



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RONARA ADRIANE GONÇALVES CAMBUÍ FREITAS**

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS CD8 EM MULHERES INFECTADAS COM  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2017**

**RONARA ADRIANE GONÇALVES CAMBUÍ FREITAS**

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS CD8 EM MULHERES INFECTADAS COM  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia.

**ORIENTADORA:**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Tatjana Keesen de Souza Lima

**COORIENTADORA:**

Prof. Dr<sup>a</sup> Daniele Idalino Janebro Ximenes

**JOÃO PESSOA – PB**

**2017**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

F866a Freitas, Ronara Adriane Gonçalves Cambuí.

Avaliação de células CD8 em mulheres infectadas com papilomavírus humano / Ronara Adriane Gonçalves Cambuí Freitas. - João Pessoa, 2017.

59 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.

Coorientação: Daniele Idalino Janebro Ximenes.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Papilomavírus humano (HPV). 2. Citometria. 3. Linfócitos T CD8. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Ximenes, Daniele Idalino Janebro. III. Título.

UFPB/BC



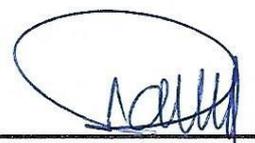
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia

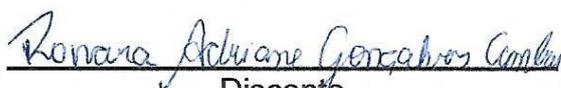


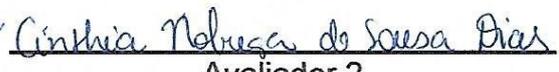
**ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aos vinte e quatro dias do mês de novembro de 2017, às 14:00 h, em sessão pública na sala 10 do bloco administrativo do Centro de Biotecnologia deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos (CBIOTEC/UFPB); 2. M<sup>a</sup>. Cíntia Nóbrega Dias (PgPNSB/UFPB), a discente Ronara Adriane Gonçalves Cambuí, matrícula 11312825, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Avaliação de células CD8 em mulheres infectadas com papilomavírus humano**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

  
Presidente da Banca Examinadora

  
Avaliador 1

  
Discente

  
Avaliador 2

Dedico honrosamente aos meus pais, Eni e Dorilson Cambuí que, com tanto afincio e amor, me demonstraram o verdadeiro caminho do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, por ser a razão da minha existência, meu melhor amigo, e autor do meu destino. Sempre me acompanhando de suas bênçãos, guardando os meus passos, me livrando de caminhos tortuosos e me concedendo a graça de seu amor. À ti registro minha gratidão e amor infundável. Tu és o meu Senhor e não há outro bem além de ti.

Aos meus queridos pais, **Eni e Dorilson Cambuí**, pelo amor, carinho, zelo e proteção. Me ensinaram que a verdadeira busca pela sabedoria deve estar atrelada à honestidade, humildade, amor e temor à Deus; sem estes, o caminho trilhado poderia ser controverso à humanidade. E com isso, sempre me intensificaram de que: não há limites para a felicidade!

À minha irmã, **Raylane Cambuí**, por dividir comigo momentos inesquecíveis em nossa história. “Minha maninha”. Sempre foi e será meu exemplo de foco, esforço e dedicação.

Ao meu digníssimo esposo, **Jeffther Freitas**. Um dos grandes presentes que Deus me concedeu. Sempre apoiando meus sonhos e estimulando suas realizações. Compartilha comigo suas lindas qualidades, e eu me sinto honrada. As quais desejo que também sejam estendidas ao nosso **bebê** que, mesmo ainda em formação, já enriquece nossa linda família de amor, e por este almejo ansiosamente.

Aos meus sogros, **Cleide e Rogério Freitas**, me acolhendo nesta linda família, aonde depositam confiança em meus desejos e contribuem grandemente na construção do meu caráter.

À minha cunhada, **Jéssica Freitas**, e seu esposo **Mário Tolino**, sempre demonstrando que os anseios podem ser acompanhados de mansidão e paciência.

Às avós **Maria de Lourdes, Esmeralda, Maria do Amparo e Helena**. Mulheres guerreiras. Exemplos de persistência, luta, amor e de que sempre “amanhã há de ser outro dia”.

Aos meus avôs **Sebastião** e **Edvaldo**, raízes da minha personalidade. Motivos de me sentir tão orgulhosa em ser vossa neta. Com vocês pude tirar à prova de que há muito mais felicidade quando a sabedoria é acompanhada pela simplicidade.

À toda **família Gonçalves e Cambuí**, tios e tias, primos e primas. Acompanharam todo meu crescimento e enriquecem minha vida de alegria e união.

À linda **família LABIDIC** cuja honra fui contemplada. Ao chegar em João Pessoa, laços de amizade me fizeram falta. Então, roguei à Deus que me concedesse boas amizades. Ele me surpreendeu preparando vocês: pesquisadores da alegria. A união que há entre nós emite em nossas conquistas. Com vocês, prazer e pesquisa são parâmetros inseparáveis.

Em especial, à **Bruna de Gois** e **Cíntia Nóbrega**, pelo grande suporte nos dias de experimentos e desenvolvimento deste trabalho. Bruninha, o prazer que você deposita em ajudar o próximo é uma qualidade linda, rara e eu tive o prazer de ser beneficiada. Que o sucesso acompanhe seus desejos!

À minha estimada orientadora **Tatjana Keesen**, sempre transmitindo confiança, dedicação e demonstrando o caminho para alcançar os objetivos. Desenvolveu em mim o amor pela ciência. Os aprendizados que obtive com você sempre farão parte da minha vida pessoal e acadêmica.

À minha coorientadora **Daniele Idalino** que me possibilitou o aprofundamento na área do HPV. Seu amor e entusiasmo por esta área é notório. Fatores que me serviram de grande exemplo.

À turma de **Biotecnologia 2013.2**, em especial as alunas Brenda, Ana Paula e Isabela, e aos **professores** que contribuíram imensamente para nossa formação.

Aos membros da Banca Examinadora, **Rafael de Almeida Travassos** e **Cíntia Nóbrega Dias** por colaborarem enriquecendo este trabalho. Muito obrigada!

*“Filho meu, se aceitares as minhas palavras e esconderes contigo os meus mandamentos para fazeres atento à sabedoria o teu ouvido, e para inclinares o teu coração ao entendimento, e se clamares por entendimento e por inteligência alçares a tua voz, se como a prata a buscares e como a tesouros escondidos a procurares, então entenderás o temor do Senhor, e acharás o conhecimento de Deus. Porque o Senhor dá a sabedoria: da sua boca vem o conhecimento e o entendimento. Então entenderás justiça, e juízo, e equidades, e todas as boas veredas. ”*

## RESUMO

Os Papilomavírus humano (HPV) são microorganismos responsáveis pelo desenvolvimento de lesões verrugosas na pele e nas mucosas, sendo classificadas em lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e lesão intraepitelial escamosas de alto grau (HSIL). Frequentes estudos vem sendo intensificados a fim de compreender o perfil imunológico do hospedeiro atrelado à progressão ou regressão da infecção, uma vez que o vírus apresenta diversos mecanismos de evasão à resposta imunológica. Células T CD8+ apresentam papéis fundamentais no controle de infecções virais, porém, seu perfil ainda se encontra pouco elucidado em infecções por HPV. Diante disso, este trabalho objetivou avaliar o perfil imunológico de células T CD8+ quanto a expressão das moléculas CD95, CD95L, PD-1 e granzima B em mulheres apresentando LSIL e HSIL. Para isto, foram obtidas 9 amostras de sangue periférico de mulheres portadoras de LSIL, 7 amostras de HSIL e 9 amostras de indivíduos saudáveis. Para avaliação da imunofenotipagem foi realizado o protocolo experimental para citometria de fluxo, recebendo marcação com anticorpos monoclonais anti-CD8, anti-CD95, anti-CD95L, anti-PD1 e anti-GRANZIMA B. Desta maneira, foi possível obter os seguintes resultados: a) não foi identificado alterações na frequência de linfócitos totais nas pacientes com LSIL e HSIL; b) linfócitos T CD8+ demonstraram redução significativa em pacientes com LSIL; c) identificou-se uma redução na expressão de CD95 e CD95L de células T CD8+ em pacientes com HSIL; d) a expressão de PD-1 foi elevada em células T CD8+ de pacientes com HSIL; e) alta expressão de granzima B em células T CD8+ de pacientes com HSIL. Desta forma, o estudo sugere que o caráter mais brando da LSIL pode estar atrelado à baixa frequência de linfócitos T CD8+ da periferia com possível migração para o sítio infectado, a fim de promover o controle da infecção; enquanto que a progressão para HSIL pode estar relacionada ao desenvolvimento de exaustão celular pelas células T CD8+ diante dos mecanismos de evasão e persistência viral.

**Palavras-chave:** HPV, Citometria, Linfócitos T CD8.

## ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) are microorganisms responsible for the development of warts on the skin and mucous membranes and are classified into low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Studies has been intensified in order to understand the immunological profile of the host linked to the progression or regression of the infection, since the virus presents several mechanisms of evasion to the immune response. CD8 + T cells play fundamental roles in the control of viral infections, however, their profile is still poorly elucidated in HPV infections. Therefore, the objective of this study was to evaluate the CD8+ T cell immunity profile of CD95, CD95L, PD-1 and granzyme B in women presenting LSIL and HSIL. To reach this aim, 9 peripheral blood samples were obtained from women with LSIL, 7 samples from women with HSIL and 9 samples from healthy subjects. In order to evaluate the immunophenotyping, the experimental protocol for flow cytometry was performed, where these samples were labeled with anti-CD8, anti-CD95, anti-CD95L, anti-PD1 and anti-Granzyme B monoclonal antibodies. Thus, the following results were obtained: a) there was no changes in frequency of lymphocytes in LSIL and HSIL patients; b) there was a reduction of T CD8+ in LSIL patients; c) T CD8+ from HSIL patients demonstrated reduction of CD95 and CD95L expression; d) elevated PD-1 expression in T CD8+ cells from HSIL patients; e) higher expression of granzyme B in T CD8+ of HSIL patients. Thus, the study suggests that the milder profile of LSIL may be due to the low frequency of peripheral CD8+ T lymphocytes linked with possible migration of these cells to the infected site in order to promote infection control; while the progression to HSIL may be related to the development of cellular exhaustion by CD8+ T cells in the presence of evasion and viral persistence mechanisms.

**Keywords:** HPV, Cytometry, Lymphocytes T CD8.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero) .....	22
<b>Figura 2</b> - Organização genômica do papilomavírus. ....	24
<b>Figura 3</b> - Infecção do epitélio escamoso pelo HPV. ....	25
<b>Figura 4</b> - Estratégia de análise. ....	38
<b>Figura 5</b> - Frequência de linfócitos em relação aos demais leucócitos em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), e de indivíduos saudáveis (controle). ....	40
<b>Figura 6</b> - Frequência de linfócitos T CD8+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle). ....	41
<b>Figura 7</b> - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando PD-1+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle). ....	42
<b>Figura 8</b> - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD95+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle). ....	43
<b>Figura 9</b> - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD95L+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle). ....	44
<b>Figura 10</b> - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD95+CD95L+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle). ....	45
<b>Figura 11</b> - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando Granzima B+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle). ....	46

## SIGLAS E ABREVIações

**LSIL:** Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)

**HSIL:** High-grade Cervical Squamous Intraepithelial Lesion (Lesão Intraepitelial Escamosas de Alto Grau)

**HPV:** Papilomavírus humano

**ME:** Microscopia Eletrônica

**ICTV:** Comitê Internacional de Taxonomia Viral

**BPV:** Papilomavírus bovino

**CPV:** Papilomavírus canino

**OPV:** Papilomavírus ovino

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**nm:** Nanômetro

**kDa:** Quilodaltons

**LCR:** Long Control Region (Região Longa de Controle)

**URR:** Upstream Regulatory region

**E:** Early Region (Região Precoce)

**L:** Late Region (Região Tardia)

**NIC:** Neoplasia Intra-epitelial Cervical

**NIC I:** Neoplasia Intra-epitelial Cervical de grau I

**NIC II:** Neoplasia Intra-epitelial Cervical de grau II

**NIC III:** Neoplasia Intra-epitelial Cervical de grau III

**CD:** Células Dendríticas

**CL:** Células de Langerhans

**NK:** Natural Killer

**NKT:** Natural Killer T

**CK:** Célula Queratinócito.

**Th1:** T-helper1

**Th2:** T-helper 2

**IL-2:** Interleucina-2

**IL-12:** Interleucina-12

**IFN- $\gamma$ :** Interferon-gama

**CTL:** Células T Citotóxicas

**MHC1:** Molécula Maior de Histocompatibilidade do tipo 1

**CD95:** Cluster of Differentiation 95 (Grupo de Diferenciação 95)

**APO1:** Apolipoproteína 1

**TNFR6: Receptor** Fator de Necrose Tumoral tipo 6

**TNF:** Fator de Necrose Tumoral

**DD:** Domínio da Morte

**CD95L:** Cluster of Differentiation 95 Ligand (Ligante do Grupo de Diferenciação 95)

**DISC:** Death-Inducing Signaling Complex (Complexo de Sinalização Indutor da Morte)

**TCR:** Receptores de Células T

**PD-1:** Programmed cell Death-1 (Programador de Morte Celular tipo 1)

**CD-279:** Cluster of Differentiation 279 (Grupo de Diferenciação 279)

**PD-1L:** Programmed cell Death-1 ligand (ligante do programador de morte celular 1)

**CD274:** Cluster of Differentiation 274 (Grupo de Diferenciação 274)

**PCR:** Reação em Cadeia por Polimerase

**VLP:** Partículas Vírus "Like"

**LCMV:** Lymphocytic Choriomeningitis (Vírus da Coriomeningite Linfocítica)

**L1:** Proteína Estrutural Tardia do tipo 1

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**NILM:** Indivíduos Negativos para Lesão Intraepitelial e Malignidade

**CEDC:** Centro Especializado de Diagnóstico do Câncer

**LABIDIC:** Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas

**CBIOTEC:** Centro de Biotecnologia

**UFPB:** Federal da Paraíba

**CAAE:** Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

**TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**USA:** United States of América (Estados Unidos da América)

**BD:** Becton e Dickinson

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium (meio de manutenção pelo Instituto Parque Memorial Roswell)

**IL-10:** Interleucina-10

**IFN $\gamma$ :** Interferon-gama

**CD80:** Cluster of Differentiation 80 (grupo de Diferenciação 80)

**CD86:** Cluster of Differentiation 86 (Grupo de Diferenciação 86)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
2.1	Breve Histórico	19
2.2	Epidemiologia	20
2.3	A Biologia e a patogênese das papilomavíroses	22
2.3.1	Taxonomia e nomenclatura	22
2.3.2	Morfologia e patogênese viral	24
2.4	Resposta imunológica direcionada ao HPV	27
2.5	Diagnóstico e profilaxia	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1	Aspectos Éticos	35
4.2	Amostras Clínicas	35
4.3	Procedimentos e técnicas	36
4.3.1	Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos	36
4.3.2	Marcação com anticorpos monoclonais com fluorescência	36
4.4	Análise dos dados	37
4.4.1	Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo	37
4.4.2	Estratégia de análise	37
4.6.3	Análise estatística	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1	Análise da frequência de linfócitos gerais	40
5.2	Análise da frequência de linfócitos T citotóxicos (CD8+)	41

5.3	Análise da frequência de linfócitos T CD8+ expressando PD-1+.....	42
5.4	Análise da frequência dos marcadores CD95+, CD95L+ e sua co-expressão em células T CD8+ .....	43
5.5	Análise da frequência de linfócitos T CD8+ expressando Granzima B+ .....	46
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA que infecta o epitélio estratificado escamoso da pele e membranas mucosas. Pertence à família Papovaviridae e ao gênero *Papillomavirus*. Sua classificação não é baseada em sorotipos, mas em diferenças genotípicas (DE LIMA CÂMARA, 2008). Assim, mais de 130 genótipos de HPV já foram sequenciados, os quais apresentam peculiaridades oncogênicas inferindo na infecção (NO et al., 2010).

Desta forma, há HPVs considerados de baixo risco e alto risco oncogênico. Os HPVs de baixo risco estão associados com lesões benignas, como verrugas genitais. Os HPVs de alto risco contribuem no desenvolvimento de diversos cânceres, como o câncer cervical (NO et al., 2010).

Em 2016, o câncer cervical foi considerado a quarta neoplasia mais prevalente em mulheres mundialmente, representando cerca de 79% dos cânceres. No Brasil, a Região Norte apresentou maior incidência deste carcinoma (23,97/100 mil), seguida pela Região Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil) (BRASIL/INCA, 2016).

De acordo com o tipo viral as lesões por Papilomavírus podem apresentar um grau mais branda - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) - ou progredir para um grau mais severo - lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) - (NO et al., 2010). Isto se dá devido a execução de mecanismos virais que proporcionam sua persistência e progressão da infecção.

Desta maneira, as respostas imunológicas indicam papel fundamental no controle da infecção. Portanto, a compreensão dos mecanismos imunológicos durante os estágios das lesões ainda se encontra pouco elucidado na literatura científica, uma vez que o HPV executa mecanismos de evasão da resposta imune.

Diante disso, vê-se a necessidade de estudos que contribuam para a compreensão destes mecanismos, tanto em estágio menos grave (LSIL) como no estágio mais avançado e grave (HSIL), a fim de que sirvam como base para o estabelecimento de um possível perfil prognóstico, podendo ser utilizado como auxiliar no determinante da conduta terapêutica.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Breve Histórico

No século XIX, especificamente na região da Grécia e Roma, detectou-se os primeiros relatos descritivos de verrugas genitais, quando Virchow, em 1867, denominou as lesões genitais de condilomas e as descreveu como massas com pequenas elevações na superfície, semelhantes à couve-flor (ORIEL, 1971).

Portanto, a identificação de verrugas cutâneas e sua semelhança com os condilomas encontrados na região genital era questionável. Desta forma, no final do século XIX e início do século XX diversos experimentos foram intensificados em busca de respostas para este questionamento. Até que Ciuffo, em 1907, realizou uma auto-inoculação com o extrato filtrado de verrugas cutâneas na região genital, provocando o desenvolvimento de verrugas genitais com características semelhantes às cutâneas, concluindo assim que ambas patologias compartilhavam do mesmo agente etiológico (ORIEL, 1997; ONON, 2011).

Em confirmação, em 1949, através da microscopia eletrônica (ME) foi-se analisado o exsudato de verrugas cutâneas observando a presença de partículas virais distribuídas em padrão cristalino (ORIEL, 1997). Em 1968 realizaram novamente o mesmo experimento, mas desta vez, a partir do exsudato de verrugas genitais, identificando assim, o mesmo agente etiológico. Logo, foi-se postulado a “Teoria Unitária”, afirmando que as verrugas cutâneas e genitais são causadas por vírus idênticos ou fortemente relacionadas ao Papilomavírus humano, classificando-o no grupo Papova (DUNN, et al., 1968; ALMEIDA, et al., 1969; ORIEL 1971).

O termo Papova deriva de três palavras: papiloma (verrugas do coelho e do homem), polioma (do rato) e vacuolizante (de células do símio). Posteriormente, ao identificarem a infecção por papilomavírus em outros hospedeiros, foi-se incluído no grupo Papova os Papilomavírus bovino, canino, humano, entre outros, os quais compartilhavam de características comuns: DNA circular de dupla fita e capacidade em produzir infecções latentes ou crônicas em seus hospedeiros ocasionando transformação de células normais em neoplásicas (VILLA, 1998).

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, em 1974, Zur Hausen e colaboradores identificaram o DNA do HPV por hibridização molecular e sucessivos estudos permitiram a identificação de diversos tipos virais do

papilomavírus, tornando possível observar que alguns genótipos eram repetidamente encontrados em determinadas regiões e graus de lesões, tais como: HPV 1 e 4 em verrugas na pele, HPV 6 e 11 em verrugas anogenitais e HPV 16 e 18 em lesões intraepiteliais cervicais e câncer do trato genital (SCHIFFMAN, et al., 2007; GISSMANN, et al., 1977).

Entre 1974 até 1976 diversos estudos se intensificaram em analisar o possível papel do HPV no câncer cervical, o que demonstrou a natureza heterogênea da família Papilomavírus, permitindo um novo olhar para o possível envolvimento do vírus em áreas antes não observadas, como em papilomas laríngeos e cânceres anogenitais. Estima-se que 4% de todos os cânceres humanos são atribuídos ao HPV, porém, quando a proporção de câncer de cabeça e pescoço atribuídas ao HPV esteja melhor entendida, é possível que esta taxa esteja subestimada (COSTA, 2013).

Após o estabelecimento efetivo do papilomavírus como agente necessário para o desenvolvimento das neoplasias cervicais, a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) tem sido considerada a doença sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo e, de acordo com o Ministério da Saúde em 2014, a maioria das pessoas sexualmente ativas, homens e mulheres, terão contato com o vírus durante algum momento da vida (FACINA, 2014).

## **2.2 Epidemiologia**

O principal método de transmissão do HPV é através do ato sexual. Logo, as estimativas de contaminação em indivíduos sexualmente ativos ao longo de suas vidas são de aproximadamente 80%, dentre os quais, aproximadamente 40% provém do sexo feminino (PINTO, 2010). A infecção pelo HPV é mais prevalente em jovens sexualmente ativos até os 35 anos de idade, apresentando infecção apenas em 10% das mulheres acima de 40 anos e 5% das mulheres acima de 55 anos (PINTO, 2010).

Enquanto a infecção por HPV em mulheres são frequentemente relatados, casos em homens aparenta ser pouco observado. Isto se dá devido a infecção masculina apresentar-se, em sua maioria, de forma subclínica, resultando em um potencial número de assintomáticos considerados reservatórios e transmissores do vírus. No entanto, agravamentos clínicos como carcinomas de pênis, ânus e

orofaríngeo vem apresentando uma tendência de aumento em homens com HPV (SILVA, 2011).

A prevalência da infecção por HPV em homens apresenta-se de forma bastante variável em diversos países, devido aos diferentes métodos utilizados para a obtenção das amostras genitais, o que dificulta a realização da comparação entre os estudos. Entretanto, os resultados das diversas investigações têm sugerido que a infecção por HPV em homens sexualmente ativos é tão prevalente quanto a infecção por HPV na cérvix uterina (SILVA, 2011).

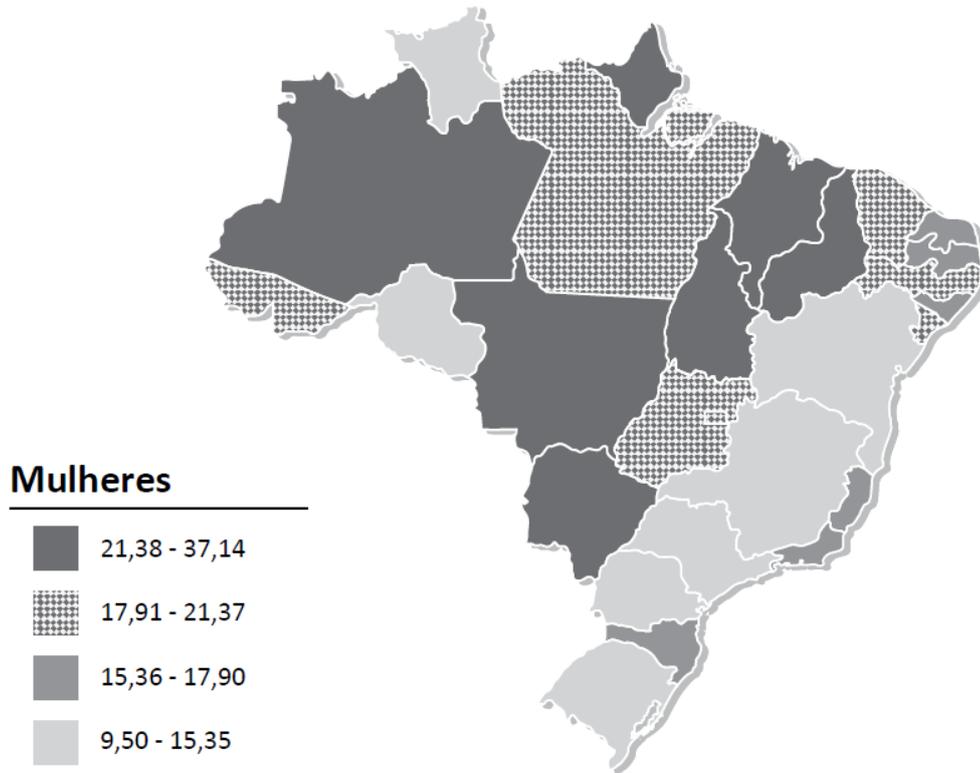
Com base nas informações do projeto Globocan, na região da América Latina e do Caribe, estimou-se, para 2012, a ocorrência de 1,1 milhão de casos novos de câncer, sendo 560 mil casos novos em mulheres, de forma que o câncer cervical foi considerado o segundo mais incidente (12,2%). Em 2016, foi considerada a quarta neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo, representando cerca de 7,9% (BRASIL/INCA, 2016).

Todavia, quando o diagnóstico é descoberto precocemente, também é o câncer com maior potencial de cura (BRASIL/INCA, 2015). Ainda assim, figura como sendo a segunda causa de morte em mulheres com estimativa de aproximadamente 230.000 casos de mortes anualmente, das quais 80% são oriundas de países em desenvolvimento (BRASIL/INCA, 2016).

No 2016, no Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero foi o primeiro mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição, como pode ser visualizado na figura 1 (BRASIL/INCA, 2016).

Em 2009, foi-se realizado uma estimativa do câncer do colo uterino no Brasil para os anos de 2010/2011, considerando, então, aproximadamente 18.430 novos casos, com incidência de 18 casos para cada 100.000 mulheres (18/100.000). Em 2016, a estimativa norteou em 16.340 casos novos esperados, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL/INCA, 2016).

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero)



Fonte: BRASIL/INCA, 2016.

## 2.3 A Biologia e a patogênese das papilomavíroses

### 2.3.1 Taxonomia e nomenclatura

Os papilomavírus são grupos de vírus de DNA de dupla fita que infectam vertebrados. Seu nome, Papilomavírus, foi derivado do latim *papila* - diminutivo de *papula*, referenciando à projeção ou saliência em forma de mamilo – e *oma*, desinência utilizada pelos antigos médicos gregos para designar as tumorações (BERNARD, 2010).

Até o sexto relatório publicado em 1995, pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral – ICTV – da Divisão de Virologia da União Internacional de Associações de Microbiologia, os gêneros Papillomavirus e Polyomavirus constituíam a família Papovaviridae (MURPHY, et al., 1995). A partir do sétimo relatório (VAN REGENMORTEL, et al., 2011), foi criada a família Papillomaviridae, incluindo apenas o gênero *Papillomavirus*. Atualmente, neste gênero já são descritas

oito espécies, entre as quais encontra-se a espécie *Human papillomavirus* (HPV) (DE LIMA CÂMARA, 2008).

Como observado, as espécies foram então nomeadas de acordo com seu hospedeiro infectante, como os Papilomavírus bovino (BPV), Papilomavírus canino (CPV), Papilomavírus humano (HPV), Papilomavírus ovino (OPV), dentre outros (VAN REGENMORTEL, et al., 2011).

Cada espécie possui subclassificações baseada em diferenças genótípicas a partir de variações nas sequências de nucleotídeos da região gênica responsável por expressar a proteína L1 (BERNARD, et al., 2010). Assim, atualmente já são reconhecidos cerca de 230 tipos virais. Quando tais variações diferem em pelo menos 10% um genótipo viral é identificado. Quando essa homologia varia menos do que 2%, fala-se em variante e, entre 2% e 10%, em subtipo (BURK, 1999). Desta forma, à medida em que genótipos diferentes são descobertos e sequenciados, vão sendo denominados com número sequenciais, como o HPV-6, HPV-11, HPV-16 e HPV-18. Até o momento, 130 genótipos de papilomavírus já foram sequenciados e aproximadamente um terço deles infectam o epitélio escamoso do trato genital (NO, et al., 2010; LORENZON, et al., 2011).

Cada genótipo possui peculiaridades biológicas durante a infecção que podem inferir em seu potencial carcinogênico. Desta forma, há HPVs considerados de baixo risco e alto risco oncogênico. Os HPVs de baixo risco estão associados com lesões benignas, como verrugas genitais e papilomatoses recorrente laríngea. Os HPVs de alto risco contribuem no desenvolvimento de diversos cânceres que incluem o câncer cervical, vaginal, vulvar, anal, peniano e orofaríngeo (NO, et al., 2010).

O HPV-16 e 18 são os principais tipos com alto poder carcinogênico, responsáveis por 70% a 100% do câncer cervical. Enquanto que os tipos 6 e 11 são os principais responsáveis por 90% das verrugas genitais (SCHIFFMAN, et al., 2007).

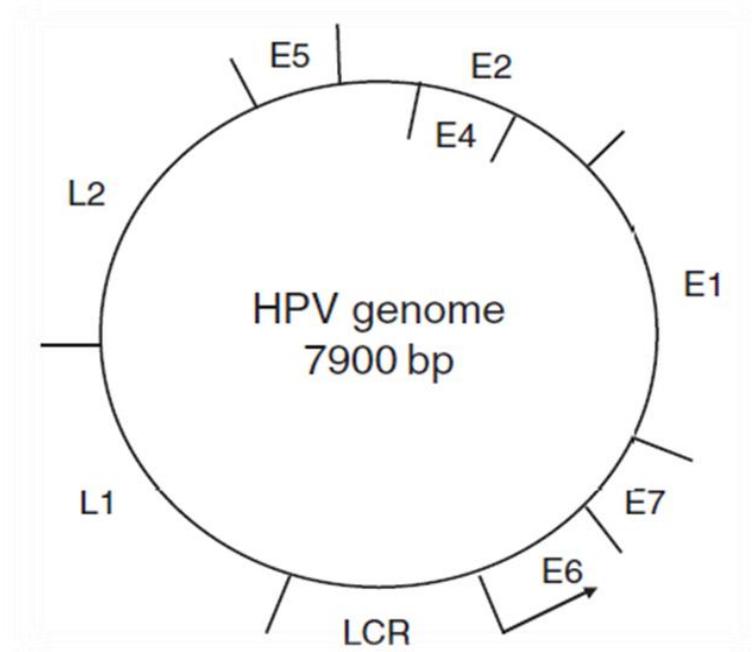
Os papilomavírus são espécie-específicos em tropismo pelo epitélio escamoso da pele e das mucosas. Desta forma, sua infecção pode atingir regiões como o trato anogenital, uretra, pele, laringe, mucosa traqueobrônquica, cavidade nasal, sino paranasal e cavidade oral, (NO, et al., 2010; KUMARASWAMY E VIDHYA, 2011) variando desde verrugas benignas comuns ao câncer invasivo.

### 2.3.2 Morfologia e patogênese viral

Quanto a caracterização viral, o papilomavírus possui um aporte pequeno, com diâmetro em torno de 55nm, formato icosaédrico e não envelopado. Seu capsídeo, com aproximadamente 2 nm de espessura, é composto por 72 unidades morfológicas conhecidas como capsômeros, dispostos segundo uma simetria icosaédrica ( $T=7$ ). Estes são formados a partir pentâmeros da proteína estrutural principal L1 (54 kDa) e da L2 (76 kDa), localizada mais internamente no capsídeo. Tais proteínas são responsáveis pela imunogenicidade do vírus e carregam determinantes antigênicos gênero-específicos (DE LIMA CÂMARA, 2008).

O genoma da partícula viral é formado por duas fitas circulares de DNA composto por, aproximadamente, 7500 a 8000 pares de bases (pb). Apresenta 8 genes na região longa de controle – long control region, LCR, ou upstream regulatory region, URR –. Embora ocorram variações no tamanho e na sequência dos genes e das LCRs entre os diferentes papilomavírus, todos têm a mesma organização genômica (DE LIMA CÂMARA, 2008).

Figura 2 - Organização genômica do papilomavírus.

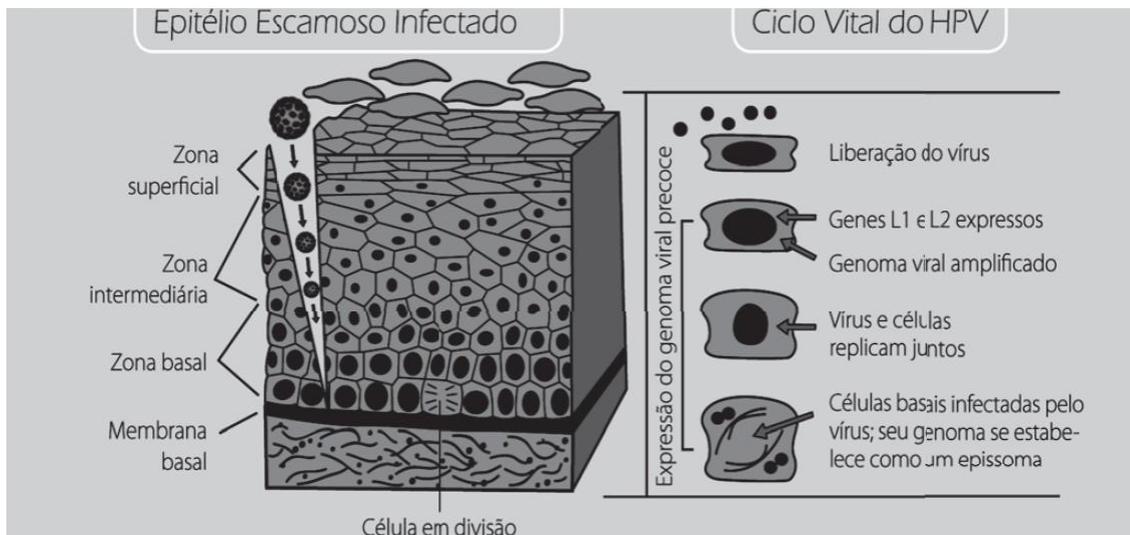


Fonte: BERNARD, 2008.

A região longa de controle (LCR) incorpora a região precoce E (early region) e a região tardia L (late region). – A região precoce E é responsável pelos genes que codificam as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, as quais atuam no controle do ciclo celular e regulação da transcrição e replicação viral. Já na região tardia L localiza-se os genes L1 e L2, envolvidos na constituição estrutural do capsídeo viral (Figura 2) (BERNARD, et al., 1994).

Sua infecção tem início quando as partículas virais penetram no epitélio escamoso a partir de microfissuras, atingindo as células da camada mais profunda, na zona basal (Figura 3). Através da interação das proteínas do capsídeo viral com receptores específicos da célula-alvo faz-se possível sua entrada no ambiente intracelular. Estudos *in vitro* apontam a alfa-6 integrina como o receptor celular envolvido na internalização do papilomavírus (EVANDER, 1997).

Figura 3 - Infecção do epitélio escamoso pelo HPV.



Fonte: BERNARD, 2008.

As células da zona basal são caracterizadas por encontrar-se em um estado mais imaturo, apresentando-se menos diferenciadas e com maior atividade mitótica. Desta forma, no interior celular, em um estágio inicial não há a produção de progênes virais e baixa expressão das proteínas E1, E2, E6 e E7 (RAUTAVA SYRJANEN, 2011). Quando a célula infectada inicia o processo de diferenciação compondo a zona intermediária e zona superficial, o DNA viral é exposto à ação de enzimas nucleares favorecendo a alta expressão de todas as proteínas necessárias

para a replicação viral, principalmente de E6 e E7 (STANLEY, 2006). A replicação ocorre com cerca de 1000 cópias por célula, expressando, então, as proteínas L1 e L2 contribuindo para a montagem da nova partícula viral. Com a célula já diferenciada, o DNA viral é empacotado em capsídeos virais e liberado através da superfície da célula epitelial. Com isto, após o período de incubação viral de 2 a 3 semanas as células infectadas começam a demonstrar alterações morfológicas que podem acarretar na manifestação de lesões escamosas, na região cutânea ou mucosa, conforme o tipo do vírus (SNIJDERS, et al., 2010).

Quando as alterações morfológicas são identificadas nas células já diferenciadas, ditas maduras, que compõem a zona superficial e intermediária, é possível considerar um quadro de displasia branda. Portanto, quando tais alterações são detectadas maiormente nas células basais, afetando seu processo de diferenciação, considera-se uma displasia mais moderada ou até mesmo grave (DE LIMA CÂMARA, 2008).

Apesar da infecção por HPV se espalhar mais comumente de forma sexual, outros meios de transmissão também já foram descritos, como a transmissão vertical (a partir da passagem da criança pelo canal do colo uterino infectado durante o parto) e também através de auto-inoculação. Contudo, alguns pesquisadores também defendem a possibilidade de transmissão do HPV através de formas fômites, como o uso compartilhado de objetos contaminados, uma vez que o HPV é altamente resistente aos efeitos de alta temperatura e baixa umidade climática (KUMARASWAMY E VIDHYA, 2010).

Richart e Barron (1969) propuseram o termo Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC), devido à percepção da natureza progressiva das lesões, classificando em NIC I, II, III, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. NIC I está relacionada à atividade de replicação do HPV apresentando manifestações clínicas de forma branda e forte tendência de regressão espontânea. A medida que as lesões e infecção persistem em direção a um quadro oncológico tem-se a NIC II e NIC III, sendo esta última um estágio mais agravante. Cerca de 12% dos casos de NIC III progredem para um carcinoma se não tratados (BERNARD, 2010).

Sendo assim, sua infecção pode acarretar em um quadro latente ou ativo. Na infecção latente, praticamente não são observados os efeitos de citopáticos do vírus e o epitélio apresenta-se aparentemente normal. A infecção ativa pode ser classificada como clínica – condiloma acuminado e carcinoma invasivo – ou

subclínica – Neoplasia Intraepitelial Cervical de Baixo grau e de Alto Grau. Paralelo ao termo proposto por Richart e Barron (1969), as classificações em Neoplasia Intraepitelial Cervical permitem incorporar o estágio NIC I compondo o quadro de Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL, do inglês lowgrade squamous intraepithelial lesion), e NIC II e III em uma Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL, do inglês high-grade cervical squamous intraepithelial lesion) (BERNARD, 2010).

A classificação LSIL indica uma displasia branda, uma lesão pré-maligna com baixo risco carcinogênico, podendo ser causada, principalmente, pelo HPV-6 e 11, estando sempre sujeito à regressão e eliminação viral. O risco de um quadro LSIL evoluir para um câncer é de apenas 0,1%. Já no HSIL as células infectadas apresentam grandes alterações morfológicas em uma displasia mais moderada com grande risco de progredir para uma displasia grave, ou lesões pré-malignas moderadas/avançadas, acarretando até mesmo em um câncer estabelecido. O risco de um resultado HSIL ser uma lesão pré-maligna avançada na biópsia é de 50%. O risco de um resultado HSIL ser um câncer é de 7% (NO, et al., 2010).

## **2.4 Resposta imunológica direcionada ao HPV**

Após a entrada do HPV nas células alvos e proliferação viral, a resposta imune integrada encontra-se voltada à eliminação do patógeno, a partir de mecanismos provenientes da imunidade inata e adaptativa, conforme classificação didática.

Nos estágios precoces da infecção por HPV, a resposta imunológica inata apresenta-se como primeira linha de defesa contra a infecção, envolvendo células como os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CD), células de langerhans (CL), natural killer (NK), natural killer T (NKT) e queratinócitos (CK). A detecção antigênica por estas células permite a utilização de meios de erradicação, o que inclui o recrutamento e ativação de demais células imunológicas, como os integrantes da imunidade adaptativa. Como segunda linha de defesa, a imunidade adaptativa direciona-se no controle da progressão da infecção a partir de mecanismos celulares e humorais (ABBAS, et al., 2012; BERTI, et al., 2017).

Os queratinócitos infectados parecem atuar como principais sentinelas imunológicas. Apesar de sua limitação, são hábeis como apresentadores

antigênicos, induzindo a expressão de citocinas nos perfis T-helper1 (Th1) e T-helper 2 (Th2) de células T CD4+, bem como uma resposta citotóxica em células T CD8+ (BLACK, et al., 2007; BERTI, et al., 2017).

Na presença de citocinas como interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), células T CD8+ são ativadas adquirindo perfil citotóxico no controle de células cervicais pré-neoplásicas e cancerígenas causadas por HPV (BLACK, et al., 2007; BERTI, et al., 2017).

Apesar dos mecanismos citotóxicos das células T CD8+ apresentarem bem elucidados durante uma infecção, o seu perfil em lesões por HPV ainda se encontra incerto. Durante os estágios iniciais o vírus permanece retido nas células basais e as proteínas necessárias para apresentação viral aparecem pouco expressas. Desta forma há pouca apresentação de antígeno viral ao sistema imune local e sistêmico (FELLER, et al., 2010; TORRES-POVEDA, et al., 2014) e isso pode ser um dos mecanismos moduladores do HPV em se evadir da resposta imunológica (FELLER, et al., 2010).

Os linfócitos T CD8+ ou células T citotóxicas (CTL) são capazes de reconhecer a apresentação das proteínas E2 e E6 da partícula viral pelas células infectadas ou fagocitárias, através da Molécula Maior de Histocompatibilidade do tipo 1 (MHC1), desencadeando mecanismos de erradicação da infecção o que inclui a própria célula infectada (BLACK, et al., 2007).

Dentre os métodos citotóxicos dos linfócitos T CD8+ destaca-se a via apoptótica de sinalização extrínseca induzida por receptores de morte celular ativados por seus ligantes, como a molécula CD95 (APO1, Fas, TNFR6). O CD95 é um receptor de membrana do tipo I, pertencentes à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), localizada, predominantemente, na superfície celular dos linfócitos T CD8+ e contendo em sua estrutura citoplasmática um estiramento conservado de 80 aminoácidos, o domínio da morte (DD). Sua estimulação ocorre pelo seu ligante CD95L (FasL, TNFSF6), uma proteína de membrana tipo II envolvida na família TNF, encontrados na superfície das células infectadas ou até mesmo da própria célula T CD8+ (PETER, et al., 2003).

Diversos estudos vêm demonstrando a motilidade, proliferação e senescência celular como resultado da interação de CD95 e CD95L; porém, estes papéis ainda se encontram pouco elucidados na literatura científica, uma vez que dependem da patogenia e do tipo celular infectado. Sendo assim, o mecanismo mais evidenciado

em células neoplásicas e pré-neoplásicas pela interação de CD95 e CD95L é o da via de apoptose pela via intrínseca (PETER, et al., 2015).

Na apoptose intrínseca, a estimulação do CD95 com o seu ligante CD95L permite que o complexo de sinalização indutor da morte (DISC) interaja com a DD do CD95, o que resulta na ativação da caspase-8. Com a via da caspase-8 ativada várias proteínas intracelulares são codificadas afim de executarem, então, a atividade apoptótica na célula infectada (PETER, et al., 2003; PETER, et al., 2015).

Além do mecanismo de morte celular via sinalização enzimática, os linfócitos T citotóxicos efetuam também este papel a partir de exocitose granular. A família das granzimas são proteínas serino-proteases armazenadas e processadas em grânulos citoplasmáticos em linfócitos citotóxicos T CD8+, sendo a granzima B a mais abundante. Essas serino-proteases estão relacionadas à eventos proteolíticos em células-alvo (SHAFER-WEAVER, et al., 2006).

O reconhecimento de uma célula infectada pelos linfócitos T CD8+ determinam a liberação da granzima B juntamente com perforinas por exocitose. Com auxílio da perforina, poros são formados na membrana da célula alvo favorecendo a entrada da granzima B, aonde promoverá sinalizações de destruição da célula infectada (CALDAS, et al., 2006).

Apesar de diversos outros mecanismos citotóxicos das células T CD8+ no controle de uma infecção, vias de auto-regulação podem ser desenvolvidas nas células T CD8+. Após o reconhecimento antigênico pelas células T e ativação da molécula de TCR, a molécula inibitória PD-1 (também conhecida como CD279) pertencente à superfamília B7-CD28 pode ser expressa. Esta proteína é capaz de modificar fortemente a atividade do sistema imunológico. A ativação do PD-1 se dá através do seu ligante PD-1L (também conhecido como B7-H1 e CD274), que culmina no recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2, que agem nas quinases sinalizadoras da via do TCR diminuindo o sinal do TCR, o que, conseqüentemente, conduz a uma redução da ativação e proliferação das células T e da produção de citocinas. (WEN, et al., 2013).

Assim, uma infecção persistente pode acarretar em altos níveis de expressão de PD-1 e PD-L1. O aumento exacerbado da expressão de PD-1 em células T durante infecções está associado à perda de função destas células, conduzindo-as à um estado de exaustão celular, o que favorece a progressão da doença (WEN, et al., 2013).

Portanto, a presença do Papilomavírus humano é condição necessária para o desenvolvimento da lesão intraepitelial, porém não suficiente, uma vez que para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões, fatores imunológicos podem ser considerados agravantes para a persistência viral ou fundamentais para a regressão da lesão.

Nota-se então, o papel crucial dos linfócitos T CD8+ e de sua via citotóxica no controle da infecção por HPV, porém, pouco está elucidado acerca do processo imunológico em lesões intraepiteliais, o que demonstra a grande relevância em compreender o real perfil desta célula T citotóxica em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo e alto grau (HSIL e LSIL), bem como da expressão dos marcadores moleculares CD95, CD95L, PD-1 e da proteína granzima B, os quais podem contribuir como prognóstico para maior controle da patologia.

## **2.5 Diagnóstico e profilaxia**

A profilaxia do HPV visa o controle da transmissão do vírus e diagnóstico precoce da doença, o que depende da realização de programas educativos e o uso de medidas preventivas. A população que tem demonstrado ser mais atingida pelo HPV é a feminina, principalmente em quadros oncogênicos. Logo, programas que estimulem a conscientização sobre a necessidade da realização de exames ginecológicos preventivos são sempre necessários. (BERNARD, 2010).

Já o homem vem se apresentando em sua maioria como um portador assintomático do vírus, desempenhando o papel de transmissores da patologia, necessitando também de serem alvos da educação preventiva. Logo, é importante que o parceiro sexual da paciente diagnosticada com HPV seja encaminhado para o exame clínico, laboratorial e acompanhamento médico a fim de contribuir no controle da patologia (DE LIMA CÂMARA, 2008).

A detecção pode ser averiguada a partir do exame citopatológico Papanicolau, colposcopia, vulvoscopia, peniscopia e anuscopia. Ao identificar a lesão realiza-se uma biópsia tecidual para análise e confirmação do HPV. Exames como o teste genético PCR (Reação em cadeia por polimerase) e o teste de captura híbrida podem trazer informações como o tipo e a carga viral, caracterizando seu nível oncogênico que contribua para uma melhor abordagem terapêutica (DE LIMA CÂMARA, 2008).

O tratamento da infecção tem como objetivo a cura clínica, uma vez que não há comprovação de erradicação definitiva do vírus, o que contribui para a ocorrência de recidivas. Os métodos são locais, visando a remoção de verrugas, condilomas e lesões do colo uterino, através de medidas cirúrgicas, quimioterápicas, cauterização, entre outros (DE LIMA CÂMARA, 2008).

A profilaxia contra alguns tipos de HPV é possível por meio de vacinas que utilizam “partículas vírus *like*” (VLP). Desenvolvidas por tecnologia molecular recombinante, a partir da proteína estrutural L1. Vários países aprovaram a comercialização destas vacinas, a qual é formulada em dois tipos: bivalente contra HPV-16 e 18 voltada à prevenção de verrugas genitais e quadrivalente contra o HPV-6, 11, 16 e 18 possibilitando também a prevenção de neoplasias cervicais (DE LIMA CÂMARA, 2008).

É fundamental que o monitoramento da infecção por HPV incorpore-se na rotina da gestão de saúde de modo a tornar-se instrumento essencial para o estabelecimento de ações preventivas no controle da infecção e de seus fatores de risco, o que engloba desde um monitoramento epidemiológico aprimorado até mesmo à maior compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção, possibilitando o desenvolvimento de um possível prognóstico que auxilie no determinante da conduta terapêutica.

## **OBJETIVOS**

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o perfil imunológico sistêmico frente à infecção por HPV, mediante a caracterização quantitativa da subpopulação linfocitária do sangue periférico em mulheres infectadas com o HPV, portadoras de lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau.

#### **3.2 Específicos**

- Caracterizar subpopulações de células T citotóxicas (CD8+) envolvidas com o estabelecimento da infecção por HPV, além de avaliar o potencial de diferentes marcadores imunológicos extracelulares (CD95L, CD95, PD-1) dessas células para o prognóstico do desenvolvimento ou controle da doença.
- Avaliar a expressão de grânulos intracelulares (granzima B) produzidas por células T citotóxicas (CD8+) como marcadores de susceptibilidade ao desenvolvimento ou controle da doença.
- Comparar o perfil celular dos pacientes observados com os indivíduos negativos para lesão intraepitelial e malignidade (NILM) não infectadas por HPV.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos**

Este projeto foi devidamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, sob CAAE: 56363316.0.0000.5183. Com isso, os voluntários envolvidos foram devidamente esclarecidos sobre o objetivo e importância do projeto de estudo assinando, assim, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

### **4.2 Amostras Clínicas**

Foram obtidas 7 amostras de sangue periférico de pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), 9 amostras de pacientes diagnosticados com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e 9 amostras de indivíduos saudáveis que atendessem aos critérios de seleção. Estas amostras comportavam cerca de 10mL de sangue e condicionadas em tubos vacutainer com heparina (anticoagulante), sendo obtidas no Centro Especializado do Diagnóstico do Câncer (CEDC) em João Pessoa e conduzidas para os procedimentos experimentais no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBIOTEC/UFPB).

Devido a minuciosidade deste estudo envolvendo análise imunológica em doenças infecciosas, por conveniência, tantos os pacientes como indivíduos saudáveis foram selecionados conforme os critérios a seguir: ser do sexo feminino, não tabagistas, pertencentes à faixa etária entre 18 a 45 anos, não gestantes, não estar submetidos a qualquer tipo de tratamento ginecológico e não portar demais tipos de doenças do sistema imunológico (imunodeficiências, doenças inflamatórias e auto-ímmunes).

Com isso, os pacientes envolvidos apresentaram diagnóstico positivo para HSIL e LSIL através do exame citológico, colposcopia e biópsia realizados pela equipe técnica do CEDC. Assim como os indivíduos saudáveis indicaram diagnóstico negativo para infecção por HPV a partir do exame citológico.

É importante ressaltar que a coleta sanguínea e os exames diagnósticos foram realizados no mesmo dia para maior evidência clínica e, assim, já conduzidas para os procedimentos experimentais.

### **4.3 Procedimentos e técnicas**

#### **4.3.1 Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos**

- I. Os Leucócitos foram obtidos através da lise de hemáceas (Solução de Lise, BD Bioscience, CA, USA).
- II. Para uma solução mais purificada os leucócitos foram lavados três vezes consecutivas com tampão fosfato salina (PBS), por meio de centrifugação (200 x g, 4 o C, 10 min).
- III. Desta maneira, os leucócitos obtidos foram suspendidos em um volume de 1 mL e conduzidos para ensaios biológicos.

#### **4.3.2 Marcação com anticorpos monoclonais com fluorescência**

- I. 25µL ( $2,5 \times 10^5$ ) da suspensão celular foram distribuídos em placa de 96 poços, juntamente com meio de manutenção RPMI e Brefeldina A (para os poços que receberam marcação intracelular).
- II. Para avaliação de imunofenotipagem, as células suspensas foram submetidas ao protocolo de marcação com anticorpos monoclonais extracelulares e intracelulares.
- III. Os anticorpos utilizados para a marcação de moléculas extracelulares foram: anti-CD8, anti-CD95, anti-CD95L e anti-PD1 (BD Pharmigen<sup>TM</sup> e Ebioscience).
- IV. Para marcação de moléculas intracelulares utilizou-se: anti-GRANZIMA B.
- V. Em seguida, as células marcadas foram transferidas para tubos apropriados para avaliação em citômetro de fluxo.

## **4.4 Análise dos dados**

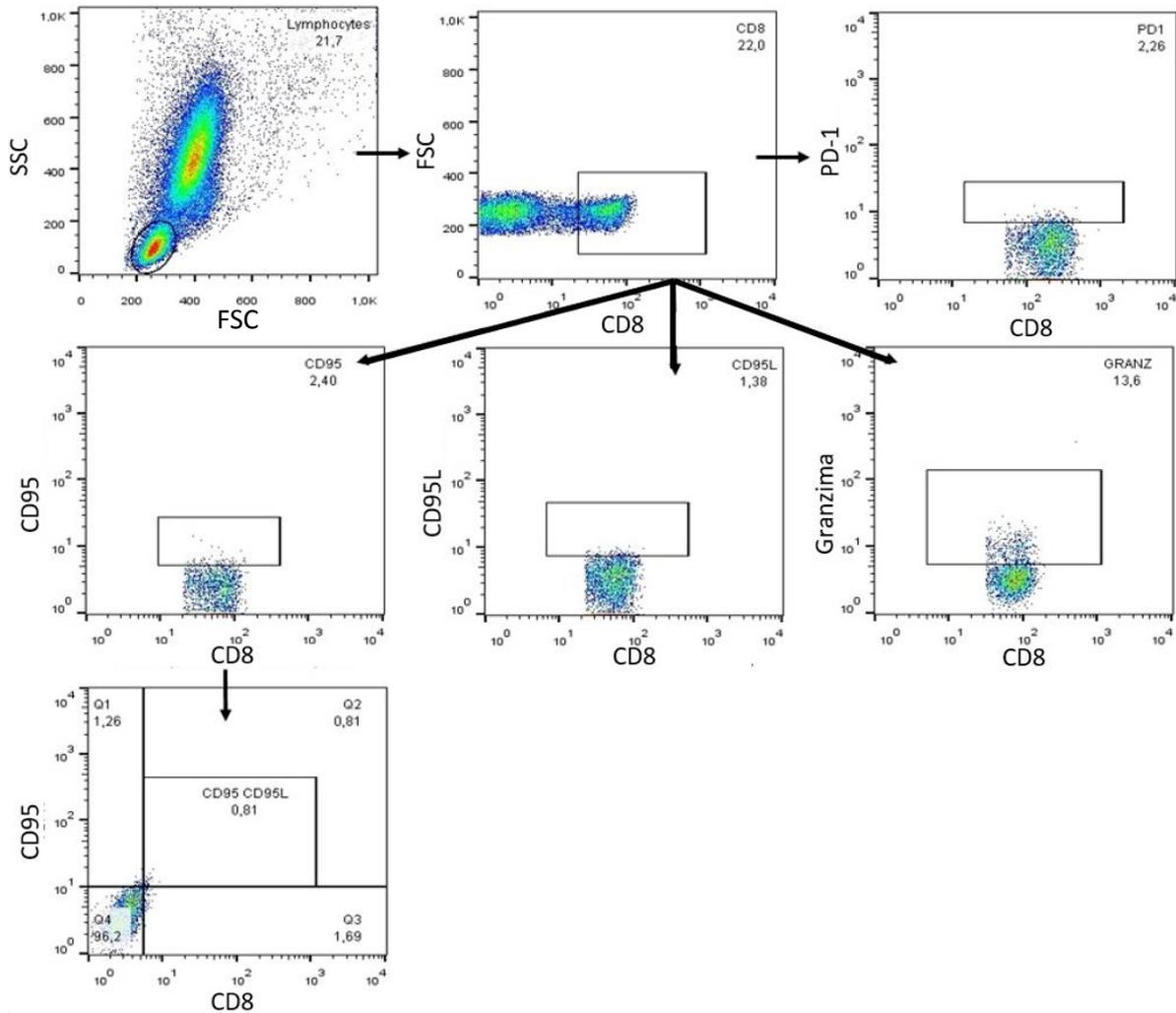
### **4.4.1 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo**

A leitura da solução celular marcada com anticorpos monoclonais com fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo FACSCANTOII (Becton & Dickinson). As aquisições dos dados foram baseadas em 50.000 eventos. Após isto, estes dados foram submetidos à análise utilizando o programa de computador Flow Jo (Tree Star, CA, USA) a fim de analisar a população celular de interesse.

### **4.4.2 Estratégia de análise**

No gráfico de tamanho por granulosidade (Figura 4) foi selecionado toda população de linfócitos de interesse. Dentro desta população identificou apenas os linfócitos T CD8+ seguida por aqueles que apresentavam marcação para CD95+, CD95L+, PD-1+ GRANZIMA B+ e que coexpressassem ambos os marcadores CD95+CD95L+. Esta estratégia foi realizada para todas as amostras sanguíneas, permitindo assim, a comparação estatística entre os pacientes e indivíduos saudáveis.

Figura 4 - Estratégia de análise.



Fonte: AUTOR, 2017.

#### 4.6.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5 (Versão 5.03, Dezembro 10, 2009). Para análise comparativa entre os diferentes grupos foram utilizados o teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0.05$ .

---

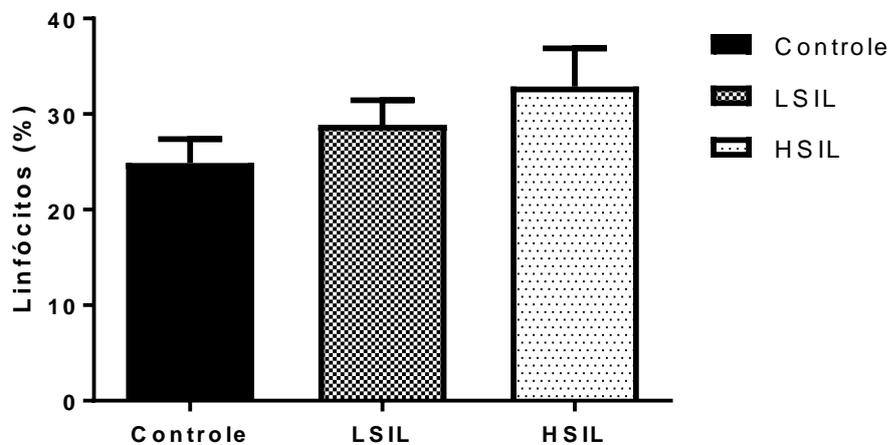
**RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise da frequência de linfócitos gerais

A figura 5 mostra a análise comparativa da frequência de linfócitos totais em relação aos demais leucócitos nos três grupos: de indivíduos controles, pacientes LSIL e pacientes HSIL. Estatisticamente, não foi observado diferença significativa entre os grupos.

Figura 5 - Frequência de linfócitos em relação aos demais leucócitos em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), e de indivíduos saudáveis (controle).

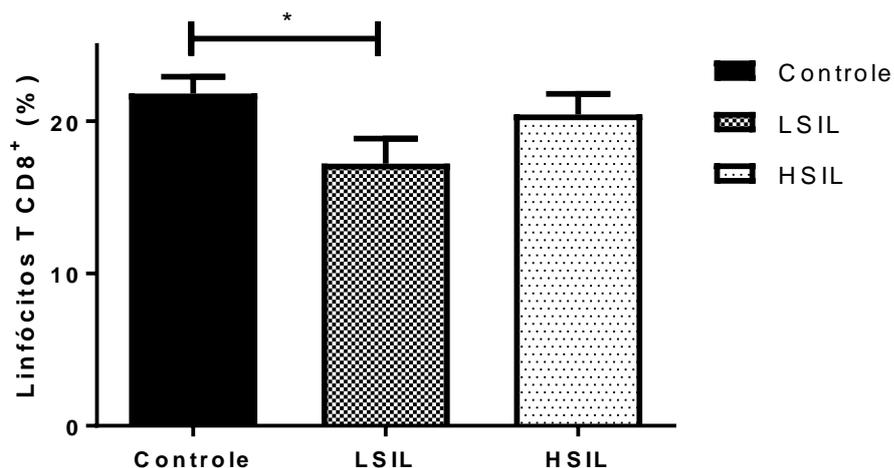


Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

## 5.2 Análise da frequência de linfócitos T citotóxicos (CD8+)

Quanto a frequência dos linfócitos T CD8+, foi demonstrado, estatisticamente, uma redução desta população celular em pacientes LSIL em relação ao grupo controle, enquanto que, em pacientes HSIL a frequência permaneceu similar à do grupo controle, sem diferença estatística (Figura 6).

Figura 6 - Frequência de linfócitos T CD8+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle).

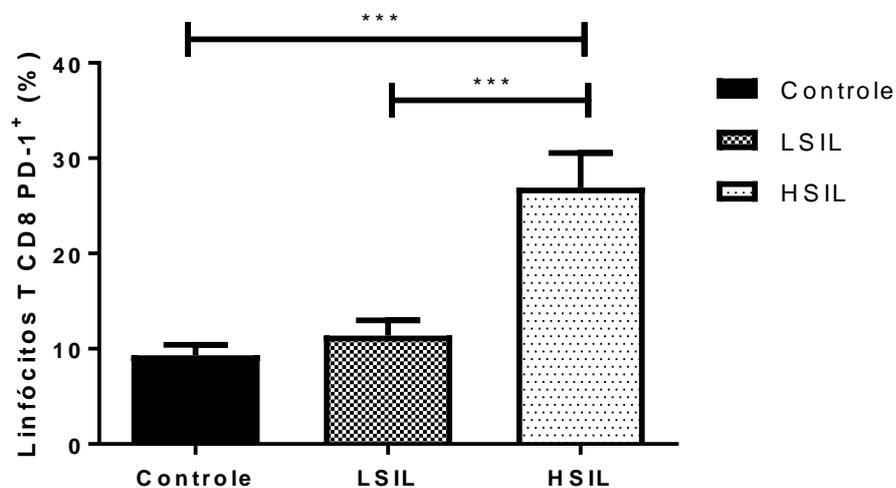


Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

### 5.3 Análise da frequência de linfócitos T CD8+ expressando PD-1+

Outro marcador extracelular analisado foi a expressão da molécula PD-1 em linfócitos T CD8+ (Figura 7) de pacientes HSIL, LSIL e indivíduos saudáveis (controle). Foi observado que no grupo de pacientes HSIL, portadores do estado mais grave da doença, houve um aumento significativo da expressão deste marcador ( $p < 0,05$ ), tanto em relação ao grupo controle como em relação ao grupo de pacientes LSIL. Quanto aos pacientes LSIL, portadores de uma infecção mais branda, não foi demonstrado diferença estatística significativa.

Figura 7 - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando PD-1+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle).

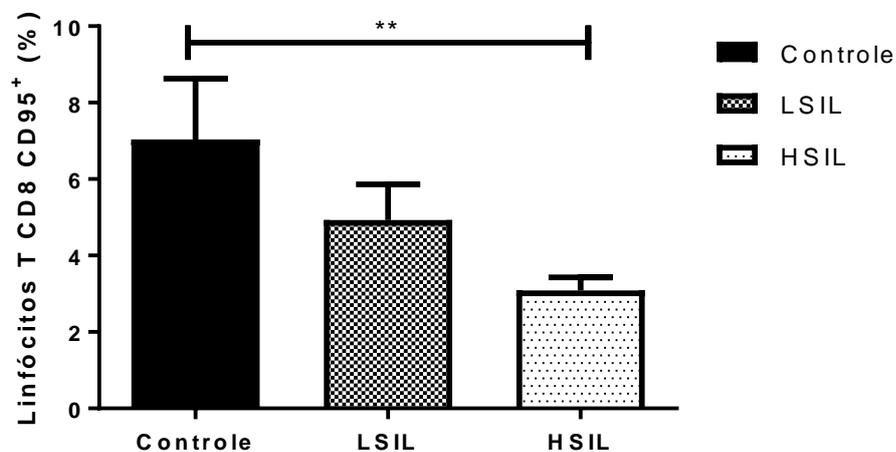


Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

#### 5.4 Análise da frequência dos marcadores CD95+, CD95L+ e sua co-expressão em células T CD8+

Após a identificação da população de células T CD8+, avaliamos a expressão das moléculas CD95 e CD95L nos grupos de pacientes LSIL e HSIL, e de indivíduos saudáveis (controle). A figura 8 evidencia uma redução estatística da expressão de CD95 em linfócitos T CD8+ no grupo de pacientes HSIL ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle, o que não foi observado no grupo de pacientes LSIL.

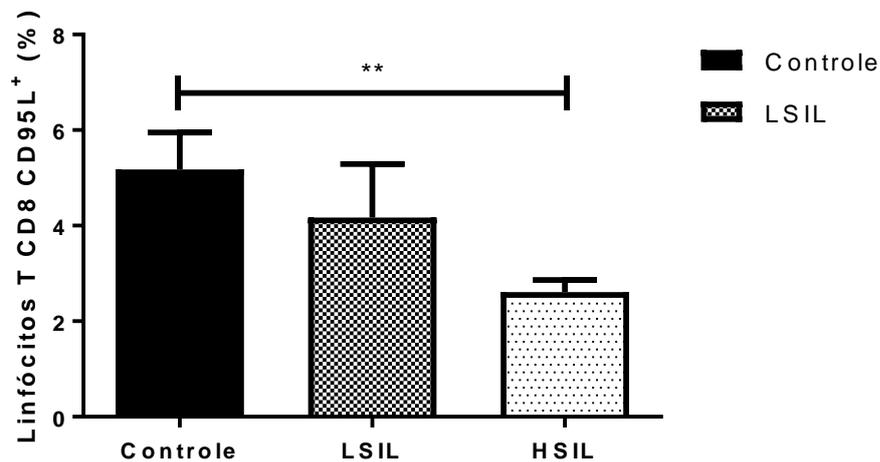
Figura 8 - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD95+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle).



Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

O mesmo padrão na frequência de expressão de CD95 foi observado para o marcador CD95L (Figura 9). Pacientes HSIL apontaram redução significativa com  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, enquanto pacientes LSIL apresentaram uma frequência intermediária, não estatisticamente significativa, em relação ao grupo controle e HSIL.

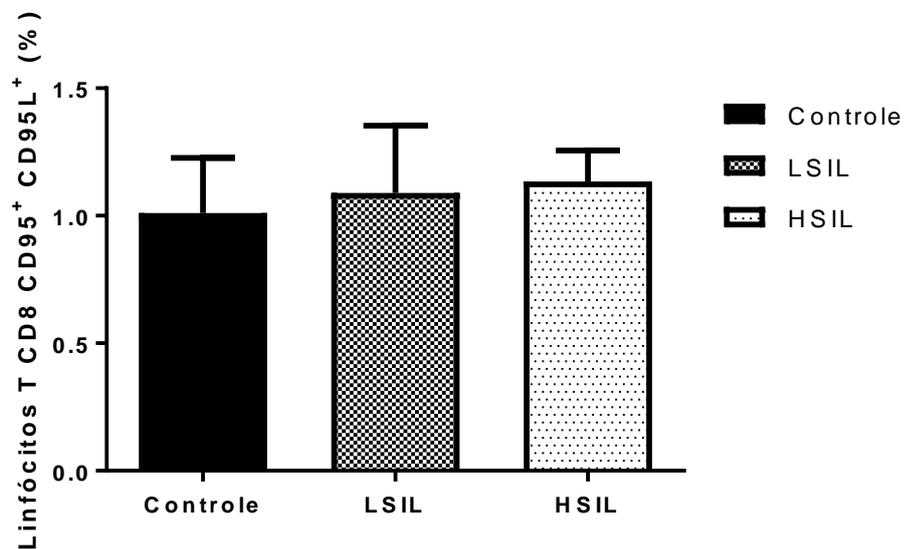
Figura 9 - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD95L+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle).



Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

Ao analisarmos a frequência na coexpressão das moléculas CD95+ e CD95L+ nas células T CD8+ de pacientes com LSIL e HSIL em comparação ao grupo controle, notamos que não houve significância estatística para nenhum grupo (Figura 10).

Figura 10 - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD95+CD95L+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle).

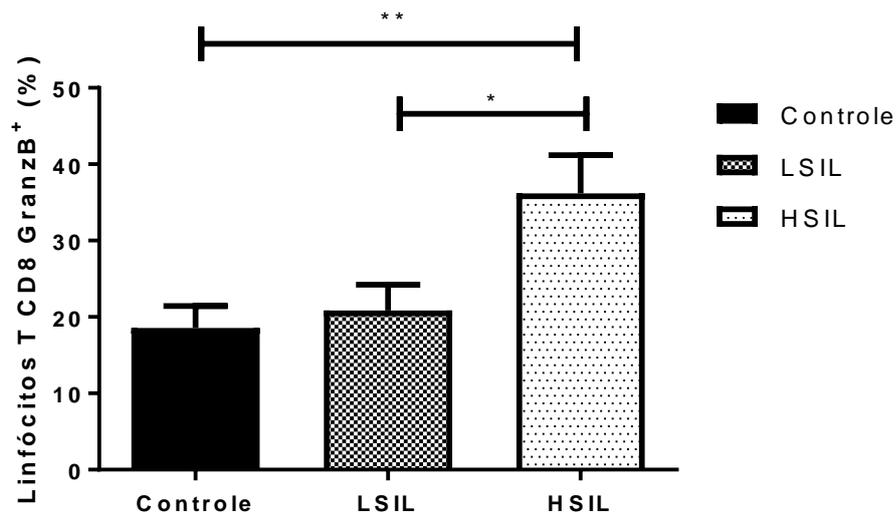


Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

### 5.5 Análise da frequência de linfócitos T CD8+ expressando Granzima B+

A figura 11 demonstra uma análise comparativa da expressão de Granzima B em linfócitos T CD8+ de pacientes LSIL e HSIL. É possível verificar um aumento significativo deste marcador em pacientes HSIL, tanto em relação ao controle como em relação aos pacientes LSIL, cujo  $p < 0,05$ . Quanto aos pacientes LSIL, não foi observado alteração significativa na expressão desse marcador.

Figura 11 - Frequência de linfócitos T CD8+ expressando Granzima B+ em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e de indivíduos saudáveis (controle).



Fonte: Autor, 2017. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*) entre os grupos comparados.

## **DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

Como elucidado anteriormente, os papilomavírus induzem alterações morfológicas nas células epiteliais durante o curso da infecção, o que pode resultar em lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) dependendo do tipo de HPV. Diante disso, mecanismos imunológicos demonstram fatores fundamentais para a regressão ou progressão da lesão. Portanto, o baixo clearance viral aponta ser um grande impasse no controle da infecção pelo sistema imunológico (KLOTH, et al., 2008).

Isto ocorre devido à, principalmente, três fatores de evasão viral: 1) codificação de proteínas virais e replicação apenas iniciadas após a célula entrar em diferenciação, evitando sua apresentação precoce à demais células imunológicas; 2) o DNA viral é empacotado em capsídeos virais e liberado através da superfície da célula epitelial sem provocar a lise desta reduzindo a tendência ao processo inflamatório; 3) permanecem por pouco tempo no ambiente extracelular após sua saída da célula infectada, reduzindo sua exposição ao sistema imunológico (KLOTH, et al., 2008; SNIJDERS, et al., 2010).

A relação destes fatores com a ativação e recrutamento de células imunes tem sido frequentemente abordado em estudos científicos. Diante disso, o presente trabalho iniciou a primeira análise voltada à frequência sistêmica dos linfócitos totais e dos linfócitos T CD8+ em pacientes portadores do estágio LSIL e HSIL.

Quanto aos linfócitos totais, não houve alterações em sua frequência tanto em pacientes LSIL quanto em HSIL (Figura 5). Em vista disso, foi observado, em um estudo de Hernández-Montes (2012), uma baixa produção de interleucina-2 (IL-2) por parte de linfócitos no sangue periférico de pacientes infectados com HPV, o que pode indicar uma atividade proliferativa pouco frequente por estas células nestes pacientes, à nível sistêmico.

Ao analisar os linfócitos T CD8+ (Figura 6), observou-se uma redução significativa na frequência desta população em relação às pacientes LSIL, enquanto que, pacientes HSIL apresentaram frequência similar ao dos indivíduos saudáveis.

Edwards et al. (1995) ao analisarem amostras teciduais de lesões por HPV demonstraram um aumento de células T CD8+ nos pacientes LSIL em relação aos indivíduos saudáveis. Desta forma, pode ser sugerido que a diminuição da

frequência destas células no sangue periférico esteja relacionada com sua migração para o sítio da lesão, uma vez que encontra-se em estágios iniciais da infecção.

É observado que no início da infecção há maior frequência das células NK, em relação às células T CD4+ e T CD8+, no sítio da lesão. As células NK estão envolvidas no recrutamento e diferenciação de células T CD8+ (KOS E ENGLEMAN, 1996), favorecendo a migração das células T CD8+ do sangue periférico para o sítio infectado durante o início da infecção (LSIL). Desta forma, é possível sugerir que a migração de células T CD8+ esteja envolvida como controle inicial da doença.

Esta relação também foi observada em lesões cutâneas por *Leishmania braziliensis*, identificando o recrutamento dos linfócitos T CD8+ do sangue periférico para o sítio da infecção durante os estágios iniciais da lesão (DE MOURA, et al., 2005).

Em diversas patologias, pesquisadores associam a persistência viral e progressão da infecção com possíveis alterações no perfil de linfócitos T CD8+. Um trabalho envolvendo ratos infectados com LCMV (vírus da coriomeningite linfocítica) demonstraram um aumento na expressão de PD-1 em células T CD8+ durante a infecção crônica, considerando tal perfil como exaustão e perda da função efetora destas células, o que contribui para a progressão da infecção (KALIA, et al., 2010).

Como se sabe, a interação do PD-1 com PD-1L induz um sinal co-inibidor nas células T ativadas promovendo-as à uma exaustão funcional (KALIA, et al., 2010). Em pacientes infectados com HPV também foi demonstrado um aumento na expressão desses marcadores em linfócitos T CD3+ (WEN, et al., 2013). Ao analisar as células T CD8+, nosso estudo demonstrou aumento na expressão desse marcador em pacientes HSIL (Figura 7), sugerindo que a persistência viral e progressão da lesão em HSIL pode estar atrelada com um quadro de anergia pelas células TCD8+.

É visto que a célula exausta possui redução na produção de determinadas citocinas em decorrência da modulação na via de sinalização de reconhecimento antigênico por TCR-MHC1 (KALIA, et al., 2010). Um estudo de Lee et al. (2004) demonstrou uma redução na produção de IL-2 por linfócitos T CD8+ a medida que a infecção progride para HSIL, o que pode estar atrelado com o perfil anérgico destas células.

Nossos estudos também demonstraram uma redução na expressão de CD95 e de CD95L em pacientes HSIL (Figura 8 e 9, respectivamente). Como supracitado,

as moléculas CD95 (FAS) e CD95L (FASL) pleiteiam um importante papel citotóxico induzindo apoptose das células infectadas.

A análise destas moléculas em células T CD8+ de pacientes com HPV ainda tem sido pouco elucidado na literatura científica. Sendo assim, nossos dados podem sugerir que a redução da expressão destas moléculas em células T CD8+, à nível sistêmico, podem estar atreladas com a progressão da infecção em HSIL, uma vez que a via de apoptose pela interação destas moléculas pode estar comprometida. Porém, este perfil também pode ser considerado como um mecanismo de modulação da própria célula T CD8+ em vista de outras funcionalidades das moléculas CD95 e CD95L, o que ainda encontra-se pouco elucidado em doenças neoplásicas.

A via apoptótica induzida pelas moléculas CD95 e CD95L pode ocorrer tanto no controle de células infectadas como em células imunológicas, o que inclui a própria célula T CD8+. Assim, é hipotetizado que um possível aumento na coexpressão de ambas as moléculas em uma mesma célula poderia ser considerado um indicativo de auto-apoptose (ABBAS, et al., 2012). Portanto, ao analisarmos sua co-expressão nas células T CD8+ periféricas de pacientes LSIL e HSIL, não foi notado significância estatística (Figura 10). Pressupõe-se, então, que a teoria de auto-apoptose pelas células T CD8+ através da via CD95 e CD95L pode não ocorrer em pacientes com LSIL e HSIL.

Analizamos também a imuno-expressão da serino protease granzima B nas células T CD8+ em pacientes LSIL e HSIL, uma vez que estas proteínas também estão envolvidas no desencadeamento de via apoptótica nas células infectadas.

Em contrapartida aos nossos achados relacionados à CD95 e CD95L, foi identificado um aumento significativo na expressão de granzima B pelas células T CD8+ em pacientes HSIL (Figura 11). Desta forma, é possível observar que a elevada produção de granzima B pelas células T CD8+ podem indicar um mecanismo efetor frente à progressão da lesão.

Dessa forma, esse estudo demonstra de forma inédita a avaliação de células T CD8+ em pacientes HSIL e LSIL em comparação a indivíduos saudáveis, contribuindo para a compreensão dos mecanismos citotóxicos dessa célula em diversos graus da doença a nível sistêmico. Os resultados deste estudo podem contribuir para a elucidação do perfil imunológico dos pacientes infectados com o

HPV, favorecendo o entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão das lesões na doença.

**CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÕES

- Não foi demonstrado alterações na frequência de linfócitos totais em ambos estados da infecção, LSIL e HSIL.
- Foi identificado baixa frequência de linfócitos T CD8+ em pacientes LSIL, provavelmente relacionado à possível migração dessas células para o local da lesão afim de contribuir no controle da infecção.
- O mecanismo citotóxico através da produção de granzima B pelas células T CD8+ em pacientes HSIL apresentou aumentado, indicando um mecanismo de controle frente ao estado de progressão da infecção.
- A expressão das moléculas CD95 e CD95L em células T CD8+ apresentaram-se reduzidas em pacientes HSIL, sugerindo que a atividade apoptótica por meio desta via pode estar comprometida, o que favorece a evasão viral e a progressão da lesão nesses pacientes.
- Células T CD8+ dos pacientes HSIL demonstraram aumento na expressão da molécula PD-1, permitindo considerar um estado de exaustão neste tipo celular atrelado à progressão da lesão.

---

## REFERÊNCIAS

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A., LICHTMAN, H.A., PILL, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7. ed., 2012.

ALMEIDA, J. D.; ORIEL, J. D.; STANNARD, L. Characterisation of virus found in genital warts. **Microbios**, Cambridge, v. 3, p.225,1969.

ALVES, Daniella Borges et al. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. 2010.

BERNARD, H.U.; CHAN, S.Y.; MANOS, M.M.; ONG, C.K.; VILLA, L.L.; DELVIS, H.; PEYTON, C.L.; BAUER, H.M.; WHEELER, C.M. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. **Journal of Infectious Diseases**, 170:1077-85, 1994.

BERNARD, HANS-ULRICH, ROBERT D. BURK, ZIGUI CHEN, KOENRAAD VAN DOORSLAER, HARALD ZUR HAUSEN, and ETHEL-MICHELE DE VILLIERS. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, v. 25; p. 401(1): 70–79, 2010.

BERNARD, HANS-ULRICH. Genome diversity and evolution of papillomaviruses. Origin and evolution of viruses, 2nd ed. **Academic Press**, London, England, p. 417-429, 2008.

BERTI, FERNANDA COSTA BRANDÃO et al. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2017.

BLACK A.P.B., M.R. ARDERN-JONES, V. KASPROWICZ, P BOWNESS, L. JOVES, A.S. BAILEY, G.S. OGG. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4 + and CD8 + T cells, **European journal of immunology**, v.37. p.1485–1493, 2007.

BRASIL, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde – 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>, Acesso: 05 de outubro de 2017.

BURK, R.D. **Human papillomavirus and the risk of cancer**. Hosp.Pract. v.34, n.11, 1999. Disponível em: <<http://www.hosprract.com/issues/1999/11/burk.htm>>. Acesso em 07 julho de 2017.

CALDAS, H., JAYNES, F.O., BOYER, M.W., HAMMOND, S., ALTURA, R.A. Survivin and Granzyme-B – induced apoptosis, a novel anticancer therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.5, n. 3, p. 693-703, 2006.

COSTA, FERNANDO AUGUSTO MIRANDA DA. Resposta imune *in vitro* aos antígenos de Papilomavírus Humano (HPV) em homens na cidade de São Paulo, Brasil. / Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. São Paulo, 2013.

DE LIMA CAMARA, GENI NN et al. Os papilomavírus humanos–HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico-doi: 10.5102/ucs.v1i1.502. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149-158, 2008.

DE MOURA, TATIANA R., et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

DUNN, A. E. G.; OGILVE, M. M. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 22, n. 3, p. 282-295, Feb 1968.

EDWARDS R.P., KUYKENDALL K., CROWLEY-NOWICK P., PATRIDGE E.E., SHINGLENTON J., MESTECKY J. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia: CD8-positive cells are recruited to invasion. **Cancer**. 76:1411-1415, 1995.

ENGEL, C. L.; NICOLICH M. **Ginecologia**. Vol 6. Editora Medwriters, 2008.  
EVANDER, M.; FRAZER, I.H.; PAYNE, E.; MEY, Q.Y.; HEMGEST K.;

MCMILLAN, N.A.J. Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **Journal Virology**. 71: 149-56, 1997.

FACINA, TAÍS. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira Cancerologia**, v. 60, n. 1, 2014.

FELLER L., WOOD N. KHAMMISSA R., CHIKTE U., MEYEROV R., LEMMER J. HPV modulation of host immune responses, **Journal of the South African Dental Association (SADJ)**, v.65. p.266–268, 2010.

GISSMANN, L.; PFISTER, H; ZÜR HAUSEN, H. Papillomaviruses. characterisation of four different isolates. **Virology**, New York, v. 76, p. 569, 1977.

HERNÁNDEZ-MONTES, Jorge et al. Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8+ IFN $\gamma$ + T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate. **Infectious agents and cancer**, v. 7, n. 1, p. 12, 2012.

JAVE-SUÁREZ, L. F., RATKOVICH-GONZÁLEZ, S., OLIMÓN-ANDALÓN, V., AGUILAR-LEMARROYA, A. Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma

humano. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, 53, Supl 2, p. 200-5, 2015.

KALIA, VANDANA; SARKAR, SROJIT; AHMED, RAFI. CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections. In: **Memory T Cells**. Springer New York, p. 79-9, 2010.

KLOTH, J. N., GORTER, A., TER HAAR, N., CORVER, W.E., JORDANOVA, E. S. KENTER, G. G., FLEUREN, G. J. Lack of TNF-alpha mRNA expression in cervical câncer is not associated with loss of heterozygosity at 6p21.3, inactivating mutations or promoter methylation. **Molecular Immunology**, v.45, n.1, p. 152-9. Jan, 2008.

KOS, FERDYNAND J.; ENGLEMAN, EDGAR G. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. **Immunology today**, v. 17, n. 4, p. 174-176, 1996.

KUMARASWAMY, K. L., VIDHYA, M. Human papilloma virus and oral infections: An update. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.7, n.2, p. 120-7. Apr-Jun, 2011.

LEE, Bang-Ning et al. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 2, p. 239-244, 2004.

LORENZON, L., FERRI, M., PILOZZI, E., TORRISI, M. R., ZIPARO, V., FRENCH, D. Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature. **International Journal Colorectal Disease**, v.26, n.2, p. 135-42. Feb, 2011.

NO, J. H., KIM, M. K., JEON, Y. T., KIM, Y. B., SONG, Y. S. Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention. **Molecular Carcinogenesis**, v.50, n.4, p. 244-53. Apr, 2010.

ONON, TOLI S. History of human papillomavirus, warts and cancer: What do we know today?. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. V. 25, p. 565–574, 2011.

ORIEL, J. D. Historical Overview. In: GROSS, G.; VON KROGH, G. Human Papillomavirus Infection in dermato venereology. New York : C.R.C. p. 7-11, 1997.

ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **British Journal of Venereal Diseases**, London, v. 47, n. 1, p. 1-13, Feb. 1971.

PETER, M.E., BARNHART, B.C., ALGECIAS-SCHIMNICH, A. The Cytokine Handbook: CD95L/FasL and its receptor CD95 (APO-1/Fas). **Cytokine Handbook**, v.2, p. 885–911, 2003.

PETER, M.E., HADJI, A., MURMANN, A.E., BROCKWAY, S., PUTZBACH, W., PATTANAYAK, A., CEPPI, P. The role of CD95 and CD95 ligand in câncer. **Cell Death and Differentiation**. v.22, p. 549–559. February, 2015.

PINTO, DENISE DA SILVA et al. Epidemiologia da infecção genital pelo Papilomavírus humano (HPV) em população urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. 2010.

RAUTAVA, J., SYRJANEN, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **Journal of the American Dental Association**, v.142, n.8, p. 905-14, Aug, 2011.

SCHIFFMAN, M., CASTLE, P. E., JERONIMO, J., RODRIQUEZ, A. C., WACHOLDER, S. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical câncer. **The Lancet**, v.370, n. 9590, p.890-907. Sep, 2007.

SHAFER-WEAVER, K., ROSENBERG, S., STROBL, S., GREGORY, A.W., BASELER, M., MALYGUINE, A. Application of granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials. **Journal of Immunotherapy**, v.29, n.3, p. 28-335, 2006.

SILVA, R. J., CASSEB J., ANDREOLI M. A. e VILLA L. L., Persistence and clearance of HPV from the pênis of men infected and non-infected with HIV. **Journal of Medical Virology**, v.83, n.1, p.127-31. Jan, 2011.

SNIJDERS, P. J., HEIDEMAN, D. A., MEIJER, C. J. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et immunologica**, v.118, n.6-7, p.520-8. Jun, 2010.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v.24 Suppl 1, p. 16-22. Mar, 2006.

TORRES-POVEDA K., BAHENA-ROMÁN M, GONZÁLEZ-MADRID C, BURGUETE-GARCIA A.I., BERMÚDEZ-MORALES V.H., PERALTA-ZARAGOZA O., MADRID-MARINA V. Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia, **World Journal of Clinical Oncology** V.5, p. 53–763, 2014.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRONGLE, C.R., VORSTERS, A., MICALESSI I., BILCKE, J., IEVEN, M., BOGERS, J., DAMME, P.V. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. Aug 5, 2011.

VILLA, L. L. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavírus. In: BIBBO, M.; SILVA FILHO, A. M. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: **Revinter**. P. 51–58, 1998.

WOO, Y. L. et al. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 115, n. 13, p. 1616-1622, 2008.

WEN, YANG et al. Increased expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia. **Immunology**, v. 139, n. 4, p. 513-522, 2013.