMAN, H.; CAVANAGH, D. Intraepithelial carcinoma of the cervix: the predictability of residual carcinoma in the uterus from microscopic study of the margins of the cone biopsy specimen. **Cancer**, New York, v. 14, n. 4, p. 795-800, jul./ago. 1961.
- SHEPHERD, P. S.; ROWE, A. J.; CRIDLAND, J. C. *et al.*. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. **J. Gen. Virol.**, London, v. 77, part. 4, p. 593-602, abr. 1996.
- SILVA, C. S. da. **Estudo imunohistoquímico das subpopulações de linfócitos, macrófagos e óxido nítrico sintase induzida em colo uterino de mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical, grau III e carcinoma epidermóide invasivo.** 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Patologia Ginecológica e Obstétrica)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006.
- STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, supl. 1, p. S16-22, mar. 2005.
- TCHILIAN, E. Z.; BEVERLEY, P. C. Altered CD45 expression and disease. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 146-7, mar. 2006.

TER HARMSEL, B.; SMEDTS, F.; KUIJPERS, J. *et al.*. Relationship between human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 93, n. 1, p. 46-50, jan. 1999.

TERR, A. L.; STITES, D. P. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 187 p.

TERRA, A. P. S. **Tipos de papilomavírus humano e alterações epigenéticas em neoplasia intra-epitelial cervical, através da técnica da reação em cadeia da polimerase**. 2003. 93 f. Tese (Doutorado em Patologia Clínica)- Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2003.

TERRA, A. P. S.; MURTA, E. F. C.; MALUF, P. J. *et al.*. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN III) related to the type of human papillomavirus (HPV). In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 13., 2002, Águas de Lindóia. **Anais da Sociedade Brasileira de Virologia**, 2002. p. 134-35.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 2, n. 1, p. 59-65, jan. 2002.

VERAS, V. S.; CERQUEIRA, D. M.; MARTINS, C. R. F. L1 sequence of a new human papillomavirus type-58 variant associated with cervical intraepithelial neoplasia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Brasília, DF, v. 38, n. 1, p. 1-4, jan. 2005.

WALKER, L. S.; ABBAS, A. K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 2, n. 1, p. 11-9, jan. 2002.

WHITE, C. D.; COOPER, W. L.; WILLIAMS, R. R. Cervical intraepithelial neoplasia extending to the margins of resection in conization of the cervix. **J. Reprod. Med.**, St. Louis, v. 36, n. 9, p. 635-8, set. 1991.

WONG, J. A.; CLARK, J. F. Residual carcinoma in hysterectomy specimens following cervical conization: a review of cases at Freedmen's Hospital over a ten year period. **J. Natl. Med. Assoc.**, New Jersey, v. 69, n. 3, p. 271-2, maio 1969.

ZEHBE, I.; RYLANDER, E.; EDLUND, K. *et al.*. Detection of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia, using in situ hybridization and various polymerase chain reaction techniques. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 428, n. 3, p. 151-7, jun. 1996.

ANEXOS

ANEXO A. Distribuição dos 35 casos de NIC III demonstrando a idade das pacientes, os achados imunoistoquímicos, a tipagem de HPV e a evolução clínica.

Nº	ID	MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE						TIPAGEM HPV			EVOLUÇÃO	
		CD20	CD68	CD45RO	CD3	CD8	iNOS	6/11	16	18	CR	SR
1	36	1	1	3	3	0	0		X			X
2	27	1	0	1	2	1	1					X
3	33	1	1	3	2	2	0					X
4	34	1	1	1	1	0	0	X	X			X
5	31	2	1	1	1	0	1	X				X
6	27	0	0	3	3	1	1					X
7	22	2	1	1	2	1	0	X				X
8	26	2	1	2	2	0	0		X	X	X	
9	49	1	0	2	3	1	1	X		X	X	
10	29	3	0	3	1	0	0					X
11	44	1	1	3	2	0	1					X
12	27	1	1	3	3	0	0			X	X	
13	22	1	0	2	3	1	1	X		X	X	
14	40	0	1	2	3	0	1					X
15	36	1	0	3	2	1	1		X	X	X	
16	54	0	0	2	2	0	0					X
17	31	1	1	1	1	0	1		X			X
18	27	1	0	2	1	2	0	X	X			X
19	46	0	1	2	2	0	0		X			X
20	33	0	0	1	1	0	0					X
21	31	0	0	2	0	2	0					X
22	62	1	1	3	1	1	1		X			X
23	24	1	1	3	1	0	1					X
24	47	0	1	2	2	1	0					X
25	40	2	1	3	3	0	0					X
26	40	2	0	1	2	1	1					X
27	27	1	0	1	3	0	0				X	
28	28	1	0	3	2	1	1					X
29	54	0	0	2	1	1	0		X	X		X
30	30	0	1	3	2	2	1					X
31	39	1	1	3	1	1	2					X
32	32	1	0	2	2	1	1				X	
33	32	0	0	1	0	0	0					X
34	36	1	0	2	1	2	1					X
35	24	1	1	3	2	1	0					X

CR: Com recidiva – SR: Sem recidiva.

ANEXO B. Referências normativas.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Referências Bibliográficas:**
NBR 6023/2003.

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFTM. **Manual do pós-graduando do CPGP/UFTM.** Disponível em http://www.uftm.edu.br/patolo/manual_pgraduando.htm. Acesso em 12 de junho de 2006.

Horizonte GUSMÃO, S. N. S. Redação de Tese e Dissertação. **Rev. Med. Minas Gerais**, Belo, v. 10, n.4, p. 243-48, abr. 2000.

SPECTOR, N. **Manual para a redação de teses, dissertações e projetos de pesquisa.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

ANEXO C. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa da UFTM.