

Naiura Vieira Pereira

Estudo de células dendríticas, expressão das citocinas
TNF-alfa, IFN-gama e IL-10 e da molécula de adesão
E-caderina em lesões vulvares induzidas pelo
papilomavírus humano

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia
Orientadora: Dra. Carla Pagliari

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus pais e à minha irmã.

À todas as pacientes envolvidas no estudo.

“Cada um tem de mim exatamente o que cativou, e cada um é responsável pelo que cativou, não suporto falsidade e mentira, a verdade pode machucar, mas é sempre mais digna. Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.”

Charles Chaplin

Ao final desta jornada, gostaria de agradecer:

À Dr^a Carla Pagliari, minha orientadora, por sua participação e auxílio ao longo de toda a caminhada, mostrando-se sempre disponível, paciente e incentivadora. Agradeço também, a amizade e carinho dedicados e os momentos de alegria compartilhados.

À Prof^a Dr^a Maria Irma Seixas Duarte, por abrir as portas do seu laboratório para que esse trabalho pudesse ser realizado, por suas contribuições e agradável convivência.

À Prof^a Dr^a Mirian Nacagami Sotto, exemplo de profissionalismo e de pessoa que busca o crescimento daqueles que a rodeiam, agradeço o incentivo para o ingresso na pós-graduação, por suas incontáveis e imensuráveis contribuições neste trabalho, além da companhia prazerosa em diversos momentos.

À Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Penteado Lancellotti pelo grande auxílio no levantamento das biópsias, sua disponibilidade e momentos de aprendizado, sejam eles relacionados ao trabalho ou não.

À Profª Drª Roosecelis Araújo Brasil pela disponibilidade, auxílio na análise histopatológica e amizade durante esses anos.

Ao Dr Julio Croda por sua colaboração com as análises estatísticas e sua amizade.

Às técnicas do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão da Clínica Dermatológica, Maria Cristina Galhardo, Jaqueline Maria Cruz Aragão e Ivete Isabel Torres pelo auxílio com os procedimentos histológicos.

À Ana Maria Gonçalves da Silva, funcionária do Laboratório de Imunopatologia do ITMSP, por sua disponibilidade e preciosa ajuda em diversos momentos durante a realização deste trabalho.

Ao biólogo Cleiton Alves pelo auxílio na padronização das reação para detecção de E-caderina.

À Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia, AFIP, pela disponibilização das biópsias.

Ao Rochetô Côrrea Gomes, funcionário da AFIP, pelo grande auxílio no processamento dos cortes histológicos.

Às funcionárias da AFIP Fernanda e Cristiane pelo auxílio no levantamento das biópsias.

Ao Laboratório Fleury por permitir a utilização das biópsias.

*À Zélia Andrade, funcionária do Laboratório Fleury, pela disponibilidade e valorosa ajuda na padronização do protocolo do método de hibridização *in situ*.*

Ao Prof Dr Dewton Vasconcelos e à Dr^a Lana Maria Aguiar por suas contribuições no exame de qualificação.

À Sr^a Eli Maria de Freitas Ferreira pelo auxílio em vários momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

Às amigas Elaine Raniero Fernandes e Fernanda Guedes Luiz, colegas de pós-graduação, pela disponibilidade e pelo auxílio prestado durante o desenvolvimento do trabalho. Também sou muito grata por sua amizade que se mostrou

presente tanto nos momentos difíceis como nos momentos de alegria.

Aos amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, Moníca Rebeca Kauffman, Cleusa Takakura, Rosana Cardoso, Wellington Dantas, Luciane Kanashiro, Amaro Duarte e Iríneu Massaia pelo carinho, amizade dedicada, e os momentos alegres a mim proporcionados.

À pós-graduanda Flávia Afonso Lima, por sua amizade, carinho e disponibilidade para revisão da dissertação.

Aos colegas de pós-graduação pela troca de conhecimentos e aos novos amigos por enriquecerem a minha vida.

Aos meus amigos, essenciais na minha vida, agradeço o ombro emprestado nos momentos difíceis e por me fazerem uma pessoa mais feliz.

Ao meu pai Cláudio, meu melhor amigo, exemplo de ser humano equilibrado e doce, por ser um ótimo ouvinte nos momentos de desabafo e ser um grande incentivador. Obrigada por me amar do jeito que sou! Te amo Papaizinho!

*À minha mãe **Joce**, mulher de fibra, por sempre ter me incentivado a lutar pelos meus sonhos e pelo amor a mim dedicado. Te amo Mãe!*

*À minha irmã **Naíma**, amiga e companheira de todas as horas, sem a qual talvez não tivesse chegado até aqui. Agradeço pelo amor e apoio incondicional. Te amo Mana!*

Aos demais familiares que participaram de alguma maneira deste sonho.

A Deus por ter me dado as oportunidades que me permitiram chegar até este momento e por ter colocado tantas pessoas incríveis na minha vida, sem as quais nada disso valeria a pena.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertação, teses e monografias. Elaborados por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ªed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	07
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	09
3.1. Histórico.....	10
3.2. Epidemiologia.....	11
3.3. Etiologia da infecção.....	15
3.3.1. O papilomavírus humano.....	15
3.3.1.1. Estrutura do vírus.....	15
3.3.1.2. Classificação do vírus.....	18
3.3.1.3. HPV relacionados às lesões benignas e neoplasias.....	19
3.4. Patogênese da infecção.....	20
3.5. Características histológicas e classificação das lesões.....	21
3.6. Sistema imune da pele.....	24
3.6.1. Células do sistema imune da pele.....	24
3.6.1.1. Células de Langerhans.....	24
3.6.1.2. Células S100 positivas.....	25
3.6.1.3. Dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos.....	26
3.6.2. Citocinas.....	28
3.6.2.1. Fator de necrose tumoral alfa.....	29
3.6.2.2. Interferon-gama.....	30

3.6.2.3. Interleucina-10.....	30
3.7. E-caderina.....	31
3.8. A resposta imune.....	32
3.9. Métodos diagnósticos.....	34
3.10. Tratamento.....	35
3.11. Vacinas.....	37
4. MÉTODOS.....	39
4.1. Casuística.....	40
4.2. Métodos.....	41
4.2.1. Reação imuno-histoquímica.....	41
4.2.2. Dupla-marcação.....	43
4.3. Análise quantitativa.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Análise histopatológica.....	49
5.2. Método imuno-histoquímico.....	51
5.2.1. Expressão e quantificação de células dendríticas.....	51
5.2.2. Expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10.....	57
5.2.3. Expressão de E-caderina.....	61
5.3. Dupla-marcação.....	63
6. DISCUSSÃO.....	64
Células dendríticas.....	67
Expressão de citocinas.....	71
Expressão de E-caderina.....	74
7. CONCLUSÕES.....	77
8. ANEXOS.....	80
9. REFERÊNCIAS.....	85

Lista de Abreviaturas

- CAPPesp** Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CDC** *Center for Disease Control and Prevention*
- CL** Células de Langerhans
- DDFXIIIa+** Dendrócito dérmico Fator XIIIa positivo
- DNA** Ácido desoxirribonucléico
- E** Região inicial do genoma do HPV
- FDA** *Food and Drug Administration*
- HIV** Vírus da imunodeficiência humana
- HLA** Antígeno leucocitário humano
- HPV** Papilomavírus humano
- IARC** *International Agency for Research on Cancer*
- ICAM-1** *Intercellular adhesion molecule -1*
- IFN- γ** Interferon gama
- IL-1** Interleucina 1
- IL-2** Interleucina 2
- IL-4** Interleucina 4
- IL-5** Interleucina 5
- IL-6** Interleucina 6
- IL-7** Interleucina 7
- IL-8** Interleucina 8
- IL-10** Interleucina 10

- ISSVD** *International Society for the Study of Vulvovaginal Diseases*
- L** Região final ou tardia do genoma do HPV
- MCP-1** *Monocyte chemotactic protein-1*
- MHC** Complexo principal de histocompatibilidade
- MIP3 α** *Macrophage inflammatory protein alpha*
- NIC** Neoplasia intraepitelial cervical
- NIV** Neoplasia intraepitelial vulvar
- PCR** *Polymerase Chain reaction*
- PV** Papilomavírus
- RANTES** *Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*
- TGF- β** Fator de crescimento tumoral beta
- Th1** linfócitos T auxiliares do tipo 1
- Th2** linfócitos T auxiliares do tipo 2
- TNF- α** Fator de necrose tumoral alfa
- VLP** *Virus-like particles*
- WHO** *World Health Organization*

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema da organização do genoma do HPV-16.....	17
Figura 2	Aspecto histológico de lesões de vulva induzidas pelo HPV.....	50
Figura 3	Células de Langerhans (CD1a+) no epitélio de lesões vulvares induzidas pelo HPV.....	52
Figura 4	Células S-100+ no estroma de lesões vulvares induzidas pelo HPV e pele normal.....	54
Figura 5	Dendrócitos dérmicos FXIIIa+ no estroma de lesões vulvares induzidas pelo HPV e pele normal.....	55
Figura 6	Imuno-marcações mostrando expressão de citocinas em lesões vulvares induzidas pelo HPV.....	60
Figura 7	Imuno-marcações mostrando a expressão de E-caderina no epitélio de lesões vulvares induzidas pelo HPV e vulvites crônicas inespecíficas.....	62
Figura 8	Lesão vulvar com HPV. Co-localização do DNA viral no citoplasma dos DDFXIIIa+.....	63

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** Quantificação de células de Langerhans (CD1a+) em lesões de baixo e alto grau induzidas pelo HPV e na pele normal..... 53
- Gráfico 2** Quantificação de células S-100+ e DDFXIIIa+ em lesões de baixo e alto grau induzidas pelo HPV e na pele normal..... 56
- Gráfico 3** Quantificação da expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em lesões de baixo e alto grau induzidas pelo HPV..... 59

Lista de Tabelas

Tabela 1	Número de cânceres atribuídos à infecção por HPV, 2002: países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	13
Tabela 2	Dados referentes aos anticorpos utilizados: código, fabricante e diluição.....	41
Tabela 3	Dados referentes à análise estatística das contagens de células CD1a+, S-100+ e FXIIa+.....	57
Tabela 4	Dados referentes à análise estatística das contagens de células expressando as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10.....	58
Tabela 5	Correlação entre os DDFXIIIa+ e a citocina TNF- α em lesões vulvares de baixo e alto grau induzidas pelo HPV.....	61

Pereira NV. Estudo de células dendríticas, expressão das citocinas TNF-alfa, IFN-gama e IL-10 e da molécula de adesão E-caderina em lesões vulvares induzidas pelo papilomavírus humano [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 118p.

INTRODUÇÃO: O papilomavírus humano (HPV) é o agente mais frequentemente encontrado em doenças sexualmente transmissíveis e é responsável por cerca de 40% dos cânceres vulvo-vaginais. Esse trabalho abordou a resposta imune em lesões vulvares, considerando-se as células dendríticas CD1a+, FXIIIa+ e S-100+, citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 e a molécula de adesão E-caderina. **MÉTODOS:** Foram utilizadas 49 lesões de vulva pelo HPV (condiloma acuminado, NIV-I, NIV-II e NIV-III) e 11 biópsias com diagnóstico de vulvite crônica inespecífica. Foram constituídos quatro grupos: lesões de baixo grau (condiloma e NIV I), lesões de alto grau (NIV II e III), vulvites inespecíficas e pele normal. A detecção das células, citocinas e E-caderina foi feita através de método imuno-histoquímico. **RESULTADOS:** As células de Langerhans (CD1a+) estavam distribuídas em todo o epitélio, sobretudo nas camadas suprabasal e espinhosa. Não diferiram entre os grupos de lesões HPV+, mas estavam diminuídas em número e tamanho quando comparadas à pele normal ($p < 0.0001$). As células S-100+ ou FXIIIa+ estavam localizadas em toda a extensão do estroma, sem diferença estatística entre as lesões pelo HPV. Embora os DDFXIIIa+ estivessem aumentados em tamanho nas lesões de vulva, seu número não diferiu da pele normal. Não se observou diferenças numéricas das células S-100+ entre os grupos de lesão e pele normal. Foi possível detectar maior número de DDFXIIIa+ sobre as células S-100+ no grupo de lesões de baixo grau ($p = 0,0008$) e de alto grau ($p = 0,0031$). As citocinas foram detectadas em pequenas quantidades nos grupos de lesões, porém sem diferença estatística. Para a análise da expressão de e-caderina, o grupo de vulvites crônicas inespecíficas foi utilizado como controle. Em 91.0% das vulvites inespecíficas foi observado padrão homogêneo e difuso da expressão de e-caderina na camada espinhosa baixa e média. Ambos os grupos de lesões HPV+ exibiram padrões semelhantes de expressão de e-caderina, com marcação difusa ou focal na camada espinhosa baixa e média. Não houve imuno-reatividade nas áreas de displasias. Como resultado da reação de dupla-marcação, feita através da utilização da hibridização *in situ* para detecção do DNA do HPV e imuno-histoquímica para DDFXIIIa+, foi possível identificar antígenos virais no citoplasma dessas células. **CONCLUSÕES:** o HPV interfere na expressão das células de Langerhans, pois estas estavam diminuídas, com morfologia alterada em relação à pele normal; os DDFXIIIa+ apresentam-se aumentados em número sobre as células S-100+, o que poderia refletir um mecanismo local “compensatório” contra o HPV; as lesões de baixo e alto grau não apresentam diferenças significativas quanto à densidade de células expressando TNF- α , IFN- γ e IL-10, embora TNF- α predomine entre as três citocinas; há uma correlação positiva entre os DDFXIIIa+ e a expressão de TNF- α , o que poderia ser explicado por sua capacidade em produzir tal citocina a partir de um provável estímulo desencadeado pelo HPV; o HPV influencia na expressão de E-caderina na vulva, com destaque para a ausência de expressão nas áreas de displasia; o DNA do HPV encontrado no interior dos DDFXIIIa+ aliado às alterações na morfologia celular, a sobreposição destas sobre as células S-100+ e a relação encontrada com a citocina TNF- α , nos permitem sugerir que os DDFXIIIa+ têm um papel importante como células apresentadoras de antígeno frente à infecção pelo HPV.

Descritores: papilomavírus humano, vulva/lesões, células dendríticas, citocinas, caderinas

Pereira NV. Study of dendritic cells, cytokines TNF-alpha, IFN-gamma and IL-10 and the adhesion molecule E-cadherin in vulvar lesions induced by human papillomavirus [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 118p.

INTRODUCTION: The human papillomavirus (HPV) is the most frequent agent in sexually transmitted diseases and is responsible for almost 40% of vulvovaginal cancer. We studied the immune response in vulvar lesions, considering the CD1a+, FXIIIa+ and S-100+ dendritic cells, TNF- α , IFN- γ and IL-10 cytokines and the adhesion molecule E-cadherin. **METHODS:** We used 49 vulvar lesions mediated by HPV (condylomata acuminata, VIN-I, VIN-II e VIN-III) and 11 biopsies diagnosed as chronic non-specific vulvitis. Four groups were formed: low-grade lesions (condylomata and VIN-I), high-grade lesions (VIN-II and III), non-specific vulvitis and normal skin. The detection of cells, cytokines and e-cadherin was performed by immunohistochemistry reaction. **RESULTS:** Langerhans cells (CD1a+) were distributed through epithelia, mainly in suprabasal and spinous layer. They did not differ between HPV groups, but were decreased in number and size when compared to normal skin ($p < 0.0001$). The S-100+ ou FXIIIa+ cells were distributed through stroma and did not differ between HPV lesions. Although the FXIIIa+DD were increased in size in vulvar lesions, their number did not differ from normal skin. The S-100+ cells did not differ in number between the groups of lesions and normal skin. We detected an increased number of FXIIIa+DD over S-100+ cells in the group of low-grade ($p = 0.0008$) and high-grade lesions ($p = 0.0031$). The cytokines were detected in small quantities in both the lesions groups, with no statistical difference. The group of chronic non-specific vulvitis was used as control group to analyse the expression of e-cadherin. 91.0% of non-specific vulvitis presented a homogeneous and diffuse pattern of expression in spinous layer Both the HPV+ groups of lesions presented similar patterns of e-cadherin expression, with a focal or diffuse localization in spinous layer. The dysplastic epithelium did not present immunoreactivity. As a result of the double-staining, using *in situ* hibridization to detect DNA of HPV and immunohistochemistry to FXIIIa+DD, it was possible to observe viral antigens in the cytoplasm of such cells. **CONCLUSIONS:** The HPV interfere with the expression of Langerhans cells, since they were decreased when compared to the normal skin; the FXIIIa+DD were increased in number over S-100+ cells, suggesting a local compensatory mechanism against the HPV; the low and high grade lesions did not differ in the number of cells expressing TNF- α , IFN- γ and IL-10, although TNF- α predominate among the three cytokines; there is a positive correlation between the FXIIIa+DD and the expression of TNF- α that could be explained by their role as TNF-producing cells following a stimulus of HPV; the HPV changes the expression of E-cadherin in vulvar lesions, mainly in dysplastic epithelium; HPV DNA visualized in the cytoplasm of FXIIIa+DD and the cellular morphological changes, the increased number over S-100+ cells and the correlation with TNF- α , allow us to suggest that FXIIIa+DD play an important role as antigen presenting cells in the infection by HPV.

Descriptors: human papillomavirus, vulva/injuries, dendritic cells, cytokines, cadherins

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A infecção genital pelo HPV é a doença sexualmente transmissível mais freqüentemente diagnosticada. Ao menos uma em cada duas pessoas irá adquirir a infecção genital pelo vírus em algum momento da sua vida (CDC, 2008).

O papilomavirus humano (HPV) é um vírus formado por um pequeno fragmento de DNA circular de cerca de 7900 pares de bases, envolto por um capsídeo icosaédrico. Esse vírus pode ser encontrado sob a forma de mais de 100 tipos que infectam o epitélio cutâneo e mucoso do trato anogenital, mãos e pés, sendo que aproximadamente 30 destes infectam o trato genital. (Majewski e Jablonska, 1997; Walboomers *et al.*, 1999; Longworth e Laimins, 2004).

Em 90% dos casos a infecção é assintomática e pode ser resolvida pelo organismo entre oito meses e dois anos. Quando manifesta sinais clínicos, as lesões genitais podem ocorrer em diferentes áreas, como colo uterino, região perianal, vagina e vulva. Os genótipos encontrados nessas regiões dividem-se em subtipos de baixo potencial oncogênico (HPV-6, HPV-11), que promovem a formação de verrugas genitais, e os de alto potencial oncogênico (HPV-16, HPV-18), relacionados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas e cânceres anogenitais (Greer *et al.*, 1995;

Walboomers *et al.*, 1999; Parkin *et al.*, 2001; Pisani *et al.*, 2002; WHO, 2007).

Estudos epidemiológicos e virológicos mostram o HPV como causador de 40% dos cânceres de genitália externa (vulva e vagina) (Parkin e Bray, 2006).

Muitos dos cânceres associados ao HPV são precedidos por lesões displásicas, como a neoplasia intraepitelial vulvar (NIV). Há um crescimento mundial nas taxas de incidência de NIV, particularmente em jovens, e parece estar associado com a infecção por HPV (Joura, 2002; Sturgeon *et al.*, 1992; Paavonen, 2007).

Uma vez que o contato com o vírus HPV se dá inicialmente através da pele ou mucosas, a resposta imune que se desenvolve nesses locais tem grande importância na defesa do hospedeiro frente a esse agente. Dentre os principais componentes do sistema imune da pele estão: queratinócitos, células endoteliais dérmicas, células dendríticas e linfócitos que migram para os linfonodos locais. Na pele também são encontrados mediadores inflamatórios solúveis e outros fatores da resposta imune (Streilen, 1978; Streilen, 1983; Bos e Kapsenberg, 1986).

O processo de apresentação antigênica na infecção pelo HPV ainda não é bem definido, mas sabe-se que as células de Langerhans (CL) são as células apresentadoras de antígenos importantes nesse processo. Elas são responsáveis pelo início da resposta imune, através do processamento dos antígenos e transporte deles para os linfonodos. (Bos e Kapsenberg, 1986;

Nickoloff, 1993; Sanclemente e Gill, 2002). Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a relação entre a densidade dessa população celular e a infecção pelo HPV. Entretanto, há resultados controversos, pois alguns estudos descrevem números aumentados (Bhawan, *et al.*, 1986; Caorsi e Figueroa, 1986; Campaner *et al.*, 2007), enquanto outros descrevem números reduzidos das CL, considerando-se sua localização na epiderme e derme e comparando-se ao tecido normal. A maioria desses trabalhos enfoca a infecção na cérvix uterina (Chardonet *et al.*, 1986; Tay *et al.*, 1987; Drijkoningen *et al.*, 1988; Connor *et al.*, 1999; Sanclemente e Gill, 2002; Giannini *et al.*, 2002; Nadais *et al.*, 2006; Taube *et al.*, 2007).

Além das CL, a mucosa possui outras células dendríticas envolvidas na resposta imune local (Cerio *et al.*, 1989). Dentre elas destaca-se a presença dos dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos (DDFXIIIa+), que tem capacidade de endocitar e apresentar antígenos (Headington, 1986). Essas células já foram investigadas em várias doenças (Arrese Estrada e Piérard, 1990; Piérard-Franchimont *et al.*, 1996; Pagliari; Sotto, 2002), mas pouco se sabe a respeito de sua função na infecção pelo HPV; (Al-Saleh *et al.*, 1995; Arrese *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2008).

Acredita-se que as células S-100 positivas também sejam células apresentadoras de antígeno, pois possuem aspecto ultra-estrutural semelhante às CL (Cocchia *et al.*, 1981). Na pele e mucosa, as células positivas para a proteína S-100 estão localizadas na derme ou estroma,

apesar desta proteína ser também utilizada para identificação de células de Langerhans no epitélio.

As citocinas têm grande importância no desenvolvimento da resposta imune e parecem ter sua expressão alterada na infecção pelo HPV. Entre elas destacam-se: TNF- α e IFN- γ , necessárias para uma resposta efetiva contra patógenos intracelulares e células tumorais, e a IL-10, citocina imunoregulatória participante da imunidade contra patógenos extracelulares e respostas alérgicas (Clereci e Shearer, 1994; Malejczyk *et al.*, 1996; Spellberg e Edwards, 2001; Gonçalves e Donaldi, 2004; Bais *et al.*, 2007).

Estudos realizados com lesões cervicais induzidas pelo HPV mostram uma tendência de redução da expressão de TNF- α e IFN- γ , e aumento da expressão de IL-10, proporcionalmente ao agravamento das lesões (Arany *et al.*, 2002; Azar *et al.*, 2004; Alcocer-González *et al.*, 2006; Bais *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008).

A infecção pelo HPV também altera a expressão da molécula de adesão E-caderina. Isso ocorre porque a expressão da molécula está ligada ao processo de diferenciação dos queratinócitos, que é alterado na infecção. A E-caderina é muito importante para a movimentação das CL no epitélio e parece estar reduzida nas lesões de colo causadas pelo HPV (Tang *et al.*, 1993; e Chen *et al.*, 2003; Carico e Atlante, 2001; Hurbert *et al.*, 2005).

Apesar de vários estudos sobre a ação do HPV na resposta imune já terem sido realizados, visto que a infecção pelo vírus tem grande ocorrência no mundo, os dados descritos ainda não são conclusivos e a maioria destes

se concentra na infecção no colo uterino. É importante que outras regiões, como a vulva, sejam melhor estudadas para que se possa verificar se a ação do vírus é a mesma e se os mecanismos da resposta imune procedem da mesma maneira. Com relação às células dendríticas, as mais estudadas são as células de Langerhans, porém é necessário que o papel de outras células seja pesquisado na busca de uma visão global da defesa que o organismo pode produzir contra o HPV. Quanto às citocinas, o que se sabe não é resultado de trabalhos que avaliam a resposta imune *in situ*, o que seria bastante interessante e poderia ser realizado através de técnica de imunohistoquímica.

Desta forma, esse trabalho visou um aprofundamento do conhecimento da infecção pelo HPV na vulva, bem como da resposta imune desenvolvida no local após a infecção pelo vírus, centralizando a abordagem nas células dendríticas CD1a+, FXIIIa+ e S-100+, citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10, e da molécula de adesão E-caderina.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Geral: contribuir para um melhor entendimento da resposta imune do hospedeiro contra o vírus HPV, em lesões de vulva de baixo e alto grau, através do estudo das células dendríticas, citocinas e da molécula de adesão E-caderina.

Específicos:

- Detectar e quantificar as células de Langerhans, dendrócitos dérmicos FXIIIa positivos e células apresentadoras de antígenos S100+ em lesões de vulva com HPV comparando-se baixo e alto grau;
- Verificar a expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em lesões de vulva com HPV comparando-se baixo e alto grau;
- Avaliar a expressão da molécula de adesão E-caderina no epitélio em lesões de vulva infectadas pelo HPV comparando-as com lesões de vulvites crônicas inespecíficas;
- Padronizar a reação de dupla-marcação com as reações de hibridização *in situ* e imuno-histoquímica;
- Pesquisar a possível relação dos dendrócitos dérmicos FXIIIa+ com o HPV.

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Histórico

Os papilomavirus (PV) compreendem uma família de vírus DNA não envelopados e epiteliotrópicos que podem induzir lesões benignas na pele (verrugas) e membranas mucosas (condilomas). Também podem estar associados ao desenvolvimento de lesões epiteliais malignas, como os tumores do trato anogenital (Howley e Lowy, 2007).

As verrugas genitais eram consideradas uma forma de sífilis ou gonorréia até o século XIX. Já no início do século XX, Ciuffo (1907) demonstrou a natureza viral dessas verrugas em humanos, ao observar que filtrados livres de células, provenientes de lesões, eram capazes de transmitir a doença. Posteriormente, os PV foram identificados em várias espécies de vertebrados além dos humanos (Lancaster e Olson, 1982; Sundberg, 1987). Não foi possível estudar a biologia do papilomavirus humano (HPV) em animais, pelo fato do vírus ser espécie-específico (Howley e Lowy, 2007).

Na década de 70, a clonagem molecular permitiu um avanço no estudo dos papilomavirus, até então pouco desenvolvido devido à dificuldade encontrada para cultivo do vírus. A técnica propiciou uma grande melhoria no estudo das propriedades biológicas e bioquímicas desses vírus (Chen *et al.*, 1982; Danos *et al.*, 1982; Danos *et al.*, 1983). Em 1977,

Gissmann *et al.* e Orth *et al.* estabeleceram a pluralidade da família HPV. Entre os anos de 1980 e 1982, o DNA de dois HPV de verrugas genitais e papilomas laríngeos foram isolados e caracterizados (Gissmann e Zur Hausen, 1980; De Villiers *et al.*, 1981; Gissmann *et al.*, 1982). Embora esse DNA não tenha sido achado nos tumores cervicais, o uso dessas sondas sob condições de hibridização de baixa estringência proporcionou a clonagem inicial e a caracterização dos DNAs dos HPV16 e HPV18 diretamente das biópsias de câncer cervical e de lesões precursoras de câncer anogenital (Dürst *et al.*, 1983; Ikenberg *et al.*, 1983; Boshart *et al.*, 1984). Estudos subseqüentes identificaram o DNA desses dois tipos em 70% de todas as biópsias testadas. O DNA dos outros tipos de HPV encontrados foi detectado em biópsias de câncer cervical e posteriormente em outras regiões do trato anogenital, incluindo a vulva. (Zur Hausen, 2008).

3.2. Epidemiologia

A infecção pelos papilomavírus humanos (HPV) tem distribuição mundial e está associada com uma grande despesa para os sistemas de saúde. É a doença sexualmente transmissível mais freqüentemente diagnosticada. Ao menos uma em cada duas pessoas irá adquirir a infecção genital pelo vírus em algum momento da sua vida. Essa proporção aumenta para 80% em mulheres com mais de 50 anos (CDC, 2008). Embora o risco

da infecção por HPV permaneça alto ao longo da vida da mulher, vários estudos relatam o maior risco e a maior prevalência da infecção entre adolescentes e mulheres jovens de 15 a 24 anos (Bauer *et al.*, 1991; Moscicki *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2002; Winer *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2004; Auvinen *et al.*, 2005; Dunne *et al.*, 2007; Paavonen, 2007).

Em 90% dos casos a infecção é assintomática e pode ser resolvida pelo organismo dentro de oito meses a dois anos. Quando manifesta sinais clínicos, é comum o desenvolvimento de verrugas genitais, em sua maioria causadas pelos HPV-6 e 11 (Greer *et al.*, 1995; WHO, 2007) e que podem ser tratadas. As maiores taxas de incidência das verrugas genitais são encontradas entre homens e mulheres de 20 a 29 anos (Koshiol *et al.*, 2004; Kjaer *et al.*, 2006; WHO, 2007). O uso contínuo de preservativo diminui entre 60 e 70% o risco de desenvolvimento de verrugas genitais e a infecção pelo vírus HIV está associada ao aumento da prevalência das mesmas (Winer *et al.*, 2005).

Nos casos mais graves, a infecção pelo HPV pode promover o aparecimento de cânceres, que representam cerca de 5,2% de todos os cânceres (Parkin *et al.*, 2005; Steben e Duarte-Franco, 2007). Do total estimado dos cânceres atribuíveis ao HPV, 94% afetam mulheres e 80% estão em países em desenvolvimento. Estudos epidemiológicos e virológicos mostram o HPV como causador de 100% dos cânceres cervicais, 90% dos cânceres anais, 40% dos cânceres de genitália externa (vulva, vagina e

pênis), 12% de cânceres de orofaringe e 3% dos cânceres orais (tabela 1) (Parkin e Bray, 2006).

Tabela 1. Número de cânceres atribuídos à infecção por HPV, 2002: países desenvolvidos e em desenvolvimento (Parkin e Bray, 2006).

Local	Atribuível ao HPV (%)	Países desenvolvidos		Países em desenvolvimento	
		Nº total de cânceres	Atribuível ao HPV (%)	Nº total de cânceres	Atribuível ao HPV (%)
Cérvice	100	83 400	83 400	409 400	409 400
Pênis	40	5 200	2 100	21 100	8 400
Vulva,vagina	40	18 300	7 300	21 700	8 700
Ânus	90	14 500	13 100	15 900	14 300
Boca	>3	91 200	2 700	183 100	5 500
Orofaringe	>12	24 400	2 900	27 700	3 300
Total		237 000	111 500	678 900	449 600

Ao contrário do câncer cervical, que é bastante comum com cerca de 0,5 milhões de casos anuais (WHO, 2007), o câncer vulvar é raro e tem incidência mundial de aproximadamente 1,8 por 100.000 mulheres/ano. Os países em desenvolvimento possuem os números mais altos e o Brasil detém uma das maiores taxas da incidência de cânceres vulvo-vaginais, alcançando 2,1 em Goiânia (IARC, 1992), 3,1 em Porto Alegre e 4,2 em São Paulo para cada 100.000 (IARC, 1982, Pinto *et al.*, 1999).

Muitos dos cânceres associados ao HPV são precedidos por lesões displásicas, como a neoplasia intraepitelial vulvar (NIV). Há um crescimento mundial nas taxas de incidência de NIV, particularmente em jovens, e parece

estar associado com a infecção por HPV (Joura, 2002; Sturgeon *et al.*, 1992; Paavonen, 2007).

A incidência das NIV e dos cânceres invasivos de vulva aumenta por volta de 2,4% ao ano. As NIV são responsáveis por 57% das neoplasias vulvares e se destacam como uma das 12 neoplasias cuja incidência cresce nos países desenvolvidos. No período de 1973 a 2000, os Estados Unidos tiveram um aumento da incidência de NIV de aproximadamente 411% (de 0,56 para 2,86 casos/100.000 mulheres) contra 20% dos cânceres invasivos (Judson *et al.*, 2006). Segundo o estudo de Jones e colaboradores (1997), cerca de 80% das pacientes com NIV clássica associada ao carcinoma tinham menos de 50 anos e idade média do diagnóstico passou de 52,7 para 35,8 anos (Akerman *et al.*, 2007). Assim como nas lesões cervicais, os tipos de HPV predominantes nos casos de NIV de alto grau parecem ser os HPV-16 e 18 (Buscema *et al.*, 1988; Koutsky, 1997; Paavonen, 2007).

Em suma, dentre os principais fatores de risco para a infecção por HPV, desenvolvimento de lesões neoplásicas e câncer podemos destacar: multiplicidade de parceiros sexuais, falta do uso de preservativos, imunossupressão, tabagismo, hábitos de higiene, fatores genéticos, excesso de radicais livres e outros (Piato, 2002; Tindle, 2002). O que agrava esse quadro é o fato de que os jovens têm sua iniciação sexual cada vez mais cedo, aumentando assim o risco de infecção. Um estudo realizado no Reino Unido com adolescentes de 15 a 19 anos e que só tiveram um parceiro sexual, mostrou evidências da rápida aquisição do HPV. O tempo médio da

primeira relação sexual à primeira detecção do HPV foi de apenas três meses (Collins *et al.*, 2002; Paavonen, 2007).

3.3. Etiologia da infecção

3.3.1. O papilomavírus humano (HPV)

3.3.1.1. Estrutura do vírus

O HPV, que pode ser encontrado sob a forma de mais de 100 tipos, é um vírus formado por um pequeno fragmento de DNA circular de cerca de 7900 pares de bases, envolto por um capsídeo icosaédrico. Seu genoma pode ser dividido em três partes: região inicial (*early region*), região tardia ou final (*late region*) e a LRC (*long control region*). Esta última parte possui componentes que se ligam a vários fatores de transcrição envolvidos na regulação da replicação do DNA e na expressão gênica viral (figura 1) (Majewski e Jablonska, 1997).

Na região inicial (E) encontramos os genes que codificam as proteínas E1 e E2, necessárias para a replicação do HPV e altamente conservadas entre todos os tipos de HPV (Ustav e Stenlund., 1991; Chiang *et al.*, 1992; Sverdrup e Khan, 1994). E1 inicia a replicação do DNA viral ao ligar-se a seqüências ricas em AT na origem viral, próximo ao começo do sítio de transcrição inicial. Como a ligação de E1 com DNA é fraca, E1 forma complexos com E2, que a carrega de maneira eficaz para a origem viral

(Frattini e Laimins, 1994a; Frattini e Laimins, 1994b; Kuo *et al.*, 1994; Lusky *et al.*, 1993; Mohr *et al.*, 1990; Sanders e Stenlund, 2000; Sedman *et al.*, 1997). A proteína E2 trabalha tanto na replicação quanto na regulação da transcrição do HPV. Em níveis baixos, E2 ativa a transcrição viral, enquanto em concentrações altas a transcrição é reprimida. A perda da expressão de E2 está relacionada à proliferação celular aumentada induzida por E6 e E7 e que leva ao carcinoma cervical (Jeon *et al.*, 1995; Corden *et al.*, 1999; Walboomers *et al.*, 1999; Hebner e Laimins, 2005).

Também localizadas na região inicial, as proteínas E6 e E7 dos HPV de alto risco agem como oncoproteínas virais, capazes de imortalizar queratinócitos humanos. Essas funções não podem ser associadas com as proteínas correspondentes dos HPV de baixo risco (Longworth e Laimins, 2004). E6 é encontrada no núcleo e no citoplasma e sua ação mais conhecida é a interação com p53, o que impede a atividade desta proteína supressora de tumor que regula a expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, como a p21. Em células normais, quando ocorre dano no DNA, p53 se torna ativada e induz altos níveis de expressão de p21, promovendo a parada do ciclo celular e apoptose (Ko and Prives, 1996). Com localização predominantemente nuclear, E7 é capaz de se ligar às proteínas da família Rb (Rb, p107 e p130). Isso propicia o progresso do ciclo celular e replicação do vírus nas células basais diferenciadas. E7 também promove o aumento da atividade das proteínas que regulam o ciclo celular (Davies *et al.*, 1993; Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997; Ruesh e Laimins, 1998; Tommasino *et al.*, 1993; Zerfass-Thome *et al.*, 1996).

Na região final (L), estão localizados os genes L1 e L2, responsáveis pela codificação das proteínas de mesmo nome, que formam o capsídeo viral. Essas proteínas são expressas na fase final do ciclo de vida viral em células suprabasais altamente diferenciadas (Conger *et al.*, 1999; Hebner e Laimins, 2006).

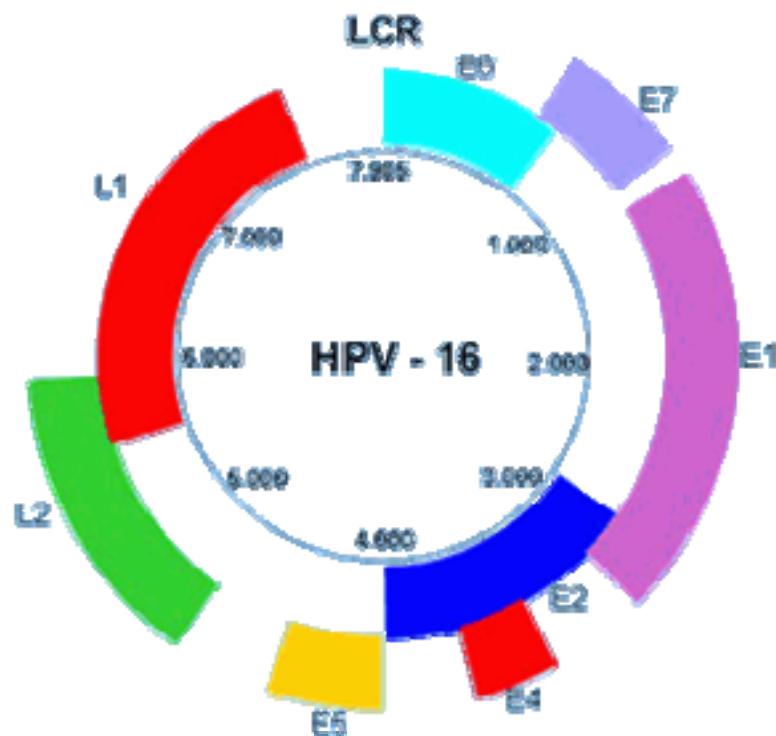


Figura 1- Esquema da organização do genoma do HPV-16.
FONTE: Sociedade Portuguesa de Papillomavirus
(www.sppv.org/info_ciencia.html)

3.3.1.2. Classificação do vírus

Após cerca de 30 anos de estudos para se classificar os HPV, foi encontrado um sistema de classificação em que eles pudessem ser agrupados de maneira mais adequada, que permitiu a designação de uma família própria, a *Papillomaviridae*. Isso aconteceu porque ao longo dos anos, com o surgimento de melhores ferramentas de pesquisa, foi se descobrindo novas características e diferenças (como tamanho e organização dos genomas) desses vírus em relação aos quais eram comparados, os poliomavírus (De Villiers *et al.*, 2004).

São agrupados no mesmo gênero os HPV que têm homologia da seqüência nucleotídica maior que 60%, com relação ao gene L1. A maioria dos HPV está agrupada no gênero Alpha-papillomavirus. As espécies dentro de um gênero têm entre 60% e 70% de homologia e normalmente possuem propriedades biológicas e patogênicas em comum. Por exemplo, o HPV-16 e todos os tipos de HPV pertencentes à sua espécie são encontrados no câncer cervical e em suas lesões precursoras (De Villiers *et al.*, 2004).

Para a identificação de um novo tipo de HPV é observado se há uma diferença maior que 10% em relação à seqüência nucleotídica do gene L1 (região mais conservada do genoma). Quando a diferença da homologia fica entre 2% e 10% é definido um novo subtipo e menor que 2%, uma variante (De Villiers *et al.*, 2004).

3.3.1.3. HPV relacionados às lesões benignas e neoplasias

Dos mais de 100 tipos de HPV identificados, cerca de 40 tipos infectam a região anogenital. Os HPV genitais são divididos de acordo com o seu potencial oncogênico, em dois grupos: baixo risco e alto risco. Os HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, são classificados como de baixo risco e são comumente relacionados a verrugas genitais. O grupo de alto risco é representado pelos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, e 82, sendo que os dois primeiros tipos são os maiores responsáveis pelas neoplasias e cânceres anogenitais (Munoz *et al.*, 2003).

A variação da oncogenicidade dos diversos tipos de HPV parece estar ligada à capacidade de integração do DNA viral ao DNA do núcleo da célula hospedeira, além de outros fatores. Quanto maior for a integração, maior será a probabilidade de ocorrer uma transformação da célula normal em neoplásica devido a mutações no genoma, como ocorre principalmente nos casos dos tipos de alto risco, devido à capacidade de imortalização e transformação das proteínas virais E6 e E7 (Longworth, 2004). A oncogenicidade é menor nos casos em que o DNA viral fica isolado no núcleo da célula, num epissomo extracromossomal. Pesquisas mostraram que o DNA do HPV tem preferência por células metaplásicas. Estas, por sua vez, podem ser encontradas no colo uterino, mas não na vagina e na vulva, o que pode esclarecer a maior ocorrência de carcinoma nesta região do útero (Piato, 2002).

3.4. Patogênese da Infecção

O HPV tem sua entrada na mucosa estratificada do hospedeiro por meio de micro-traumatismos e se aloja nas células basais com o auxílio dos receptores de superfície. A replicação viral está ligada à diferenciação e maturação das células escamosas, promovendo um grande aumento na quantidade de células basais e a diferenciação terminal tardia, levando a uma hiperplasia associada à formação das lesões. No caso dos HPV de alto risco, essas alterações causadas no ciclo celular podem ocasionar um crescimento anormal das células (Evander *et al.*, 1997; Giroglou *et al.*, 2001; Sanclemente e Gill, 2002).

A infecção das células basais pelo HPV leva à ativação de uma cascata de expressão dos genes virais que resulta na produção de aproximadamente 20 a 100 cópias extracromossomais de DNA viral por célula. Essa quantidade média de cópias é mantida nas células basais indiferenciadas no curso da infecção (Conger *et al.*, 1999; Longworth; Laimins, 2004). À medida que as células infectadas completam seu ciclo de vida, um subtipo de células filhas deixa a membrana basal para que ocorra a estratificação e diferenciação. É nessa fase produtiva do ciclo de vida viral, nas camadas mais diferenciadas do epitélio, que o HPV amplifica seu genoma para um alto número de cópias e expressa seus genes tardios, para a formação do capsídeo. A partir desse momento as partículas de vírions estão formadas e prontas para infectar outras células (Nickoloff, 1993; Chow e Broker, 1994; Sanclemente e Gill, 2002).

O HPV possui alguns artifícios que são utilizados como mecanismo de escape da resposta imune. Como exemplo, não lisa as células escamosas infectadas e não é capaz de infectar e se replicar nas células que iniciam a resposta imune (células apresentadoras de antígeno), impedindo estas de internalizarem os vírions ou apresentarem antígenos derivados deles. Outra característica importante é que as proteínas virais iniciais, localizadas principalmente no núcleo, são produzidas em quantidades insuficientes ou não estão acessíveis ao reconhecimento do sistema imune, pois a resposta desenvolvida é fraca. As proteínas finais que formam o capsídeo também colaboram ao estímulo ineficaz da resposta imune, como já foi visto em pacientes com verrugas genitais, portadores de HPV-16, os quais apresentaram soropositividade para estas proteínas somente meses após a infecção inicial. Além dos fatores citados, é importante ressaltar que não há fase inicial no sangue, deste modo são poucas as chances de que o vírus seja detectado pelo sistema imune (Tindle, 2002).

3.5. Características histológicas e classificação das lesões

Ao contrário das neoplasias cervicais malignas, originadas quase que exclusivamente pela infecção por HPV, esse vírus não é o único desencadeador do processo carcinogênico na vulva (Bonvicini et al, 2005). Nos últimos 20 anos, a taxa de detecção de NIV dobrou e a apresentação multifocal, juntamente com o risco incerto de progressão da doença maligna, a torna uma doença difícil de tratar, com uma taxa alta de recorrência (Jones

e Rowan,1994; Jones *et al.*, 1997; Herod *et al.*, 1996; Abdel-Hady et al., 2001).

As lesões vulvares que normalmente são relacionadas ao HPV são os condilomas acuminados e as neoplasias intraepiteliais vulvares (NIV).

Os condilomas são histologicamente caracterizados pela arquitetura verruciforme com núcleo fibrovascular denso, acantose, hiperqueratose, paraqueratose e coilocitose sem atipia celular (Wilkinson *et al.*, 1986; Wilkinson e Teixeira, 2003; Skapa *et al.*, 2007).

As NIV são histologicamente divididas em NIV clássicas ou indiferenciadas e as NIV diferenciadas. Esta última categoria não está associada ao HPV e ocorre em 2-10% dos casos, principalmente em mulheres em fase pós-menopausa. As NIV clássicas são relacionadas ao HPV e são mais freqüentes em mulheres jovens com idades entre 30 e 40 anos. Posteriormente, essas lesões clássicas foram classificadas em verrucosas, basalóides ou mistas. As NIV verrucosas mostram padrão de crescimento condilomatoso, acantose, hiperqueratose, paraqueratose e sinais de infecção por HPV (coilocitose e múltiplos núcleos). As lesões clássicas basalóides são planas sem hiperqueratose e paraqueratose, possuem queratinócitos pequenos e displásicos semelhantes às células epidérmicas basais e sem efeito citopático do HPV. Nas NIV mistas há sobreposição ou mistura das características verrucosas e basalóides (Hart, 2001; McNally *et al.*, 2002).

Em 1986 foi proposta uma classificação das NIV em grau I, II e III pela *International Society for the Study of Vulvovaginal Diseases* (ISSVD). Essa classificação tinha como objetivo melhorar a reprodutibilidade dos diagnósticos e diminuir as dúvidas referentes ao potencial pré-canceroso das lesões (Wilkinson *et al.*, 1986; Preti *et al.*, 2000; Skapa *et al.*, 2007). Como critério, as NIV-I apresentam menos de um terço de células imaturas atípicas na espessura do epitélio. O grau II é caracterizado por uma displasia moderada, ocorrendo alterações em até dois terços do epitélio e as NIV de grau III possuem um comprometimento de mais de dois terços do epitélio, com displasia intensa. A grande maioria das NIV encontradas é de grau II e III, com a distinção entre esses dois sendo altamente subjetiva (Hart, 2001; McNally *et al.*, 2002; Fox e Wells, 2003; Bonvicini *et al.*, 2005).

A classificação da ISSVD (1986) foi adotada pela *World Health Organization* (WHO) e sofreu alterações em 2004 (Sideri *et al.*, 2005) e em 2005 (Medeiros *et al.*, 2005). Esta última modificação introduziu o termo lesão intraepitelial vulvar (LIV) e transformou os condilomas e as NIV-I em LIV de baixo grau e as NIV-II e III em LIV de alto grau.

Apesar da nova classificação, ainda existem controvérsias. Estudos mostram que as lesões vulvares de baixo grau podem ter HPV de alto risco, assim como não são todas as lesões de alto grau que são positivas para os HPV de alto risco (Srodon *et al.*, 2006; Skapa *et al.*, 2007).

3.6. Sistema Imune da Pele

Uma vez que o contato com o vírus HPV se dá inicialmente através da pele ou mucosas, a resposta imune que se desenvolve nesses locais de entrada tem grande importância na defesa do hospedeiro frente a esse agente.

O sistema imune da pele é composto, principalmente, por queratinócitos, células endoteliais dérmicas, células dendríticas, e linfócitos circulantes que migram para os linfonodos locais. Na pele também são encontrados mediadores inflamatórios solúveis e outros fatores da resposta imune (Streilen, 1978; Streilen, 1983; Bos e Kapsenberg, 1986).

3.6.1. Células do sistema imune da pele

3.6.1.1. Células de Langerhans (CL)

As células de Langerhans (CL) são células dendríticas presentes na epiderme ou epitélio com localização suprabasal e derivadas da medula óssea. Foram descritas pela primeira vez por Paul Langerhans em 1868 e podem ser encontradas na derme normal, mucosa oral, esôfago, mucosa gástrica, tonsilas e colo uterino (Silberberg-Sinakin *et al.*, 1980). Ultra-estruturalmente, as CL são caracterizadas pelos grânulos de Birbeck, estruturas citoplasmáticas únicas em forma de raquete (Birbeck *et al.*, 1961; Romani *et al.*, 2003). Como exemplos de receptores de superfície expressos

pelas CL temos: langerina/CD207, S100, CD1a (T6), adenosina trifosfatase (ATPase), MHC classe II e moléculas co-estimulatórias (Tay *et al.* 1987; Taube, 2006).

As CL são fundamentais para a vigilância imune da pele. Elas são as principais células apresentadoras de antígeno e são responsáveis pela migração e transporte de antígenos da epiderme para os linfonodos (Taube *et al.*, 2006).

A densidade das CL tem sido bastante estudada em várias doenças, devido à sua grande importância para a eficácia da resposta imune da pele. Com relação às áreas genitais, as contagens médias encontradas no epitélio normal são mais altas na vulva, seguida por colo uterino e vagina (Edwards e Morris, 1985). Essa densidade regular de células pode ser alterada por doenças ou tabagismo (Barton *et al.*, 1988).

3.6.1.2. Células S100 positivas (S100+)

A proteína S-100 pertence a uma família de proteínas ácidas que se ligam ao cálcio e se distinguem por terem duas regiões ligantes de cálcio (Zimmer *et al.*, 1996; McNutt, 1998). Na pele e mucosa as células positivas à S-100 estão localizadas na derme ou estroma, apesar desta proteína ser mais utilizada para identificação de células de Langerhans no epitélio. A primeira observação dessas células na derme foi feita em 1981 por Cocchia

e colaboradores, que observaram células com aspecto ultra-estrutural semelhante ao das CL, mas sem as granulações características. Embora não tenha sido esclarecido até hoje, essas semelhanças sugerem que as células S-100+ da derme possam ser apresentadoras de antígenos, assim como as CL. Outra evidência nesse sentido é o fato dessa proteína estar presente em outras células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos (Haimoto *et al.*, 1987).

3.6.1.3. Dendrócitos Dérmicos Fatos XIIIa positivos (DDFXIIIa+)

Os dendrócitos dérmicos fator XIIIa (DDFXIIIa) constituem uma outra população de células dendríticas derivadas da medula óssea, com o fenótipo de células apresentadoras de antígeno. Estão localizados na derme reticular e papilar superior, ao redor de vasos sanguíneos (Headington, 1986). Possuem características histo-enzimáticas (esterase+, lisozima+, quimotripsina+) e imuno-histoquímicas (OKM1+, S22+, S100-, OKT6-) que denotam suas diferenças em relação às CL e aos fibroblastos (Headington, 1986). Também são células positivas para o Fator XIIIa da coagulação sanguínea, uma protransglutaminase envolvida na homeostase e são classificadas como dendrócitos tipo I (Cerio *et al.*, 1989).

Na pele normal, a maioria das células FXIIIa+ também possui características imuno-fenotípicas de células derivadas da medula óssea e de

outras células apresentadoras de antígenos, pois são HLA-DR+. Na presença de inflamação, como eczema atópico e psoríase, estas frequentemente aparecem em maior número. Acredita-se que as células FXIIIa+ são capazes de se diferenciar e migrar para a epiderme, o que indica uma interação entre derme e epiderme em busca do desenvolvimento de uma resposta imune (Headington, 1986; Cerio *et al.*, 1989).

Quando foram estudados na psoríase, os DDFXIIIa+ produziram TNF- α . Esse fator ativa os queratinócitos, induzindo sua hiperproliferação e produção de IL-1, IL-8 e ICAM-1 com conseqüente migração de células inflamatórias e desenvolvimento de lesão psoriática (Nickoloff e Griffiths, 1990; Nickoloff *et al.*, 1991).

Os DDFXIII+ vêm sendo estudados por vários grupos de pesquisa, em busca de seu papel na imunidade da pele, sob diversas condições. Em trabalho publicado em 1990, Arrese Estrada e Piérard observaram o aumento do número, e por vezes do tamanho, dessas células em pápulas fibrosas da face, dermatofibromas, líquen escleroso e atrófico, morfea e cicatriz, granuloma piogênico e no estroma altamente vascularizado adjacente aos tumores fibroepiteliais de Pinkus e melanoma maligno (Arrese Estrada e Piérard, 1990). Outro estudo realizado em 1996, associou a densidade dos DDFXIIIa+ à baixa taxa de proliferação de células neoplásicas em carcinomas de células basais e melanomas malignos (Piérard-Franchimont *et al.*, 1996). Outro trabalho, com lesões de pele na paracoccidiodomicose, também verificou um aumento no número e no tamanho dos DDFXIIIa+ em relação ao grupo controle (pele normal) e inferiu

um papel destas células na patogênese desta doença (Pagliari e Sotto, 2002).

Existem apenas alguns trabalhos sobre os DDFXIIIa+ em lesões provocadas pelo HPV. Al-Saleh e colaboradores (1995) encontraram um número mais alto de células FXIIIa+ em lesões intraepiteliais de alto grau do que nas biopsias cervicais normais. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, também mostrou que essas células estavam em grande quantidade em lesões anogenitais derivadas da infecção pelo HPV (Arrese *et al.*, 2001). Em um trabalho recente, nosso grupo encontrou o DNA do HPV no interior dos DDFXIIIa+, o que sugere que estas células tenham um papel na resposta imune do hospedeiro frente a essa infecção (Pereira *et al.*, 2008).

3.6.2. Citocinas

As citocinas são produtos de diversas células linfóides e não linfóides, como as células do epitélio estratificado e os queratinócitos, que são grandes fontes. Elas formam uma rede importante de mediadores inflamatórios que facilita a interação célula a célula nos tecidos linfóides associados à pele e às mucosas (Streilein, 1993). As citocinas são pró-inflamatórias ou primárias, como TNF- α e IL-1, quando induzem a síntese de outros mediadores (citocinas secundárias ou quimiocinas), que ativam as células linfóides e atuam na quimiotaxia (Schroder, 1995; Gonçalves e Donaldi, 2004). Existem também as citocinas imuno-estimulatórias ou com

padrão Th1, como a IL-2 e o IFN- γ , que promovem a imunidade celular e são necessárias para uma resposta efetiva contra patógenos intracelulares e células tumorais. IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 são exemplos de citocinas importantes na imunidade humoral contra patógenos extracelulares e respostas alérgicas. A IL-10 é considerada um citocina imuno-regulatória, mas as demais se encaixam em um padrão Th2 da resposta imune (Malejczyk *et al.*, 1996; Clereci e Shearer, 1994; Spellberg e Edwards, 2001; Bais *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008).

3.6.2.1. Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina que tem uma ação antiviral e anti-tumoral importante. Codificada por genes localizados no MHC, essa citocina é produzida, principalmente, por monócitos/macrófagos e por células T auxiliaadoras. Os efeitos biológicos do TNF- α são mediados por seus dois receptores TNFR1 e TNFR2, presentes em vários tipos celulares e tecidos. O TNFR1 é expresso em células sensíveis a ações citotóxicas do TNF- α , ao passo que o TNFR2 é fortemente expresso em células B e T estimuladas (Diez-Ruiz *et al.*, 1995; Bais *et al.*, 2007).

O TNF- α é amplamente produzido pelos queratinócitos e age na resposta imune participando do processo de maturação das células dendríticas e da migração destas para os linfonodos. Essa citocina é responsável também pelo aumento da produção de moléculas de adesão e

MHC classe I, atuantes na apresentação dos antígenos virais, além de apresentar um efeito citotóxico nas células tumorais (Koch *et al.*, 1990; Sanclemente e Gill, 2002; Berthier-Vergnes *et al.*, 2005).

3.6.2.2. Interferon-gama (IFN- γ)

O IFN- γ aumenta a expressão de moléculas do MHC classe II na superfície das células de Langerhans e dos queratinócitos, o que proporciona a esse último tipo celular a ação de uma célula apresentadora de antígeno (APC) e que acarreta na ativação de uma resposta imune antiviral (Sprecher e Becker, 1991; Grebbe *et al.*, 1992; Woodworth *et al.*, 1992; Gonçalves e Donaldi, 2004). Em ação conjunta com o TNF- α , o IFN- γ pode estimular os queratinócitos a expressarem ICAM-I, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES e TGF- β , após interação das APC da pele com células T de memória recrutadas do sangue (Barker *et al.*, 1991; Sanclemente e Gill, 2002).

3.6.2.3. Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 pode ser produzida por diversas células, como macrófagos, células dendríticas, células B, e subtipos de células T CD4+ e CD8+ (Moore

et al.,2001; Kamanaka *et al.*, 2006). Essa citocina pode regular as respostas imuno-estimulatórias e imuno-regulatórias, inatas e adaptativas, limitando a ativação e diferenciação das células T nos linfonodos, como também por meio da supressão de respostas pró-inflamatórias nos tecidos, prejudicando o controle de patógenos e ou reduzindo a imuno-patologia. A IL-10 inibe a expressão de moléculas MHC classe II e co-estimulatórias B7-1/B7-2 em monócitos e macrófagos e limita a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Moore *et al.*,2001; Couper *et al.*, 2008).

3.7. E-caderina

As caderinas são uma família de glicoproteínas transmembrânicas envolvidas na adesão intercelular dependente de cálcio e que têm papel fundamental na formação do tecido (Takeichi, 1990; Takeichi, 1991; Ranscht, 1994; Carico *et al.*, 2001).

A E-caderina é uma molécula de adesão intercelular epitélio-específica. Sua função é regulada pelas proteínas citoplasmáticas associadas a ela, as α , β e γ -cateninas, que ligam a E-caderina ao citoesqueleto da base de actina (Herrenknecht *et al.*, 1991; Nagafuchi *et al.*, 1991; De Boer *et al.*, 1999; Denk *et al.*, 1997; Hinck *et al.*, 1994). A relação entre essas proteínas é essencial para sua função adesiva (Staddon *et al.*, 1995; Shibamoto *et al.*, 1995; Carico *et al.*, 2001).

A E-caderina está envolvida na interação entre os queratinócitos e as células de Langerhans e também contribui para manter as CL no epitélio escamoso (Tang *et al.*, 1993). Entretanto, a expressão intraepitelial de E-caderina, necessária para manter o equilíbrio na movimentação das CD/CL, é influenciada pelo estado de diferenciação dos queratinócitos, que é alterado durante a infecção e o desenvolvimento das lesões provocadas pelo HPV (Smedts *et al.*, 1992; Smedts *et al.*, 1993).

A E-caderina tem sido reconhecida como um bio-marcador importante da diferenciação tumoral (Takeichi, 1993; Shiozaki *et al.*, 1996). A perda da expressão de E-caderina tem sido correlacionada a um fenótipo invasivo de linhagens de células cancerosas *in vitro* (Hashimoto *et al.*, 1989, Frixen *et al.*, 1991) e estudos *in vivo* demonstraram uma expressão reduzida ou anormal de E-caderina em vários tipos de câncer, como tumores endometriais (Sakuragi *et al.*, 1994), cervicais (Inoue *et al.*, 1992; Vessey *et al.*, 1995; Hubert *et al.*, 2005) e ovarianos (Veath *et al.*, 1994).

3.8. A resposta imune

O HPV infecta os queratinócitos das camadas basais, e se estabelece no interior do núcleo dessas células, causando mudanças na sua forma, na função dos componentes celulares e no padrão de secreção dos mediadores

imunológicos (Bos e Kaspberg, 1986; Nickoloff, 1993; Sanclemente e Gill, 2002).

As células de Langerhans (CL) internalizam os antígenos e os processam num compartimento celular especializado e posteriormente migram para a derme em direção aos linfonodos. A apresentação de antígenos para os linfócitos T *naive* é feita nos linfonodos, onde se inicia uma resposta proliferativa antígeno-específica. Isso leva a uma migração e acúmulo de células T ativadas em regiões estratégicas da pele (Bos e Kaspberg, 1986; Nickoloff, 1993; Sanclemente e Gill, 2002).

Essa resposta pode ser desenvolvida somente com a participação de citocinas (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TGF- α e β , TNF- α , IFN- γ), moléculas de adesão (ICAM-1, CD40) e/ou quimiocinas (RANTES e MIP3 α) produzidas pelos queratinócitos (Barker *et al.*, 1991; Giannini *et al.*, 2002; Sanclemente e Gill, 2002).

Devido ao vírus causar diversas alterações peculiares nas células do hospedeiro, a resposta imune deixa de ser eficaz. Vários trabalhos têm relacionado a perda da eficiência da resposta com a densidade populacional de células dendríticas, o padrão de liberação de citocinas e a presença ou não de marcadores de superfície nessas células.

Muitos estudos associam a infecção e as lesões causadas pelo HPV com a diminuição (Bhawan *et al.*, 1986; Tay *et al.*, 1987; Connor *et al.*, 1999; Giannini *et al.*, 2002; Nadais *et al.*, 2006; Taube *et al.*, 2007) ou com o aumento (Caorsi e Figueroa, 1986; Campaner *et al.*, 2007) do número de CL,

sendo que alguns destes correlacionaram a densidade de células com a gravidade da lesão.

As alterações causadas pelo HPV no processo de diferenciação dos queratinócitos afetam inúmeros eventos, como a expressão da molécula de adesão E-caderina e a expressão de TNF- α . A E-caderina é muito importante na movimentação das CL no epitélio e parece estar reduzida nas lesões de colo causadas pelo HPV (Tang *et al.*, 1993; Carico e Atlante, 2001; Chen *et al.*, 2003; Hurbert *et al.*, 2005). Estudos mostram uma diminuição nos níveis de TNF- α e IFN- γ em lesões da cérvix uterina causadas pelo vírus, o que se relaciona com a persistência da infecção. Conforme a gravidade das lesões aumenta, a mudança na expressão de TNF- α e IFN- γ parece promover uma maior expressão de IL-10, citocina relacionada a um pior prognóstico (Arany *et al.*, 2002; Azar *et al.*, 2004; Alcocer-González *et al.*, 2006; Bais *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008).

3.9. Métodos Diagnósticos

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), testes para a identificação do HPV devem ser realizados apenas quando houver indícios de infecção por HPV de alto risco ou desenvolvimento de

alterações pré-cancerosas ou cancerosas, principalmente no contexto cervical.

Os testes normalmente utilizados para identificação do HPV baseiam-se na detecção de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) ou proteínas do capsídeo. A Captura Híbrida II para HPV (Digene) é um método que utiliza uma solução hibridizadora para verificar a existência de DNA de HPV de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68), sem identificar um único tipo específico. O material usado para a realização do teste pode ser proveniente de células cervicais esfoliadas colocadas em meio líquido ou fluido residual de espécimes de citologia à base de líquido (CDC, 2007).

A Captura Híbrida II é o único teste de rotina aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulamentador americano. Entretanto, existem outros métodos moleculares que podem ser utilizados para a detecção do HPV como o PCR e a hibridização *in situ*.

3.10. Tratamento

As terapias existentes para as infecções anogenitais causadas pelo HPV podem ser divididas nas seguintes categorias: ablação da lesão, agentes citotóxicos, terapia fotodinâmica e imunomoduladores (Stanley, 2003).

Os métodos ablativos para as verrugas genitais, como a crioterapia, terapia a laser e eletro-cirurgia, são muito efetivos em um curto prazo, mas as taxas de recorrência podem ser altas. As lesões de alto grau, principalmente da cérvix uterina, são tratadas com técnicas de extirpação. A escolha dessas técnicas em lesões de vulva é complicada, pois o tratamento freqüentemente causa mutilações e as recorrências são comuns (Stanley, 2003).

Muito utilizados no tratamento das verrugas genitais, os agentes citotóxicos são encontrados na forma de preparações tópicas e podem provocar efeitos locais adversos graves e altas taxas de recorrência. Entre elas estão a podofilina (10-25%) e os ácidos tricloroacético e bicloroacético (80-90%) (Greenfield *et al.*, 2001; CDC, 2006).

A terapia fotodinâmica tem mostrado uma eficácia variável no tratamento de verrugas genitais e lesões de colo e vulva provocadas pelo HPV (Wierrani *et al.*, 1999). A ação acontece com a ativação de um fotossintetizador que leva à liberação de oxigênio altamente reativo. Isso acarreta na destruição do tecido, que pode ativar o sistema imune do hospedeiro. Dois trabalhos avaliando a resposta das NIV a essa terapia mostraram respostas boas para as lesões de baixo grau e variáveis para as lesões de alto grau (Hillemanns *et al.*, 2000; Fehr *et al.*, 2001; Stanley, 2003).

Entre os imunomoduladores que vêm sendo estudados contra a infecção por HPV, o imiquimode 5% se destaca. De uso tópico, esse

medicamento atua na ativação de macrófagos e células dendríticas para a liberação de proteínas pró-inflamatórias (Slade, 1998). O imiquimode tem mostrado eficácia no tratamento de verrugas genitais e NIV (Beutner *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 2002; Stanley, 2003).

A escolha do tratamento deve levar em conta o tamanho, localização e morfologia das lesões, além da preferência do paciente e os efeitos adversos da terapia (CDC, 2006).

3.11. Vacinas

Atualmente existem dois tipos de vacinas profiláticas comercialmente disponíveis, baseadas nas VLP (*virus-like particles*). As VLP são formadas pela combinação de proteínas do capsídeo viral, L1 e L2, e resultam na formação de estruturas vazias, destituídas de DNA, semelhantes a um capsídeo e que induzem uma forte resposta humoral. Entre as vantagens do uso das VLP está a segurança delas não provocarem a infecção ou o desenvolvimento de neoplasias e o fato dessas partículas poderem ser produzidas em células de insetos, bactérias recombinantes e até fungos (Tewari e DiSaia, 2002; Lowy e Schiller, 2006; Derchain e Sarian, 2007).

Uma das vacinas possui VLP dos HPV 6, 11, 16 e 18 e a outra apenas dos HPV 16 e 18. Para a criação da vacina foram selecionados os tipo virais mais associados ao desenvolvimento do câncer de colo uterino,

que é um grande problema para a saúde pública. A vacina quadrivalente tem a vantagem de englobar também os tipos mais encontrados nas verrugas genitais, os HPV 6 e 11. A princípio, estimava-se que as vacinas deveriam cobrir cerca de 70% dos cânceres cervicais, mas com a descoberta da existência de uma proteção cruzada entre os HPV-16 e HPV-31, e os HPV-18 e HPV-45, a taxa de proteção pode chegar a 80%. (Zur Hausen, 2008).

Os dados relativos à eficácia das vacinas são muito positivos, após cinco anos de acompanhamento. As vacinas mostraram grande eficiência na prevenção de infecções causadas pelos tipos de HPV selecionados, em mulheres que não foram previamente expostas aos mesmos. A soro-conversão ocorreu em cerca de 100% dos indivíduos vacinados e os anticorpos costumam permanecer altos por mais de 6 anos (Harper *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2005)

As vacinas são indicadas para meninas e mulheres jovens de 9 a 25 anos, sem infecção prévia pelo vírus. Devem ser aplicadas em três doses intramusculares, sendo a segunda dose dada após um ou dois meses e a terceira, aplicada seis meses após a primeira injeção (Zur Hausen, 2008).

Métodos

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram utilizadas 60 biópsias de vulva remanescentes dos arquivos da seção de Anatomia Patológica do Laboratório Fleury e da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), obtidas no período de 2002 a 2006. Dentre essas biópsias, 49 possuíam resultado positivo para HPV (condiloma acuminado, NIV-I, NIV-II e NIV-III) e 11, com diagnóstico de vulvite crônica, não apresentavam o vírus. O diagnóstico foi feito através de avaliação anátomo-patológica, realizada após a vulvoscopia. As biópsias provenientes do Laboratório Fleury (n=32) possuíam, além do diagnóstico anátomo-patológico, a confirmação pela reação de Hibridização *in situ*.

As pacientes positivas para o HPV tinham idades entre 18 e 47 anos e as pacientes que não estavam infectadas pelo vírus tinham entre 22 e 49 anos. O critério de inclusão dos casos baseou-se na presença de material suficiente para a realização de todas as reações imuno-histoquímicas e a ausência de co-infecções. Os dados referentes à procedência e ao diagnóstico de cada caso estão nos quadros 1 e 2 dos anexos.

Como parâmetro para avaliação da morfologia e número de células de Langerhans, dendrócitos dérmicos FXIIIa+ e células S100 +, utilizou-se um

grupo controle de pele normal, proveniente de incisão de cirurgia cardíaca, previamente empregado em trabalhos do nosso grupo.

4.2. Métodos

A análise tecidual foi feita através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e o estudo das células dendríticas, citocinas e a molécula de adesão E-caderina, através do método imuno-histoquímico. Os dados referentes aos anticorpos utilizados estão na tabela 2.

Tabela 2 – Dados referentes aos anticorpos utilizados: código, fabricante e diluição.

Anticorpo	Código	Fabricante	Diluição
Anti-FXIIIa	PU337-UP	BioGenex	1 : 200
Anti-S100	Z311	Dako	1 : 1000
Anti-CD1a	MCA1657	Serotec	pronto para uso
Anti-TNF- α	IP-300	Genzyme	1 : 200
Anti-IFN- γ	IP-500	Genzyme	1 : 300
Anti-IL-10	MAB217	R&D System	1 : 10
Anti-E-caderina	NCL-E-CLA	Novocastra	1 : 50

4.2.1. Reação imuno-histoquímica

Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram obtidos em lâminas previamente passadas em solução de organo-silano (3-Aminopropyl trietoxy-

silane Sigma A3648 - Chemical co. St. Louis, MO/USA) e deixados em estufa a 56°C para melhor aderência. As lâminas foram imersas em xilol para desparafinização e hidratadas em uma seqüência decrescente, tendo álcool a 100% como início. Como próximo passo, as lâminas passaram por uma lavagem em água corrente e água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena ocorreu por meio três banhos de dez minutos cada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em câmara escura.

Em seguida foi feita a exposição de sítios antigênicos para as reações com Fator XIIIa, TNF- α , IFN- γ e IL-10, com solução de tripsina 20% (Sigma T-8253). Para a detecção de E-caderina, os cortes foram colocados em microondas por 20 minutos em solução de ácido cítrico pH 6,0. Para os anticorpos anti-S-100 e CD1a não foi necessária a exposição dos sítios antigênicos. Os cortes com os anticorpos primários foram incubados a 4°C “overnight”.

A próxima incubação foi feita com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de coelho por 30 minutos e com posterior utilização do sistema LSAB estreptavidina- peroxidase (K0690 Dako Cytomation – Carpinteria, CA/USA). A reação para detecção das moléculas de adesão E-caderina foi feita com o Sistema Envision (K1491 Dako). Ambos os sistemas foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

A revelação da reação foi feita com 3,3-diaminobenzidina (Sigma D5637) 0,03% em PBS adicionando-se 1,2 ml de peróxido de hidrogênio 3%.

A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harrys. As lâminas foram desidratadas e montadas com resina Permount (Fisher Scientific Co).

Para marcação das células CD1a+ foi utilizado o “KIT” CSA (Catalysed System Amplification – Dako K1500) que tem por objetivo uma amplificação da positividade, através da multiplicação das moléculas de biotina envolvidas na reação. O protocolo da reação foi feito de acordo com as especificações do fornecedor (Bobrow *et al.*, 1989).

Todas as lavagens das lâminas antes e após as incubações com os referidos anticorpos foram feitas com a solução de PBS pH 7,4.

4.2.2. Dupla marcação

Visando o estudo da interação dos dendrócitos dérmicos com o vírus HPV, foi realizada uma reação de dupla marcação utilizando a técnica de hibridização *in situ* para marcar o DNA do vírus e o método imunohistoquímico para a marcação dos DDFXIIIa+ em dez dos casos.

Primeiramente, as lâminas foram imersas em xilol em dois tempos de 15 minutos e em seguida foram passadas numa bateria de álcool (de 100 a 70%) para hidratação dos cortes. As lâminas foram lavadas em água destilada.

A recuperação antigênica foi feita em banho-maria a 96°C colocando-se as lâminas em uma solução de ácido cítrico pH 6,0 a 10%, por 40 minutos. Ao término, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente

por quinze minutos para resfriamento e lavadas em água destilada por três minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito por meio de quatro banhos de cinco minutos cada com água oxigenada 3%, seguido de nova lavagem com água destilada e imersão em leite desnatado a 6% por cinco minutos.

A incubação do material com a sonda para HPV de amplo espectro (Y 1404 Dako, que detecta os tipos de HPV 6,11,16,18,31,33, 35,45,51,52) foi feita em estufa a 95°C por cinco minutos. Após essa rápida incubação, as lâminas foram incubadas a 37°C “overnight”.

No dia seguinte, o material passou por três lavagens de três minutos em solução tampão (50mmol/L de TRIS pH 7,6; 0,3 mol/L de NaCl; e Tween 0,1%) e ficou em uma solução adstringente (1:50 de água destilada ou deionizada) por 30 minutos a 56°C.

Após três novas lavagens com a solução tampão, foi usado o sistema GenPoint (*Tyramide signal amplification system for biotinylated probes*, K0620 Dako). Como primeiro passo, foi colocada a estreptavidina primária, na diluição de 1:200, por trinta minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o material passou por nova lavagem e houve a aplicação do amplificador (biotinil tiramida) por 15 minutos em temperatura ambiente. Uma nova lavagem foi realizada e a estreptavidina secundária foi aplicada por mais 15 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram novamente colocadas em solução tampão.

Após a revelação da reação de hibridização *in situ* com 3'3 Diaminobenzidina e cloreto de níquel, foi iniciada a reação imuno-histoquímica nas mesmas lâminas, através da aplicação do anticorpo primário anti- Fator XIIIa na diluição de 1: 200. As lâminas com os cortes foram incubadas a 4°C “overnight”.

Na fase seguinte foi utilizado o sistema LSAB 2 (*Alkaline Phosphatase* – Dako K0676). Primeiramente foi aplicada a Imunoglobulina biotinizada anti-camundongo e anti- coelho por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por cinco minutos e posteriormente, foi adicionado o conjugado de estreptavidina e fosfatase alcalina aos cortes, permanecendo por 30 minutos à temperatura de 37°C.

A revelação ocorreu após nova lavagem com PBS, com a preparação do cromógeno feita a partir de 3 gotas de fucsina, 3 gotas de agente ativador de fucsina e adição do substrato para diluição (*Fuchsin Buffered Substrate*) até completar 2ml. Essa solução foi aplicada em todos os cortes e permaneceu por cinco minutos. Após a lavagem em água corrente por cerca de cinco minutos, as lâminas foram deixadas ao ar livre para secagem e por fim, foram montadas com glicerina.

Foram consideradas positivas para a dupla marcação as células coradas em vermelho e que possuíam material com coloração preta em seu interior.

Todas as reações foram seguidas com controles positivos para HPV e para cada uma das células a serem pesquisadas (dermatofibroma para FXIIIa, couro cabeludo para CD1a e S100).

4.3. Análise quantitativa

As células imuno-marcadas foram analisadas de forma quantitativa utilizando-se retículo graduado, que juntamente com a ocular de 10x e a objetiva com aumento de 40x, apresenta 0,25 mm de lado (0,0625 mm² de área).

A quantificação das células de Langerhans epiteliais foi realizada através da determinação da fração de área epitelial com a expressão positiva de antígeno CD1a. Com aumento de 400x, foi contado o número de pontos do retículo (cruzamento de duas retas) que incidiam sobre a imuno-marcação positiva e o número de pontos que coincidiam no epitélio, excluía a camada córnea. A fração de área epitelial foi obtida por meio da razão do número de pontos sobre a imuno-marcação e o número total de pontos sobre o epitélio (Bieber *et al.*, 1988).

Os dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos, células S-100 positivas, TNF- α , IFN- γ e IL-10 foram analisados quantitativamente com o auxílio do mesmo graticulo, tendo sido consideradas todas as células imuno-marcadas na lâmina própria, de forma que o graticulo foi utilizado como parâmetro de medida da área.

Para comparação numérica com tecido normal, utilizou-se dados referentes à contagem de células de Langerhans, dendrócitos dérmicos FXIIIa+ e células S100+ em pele normal, cujos resultados foram previamente descritos por nosso grupo (Pagliari e Sotto, 2003; Guedes *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos na quantificação de células CD1a, S-100, Fator XIIIa positivas, TNF- α , IFN- γ e IL-10 foram analisados estatisticamente pelo método não paramétrico Mann-Whitney, em que foi estabelecido o nível de significância em 95% ($p \leq 0,05$). A correlação entre os marcadores foi verificada pelo teste de Spearman. Para essa avaliação foi usado o programa de estatística “Graph Pad Prism” versão 3.00 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

A expressão de E-caderina foi analisada de forma qualitativa em todo o epitélio.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob os números 465/05 e 1075/06.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Análise histopatológica

Nas lesões vulvares de baixo grau o epitélio apresentava paraqueratose leve e acantose moderada associada a papilomatose. O terço inferior do epitélio exibia proliferação de queratinócitos com hipercromasia e irregularidades nucleares e perda de sua polaridade habitual. Na camada espinhosa alta foi observado regular número de queratinócitos coilocitóticos. O limite com o estroma estava conservado em todos os espécimes. Este era permeado por leve infiltrado inflamatório linfocitário perivascular superficial (Figura 2A).

As lesões de alto grau apresentaram proliferação de queratinócitos com franca atipia nuclear e perda subtotal ou total da polaridade habitual do epitélio. Raras células apoptóticas eram observadas na camada espinhosa superficial. O limite com o estroma estava preservado em todos os espécimes. Observou-se infiltrado inflamatório predominantemente perivascular, de leve a moderada intensidade no estroma (Figura 2B).

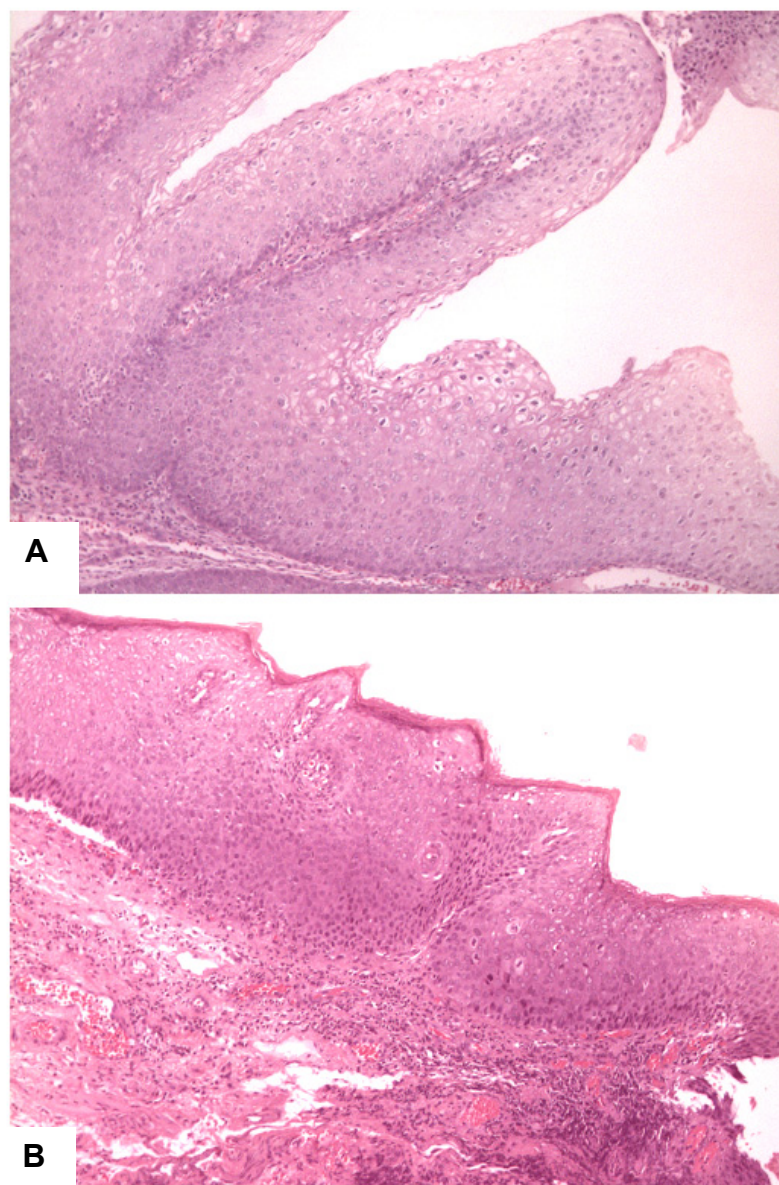


Figura 2 – Aspecto histológico de lesões de vulva induzidas pelo HPV. **A**, lesão de baixo grau – acantose associada a papilomatose proliferação de queratinócitos atípicos e perda da polaridade do terço inferior do epitélio. Notar regular número de queratinócitos apoptóticos na camada espinhosa superior. **B**, lesão de alto grau com proliferação de queratinócitos atípicos e perda subtotal da polaridade habitual do epitélio; Raros queratinócitos apoptóticos na camada espinhosa alta. Limite estroma-epitelial conservado e leve infiltrado inflamatório linfo-histiocitário papilar. Hematoxilina-eosina (100x).

5.2. Método Imuno-histoquímico

5.2.1. Expressão e quantificação de células dendríticas

As células de Langerhans, detectadas através do anticorpo anti-CD1a, estavam distribuídas em todo o epitélio, sobretudo nas camadas suprabasal e espinhosa (Figura 3). O número dessas células não diferiu entre os grupos de lesões, mas elas estavam em quantidade reduzida e apresentavam dendritos menores quando comparadas à pele normal ($p < 0.0001$) (Gráfico 1).

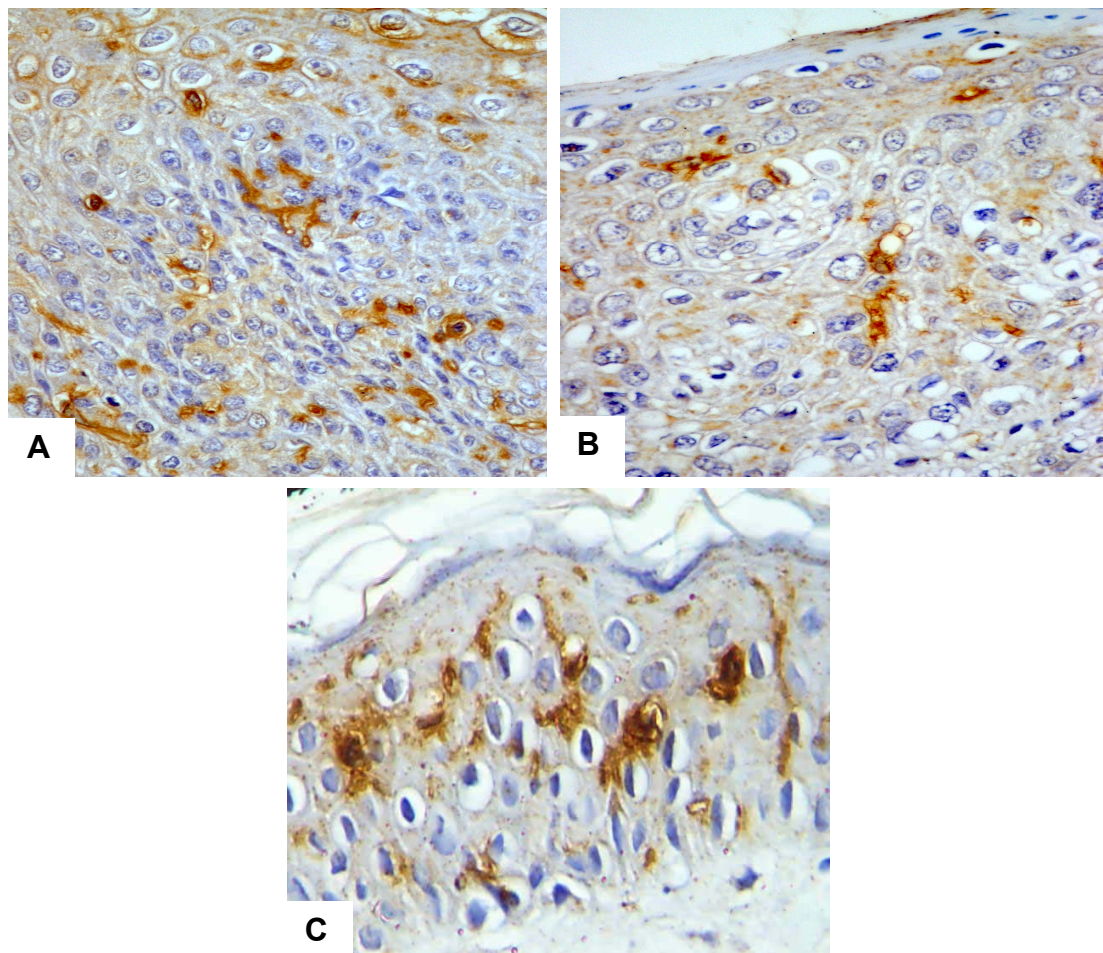
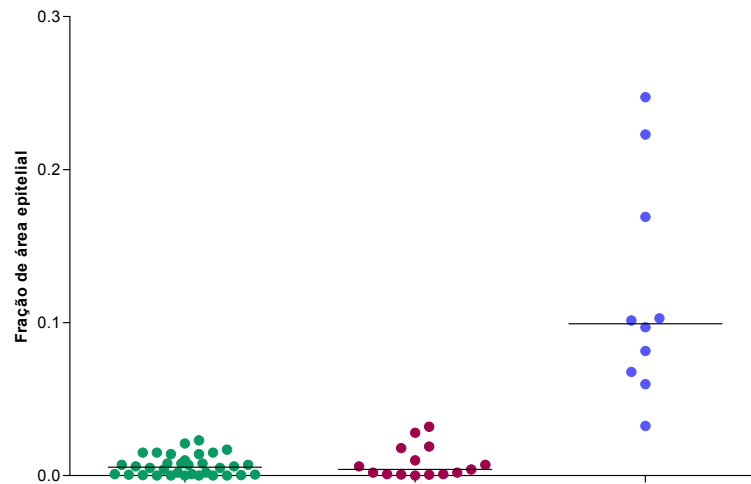


Figura 3 - Células de Langerhans (CD1a+) no epitélio de lesões vulvares induzidas pelo HPV. **A**, lesão de baixo grau. **B**, lesão de alto grau. **C**, pele normal (SABC, 400x).

Gráfico 1 - Quantificação de células de Langerhans (CD1a+) em lesões de baixo (●) e alto grau (●) induzidas pelo HPV e na pele normal (●).



As células positivas para as proteínas S-100 ou FXIIIa estavam localizadas em toda a extensão do estroma (Figuras 4 e 5). Não houve diferença estatística significativa entre as lesões de baixo e alto grau tanto para as células S-100+ ($p = 0,0515$) como para os DDFXIIIa+ ($p = 0.2286$).

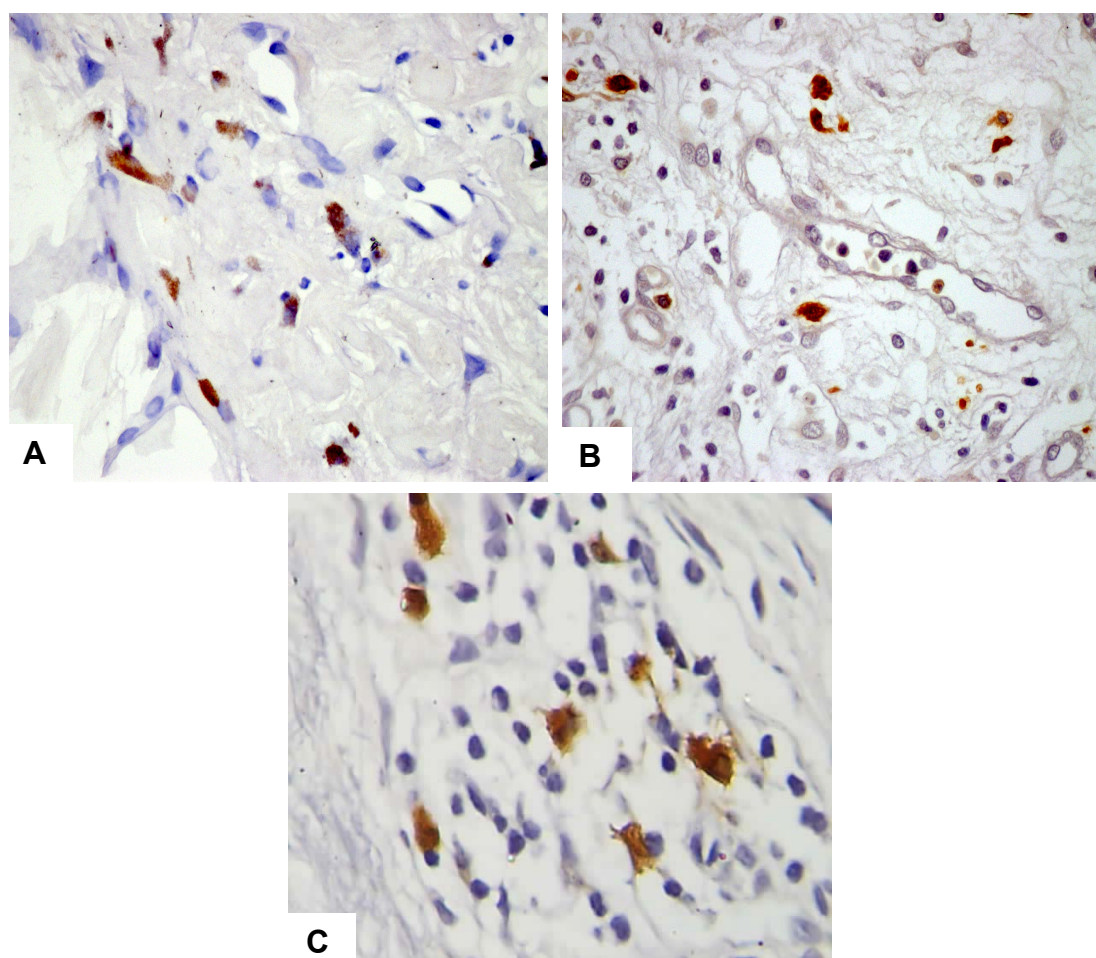


Figura 4 - Células S-100+ em lesões vulvares induzidas pelo HPV e pele normal. **A**, lesão de baixo grau. **B**, lesão de alto grau. **C**, pele normal (SABC, 400x).

Embora os DDFXIIIa+ estivessem aumentados em tamanho nas lesões de vulva, seu número não diferiu ao observado na pele normal. Da mesma forma, não se observou diferenças numéricas na população de células S-100+ quando se comparou os grupos de lesões de alto grau e pele normal ($p = 0.064$), e lesões de baixo grau e pele normal ($p = 0.057$).

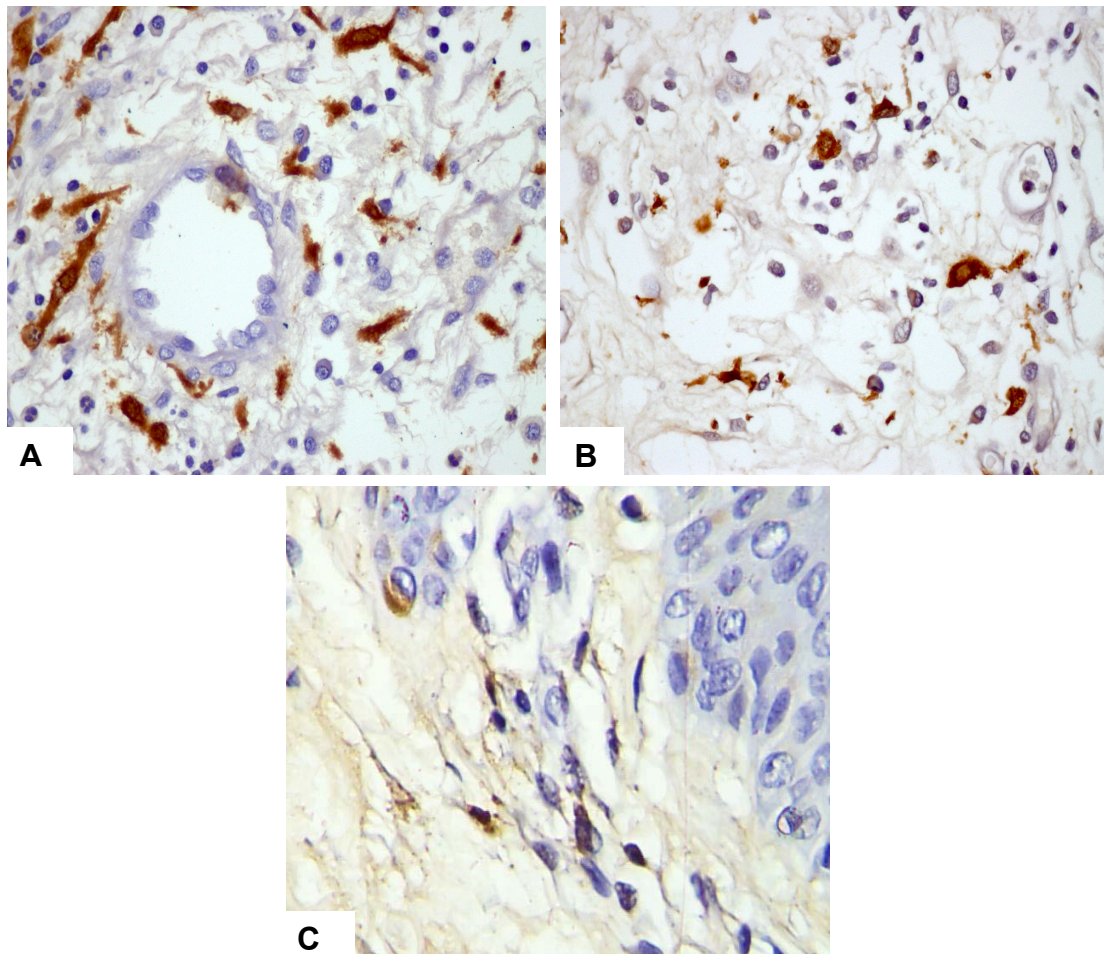


Figura 5 - Dendrócitos dérmicos FXIIIa+ no estroma de lesões vulvares induzidas pelo HPV e pele normal. **A**, lesão de baixo grau. **B**, lesão de alto grau. **C**, pele normal (SABC, 400x).

Quando as populações de células S-100+ e DDFXIIIa+ foram comparadas, foi possível detectar um número maior de DDFXIIIa+ sobre as células S-100+ tanto no grupo de lesões de baixo grau ($p = 0,0008$) como no de alto grau ($p = 0,0031$). Os dados referentes à quantificação das populações celulares e análise estatística estão expressos na tabela 3 e gráfico 2.

Gráfico 2- Quantificação de células S-100+ e DDFXIIIa+ em lesões de baixo (●,■) e alto grau (●,■) induzidas pelo HPV e na pele normal (●,■).

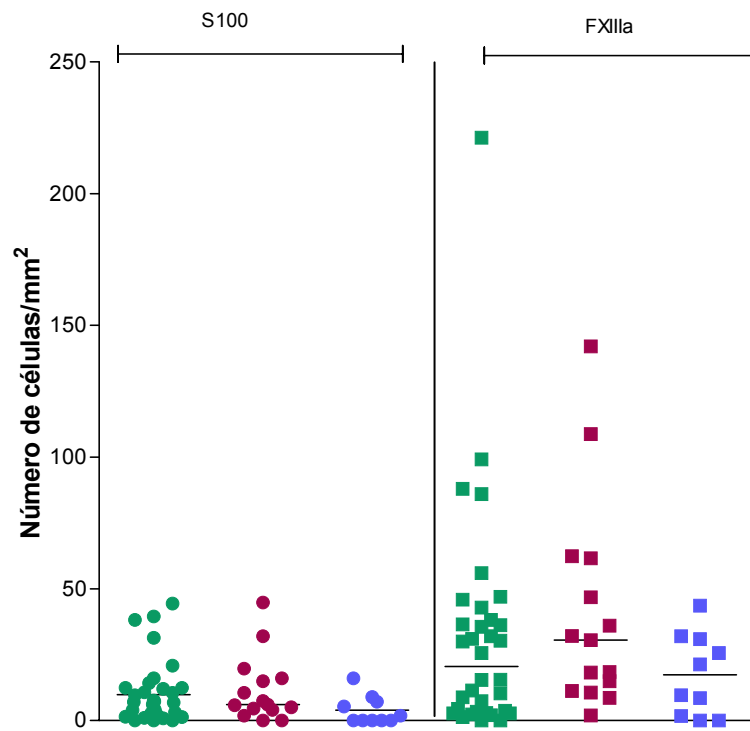


Tabela 3 - Dados referentes à análise estatística das contagens de células CD1a+, S-100+ e FXIIa+. Valores expressando a média \pm desvio padrão, variância e mediana, respectivamente. Teste Mann-Whitney.

	CD1a+	S100+	FXIIa+
Baixo grau	0,0065 \pm 0,00662	9,87 \pm 11,88	31,66 \pm 42,61
	0 – 0,0230	0 – 44,44	0 - 221,30
	0,0055	6,50	20,58
Alto grau	0,0087 \pm 0,0105	11,53 \pm 12,57	40,29 \pm 39,64
	0,0001 – 0,0320	0 – 44,80	1,9 – 142,0
	0,0040	6,09	30,55
Pele normal	0,1182 \pm 0,0714	3,910 \pm 5,417	17,34 \pm 15,46
	0,0325 - 0,2474	0 – 16	0 – 43,60
	0,0992	0,90	15,47

5.2.2. Expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10

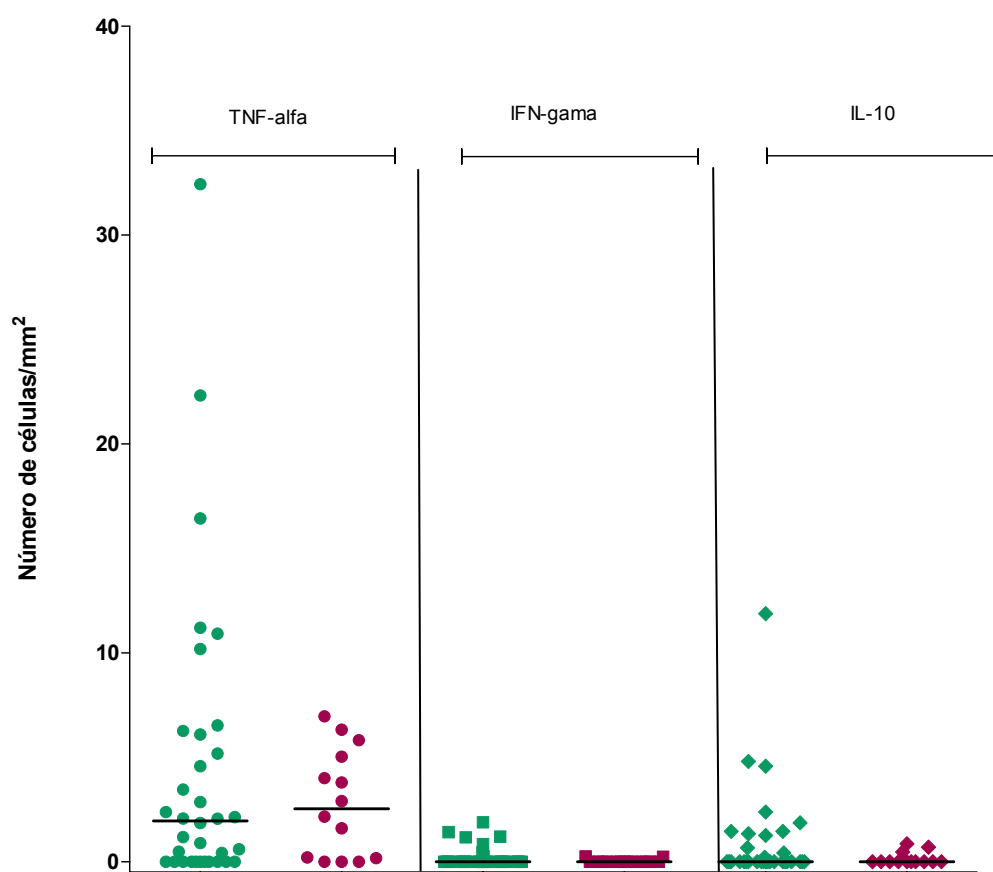
As citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 estudadas no estroma foram detectadas, com frequência, em pequenas quantidades nos grupos de lesões (Figura 6). Não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de lesões ($p = 0,8557$, $p = 0,5704$ e $p = 0,3730$

respectivamente). Os dados referentes à análise quantitativa das células com expressão de citocinas estão na tabela 4 e gráfico 3.

Tabela 4- Dados referentes à análise estatística das contagens de células expressando as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10. Valores expressando a média \pm desvio padrão, variância e mediana, respectivamente. Teste Mann-Whitney, $p > 0,05$.

	TNF- α	IFN- γ	IL-10
Baixo grau	4.48 \pm 7.17	0,21 \pm 0,48	0,95 \pm 2,28
	0 – 32,44	0 – 1,88	0 – 11,87
	1,95	0	0
Alto grau	2,78 \pm 2,56	0,03 \pm 0,09	0,15 \pm 0,31
	0 – 6,96	0 – 0,25	0 – 0,86
	2,53	0	0

Gráfico 3 - Quantificação da expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em lesões de baixo ($\bullet, \blacksquare, \blacklozenge$) e alto grau ($\bullet, \blacksquare, \blacklozenge$) induzidas pelo HPV.



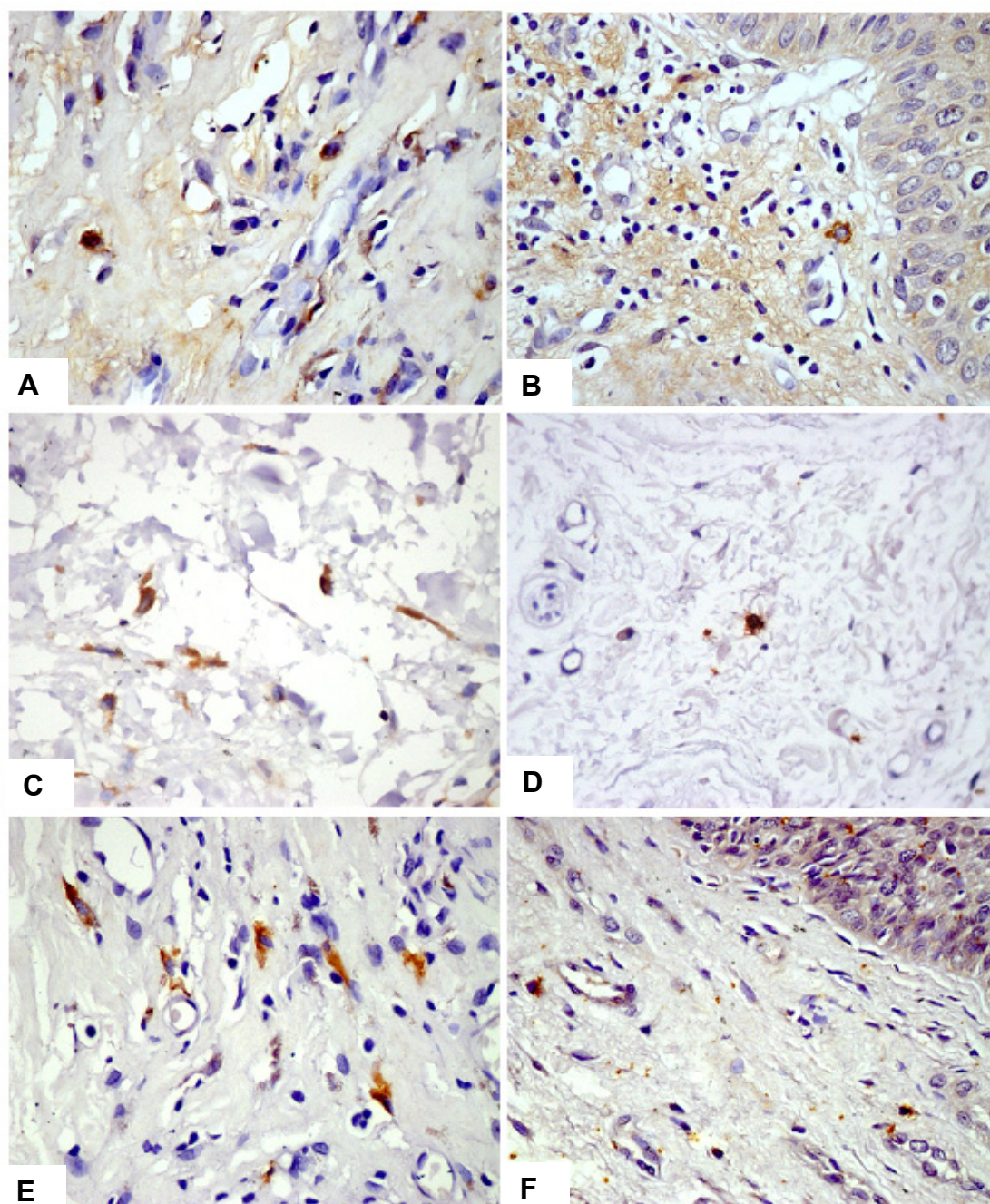


Figure 6- Imuno-marcações mostrando expressão de citocinas em lesões vulvares induzidas pelo HPV. Células com expressão de TNF- α (A e B); células com a expressão de IFN- γ (C e D); e células com expressão de IL-10 (E e F). A, C e E, lesões de baixo grau e B, D e F, lesões de alto grau(SABC, 400x).

Foi possível observar uma correlação entre o número de DDFXIIIa+ e de células com expressão de TNF- α em lesões de baixo grau ($r = 0.5741$) e alto grau ($r = 0.4967$) (tabela 5).

Tabela 5 - Correlação entre os DDFXIIIa+ e a citocina TNF- α em lesões vulvares de baixo e alto grau induzidas pelo HPV .

FXIIIa / TNF- α	r de Spearman	Intervalo de confiança (>95%)
Baixo grau	0,5741	0,2831 a 0,7683
Alto grau	0,4967	-0,0635 a 0,8189

5.2.3. Expressão de E-caderina

Para a análise da expressão de e-caderina, o grupo de vulvites crônicas inespecíficas foi utilizado como controle. Em 91.0% das vulvites crônicas inespecíficas foi observado um padrão homogêneo e difuso da expressão de e-caderina na camada espinhosa baixa e média. Ambos os grupos de lesões HPV+ exibiram padrões semelhantes de expressão de e-caderina. Os espécimes mostraram marcação difusa ou focal de e-caderina na camada espinhosa baixa e média em 61% e 39% dos casos, respectivamente. É importante ressaltar que todos os casos positivos para a

infecção por HPV apresentaram ausência de imuno-reatividade nas áreas de displasias (Figura 7).

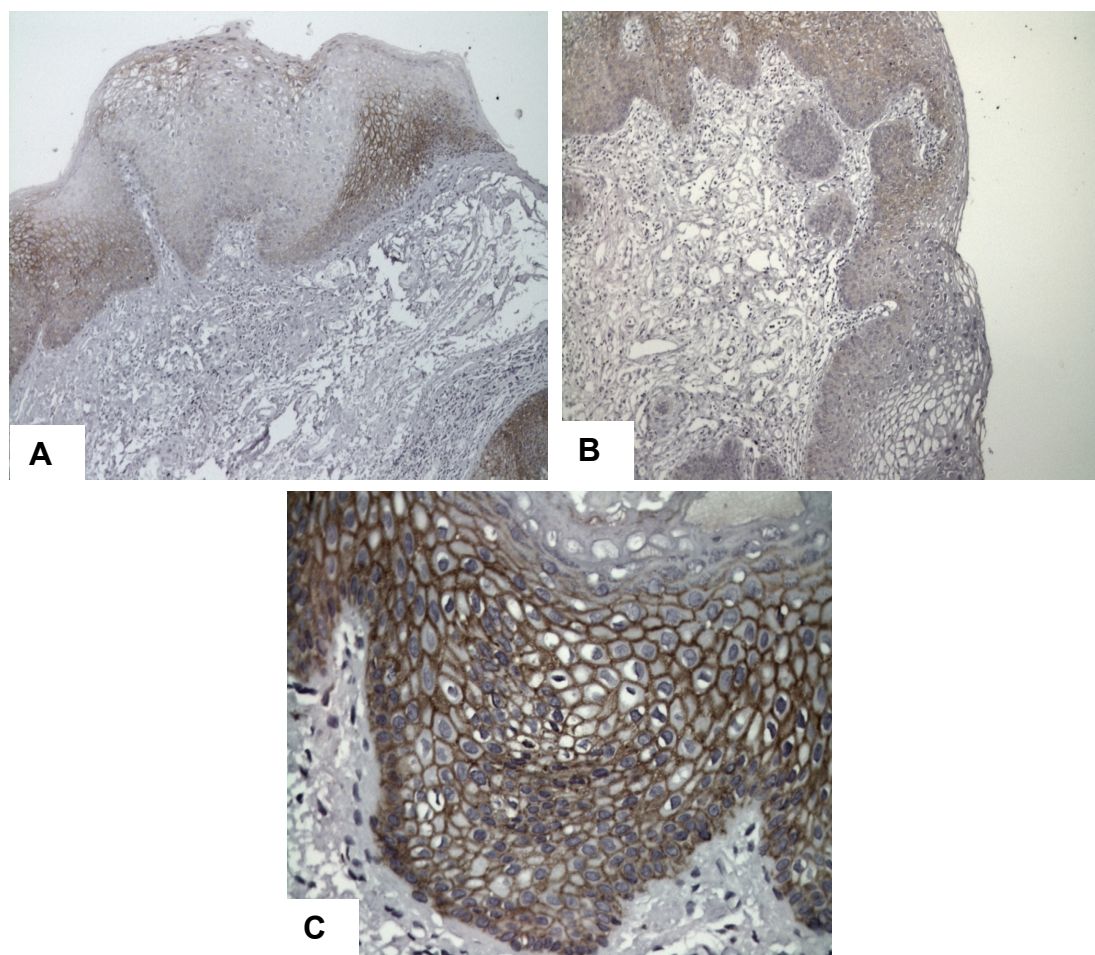


Figura 7- Imuno-marcações mostrando a expressão de E-caderina no epitélio de lesões vulvares induzidas pelo HPV e vulvites crônicas inespecíficas. **A**, lesão de baixo grau. **B**, lesão de alto grau. **C**, vulvite crônica inespecífica (SABC, 40x [A e B] e 200x [C]).

5.3. Dupla marcação

Como resultado da reação de dupla marcação, feita através da utilização da hibridização *in situ* para detecção do DNA do HPV e imunohistoquímica para dendrócitos dérmicos FXIIIa+, foi possível identificar antígenos virais no citoplasma dessas células (Figura 8).

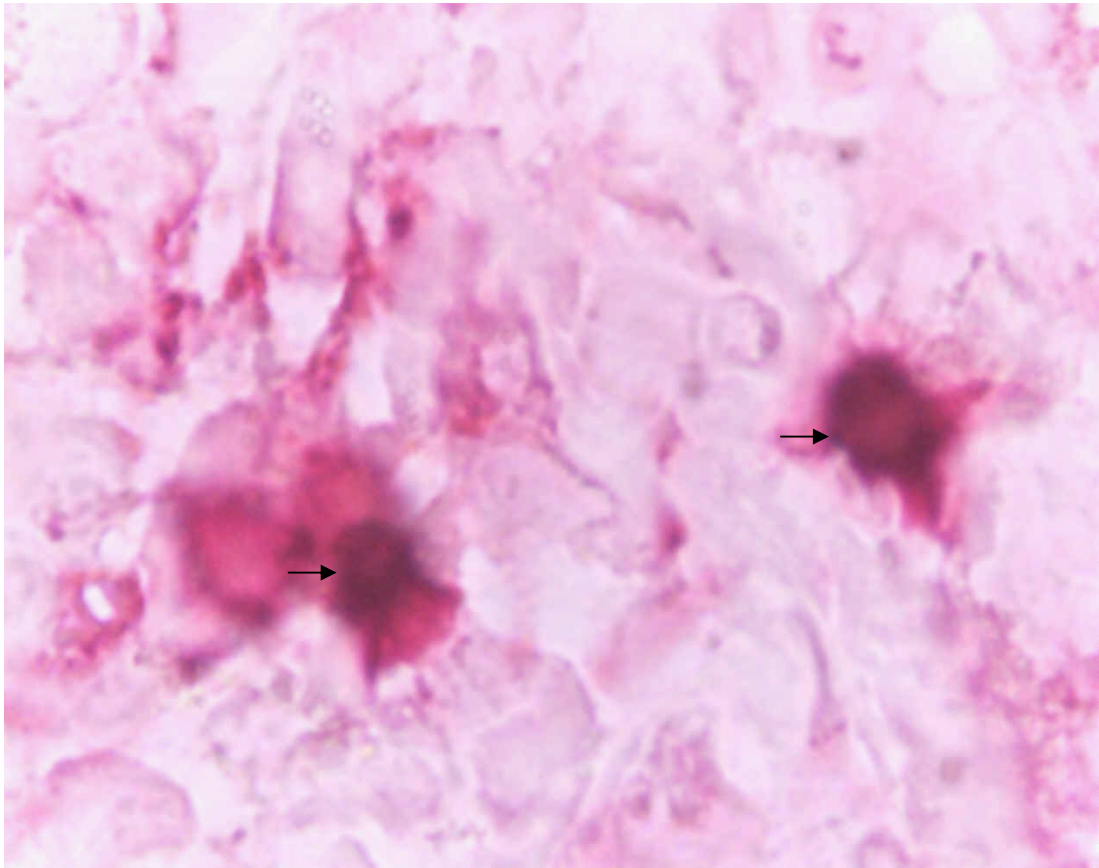


Figura 8 – Lesão vulvar com HPV. Co-localização do DNA viral no citoplasma dos DDFXIIIa+. Hibridização *in situ* para o HPV com DAB e cloreto de níquel (→) e imunohistoquímica para DDFXIIIa+ com método estreptavidina-fostatase alcalina e fucsina (vermelho) (1000x).

Discussão

6. DISCUSSÃO

A infecção genital pelo papilomavirus humano é a doença sexualmente transmissível mais comumente diagnosticada entre as doenças desse grupo (CDC, 2008). A infecção por este vírus pode estar associada ao desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e de câncer, principalmente no colo uterino, local onde o HPV é responsável por cerca de 100% das transformações malignas. Assim sendo, a infecção pelo HPV é vista como um problema de saúde pública, devido à sua distribuição mundial e ao grande gasto proporcionado aos sistemas de saúde para o tratamento das lesões e cânceres (WHO, 2007).

Apesar de o HPV não ser o causador de todos os cânceres vulvo-vaginais, cerca de 40% das neoplasias dessa região do trato genital da mulher estão associados a esse agente viral. Isso mostra a importância do estudo da infecção nessa região, adicionando-se o fato de que pouco se sabe sobre a patogênese das lesões vulvares (Parkin e Bray, 2006).

As taxas de incidência das neoplasias intraepiteliais vulvares (NIV) têm aumentado bastante em todo o mundo, principalmente em jovens e parece ter uma associação com a infecção pelo HPV (Joura, 2002; Sturgeon et al., 1992; Paavonen, 2007).

Entretanto, na maioria das vezes a infecção é assintomática ou há somente o desenvolvimento de verrugas genitais (Greer et al., 1995; WHO, 2007).

A análise histopatológica de nossa casuística mostrou que todos os espécimes analisados apresentaram alterações teciduais características da infecção pelo HPV. No grupo de lesões de baixo grau, formado por condilomas acuminados e NIV-I, as alterações histopatológicas compreenderam hiperqueratose, paraqueratose e acantose associada a papilomatose do epitélio, com graus variáveis de atipias dos queratinócitos acompanhados de perda da polaridade habitual do crescimento epitelial que, quando presente, ocorria somente até o seu terço médio. A coilocitose foi observada nas camadas espinhosa superior e granulosa do epitélio. As lesões de alto grau (NIV-II e III) apresentaram características semelhantes, porém mais intensas, relativas à diferenciação celular e à perda total ou subtotal da polaridade do crescimento epitelial. Essas alterações estão de acordo com o que foi estabelecido pela ISSVD (Sideri et al., 2005).

Embora a hibridização *in situ* para sequências de HPV de alto e baixo risco não tenha sido realizada para a identificação do DNA viral em todos os casos incluídos no estudo, todos os espécimes mostravam alterações histopatológicas características do efeito citopático viral desencadeado pelo HPV.

A técnica de imuno-histoquímica é comumente utilizada para o diagnóstico de agentes infecciosos, caracterização de células da resposta tecidual e expressão de citocinas no tecido a ser estudado. Esse método também pode ser aplicado para análises quantitativas ou semi-quantitativas, que buscam verificar a intensidade de antígeno presente na amostra ou o padrão de resposta imune desenvolvido (Alves e Roman, 2005).

Os anticorpos usados para a realização deste trabalho foram previamente testados e sua especificidade comprovada pela utilização de controles positivos.

A pele normal foi utilizada na busca de um parâmetro de normalidade para a avaliação da densidade das células de Langerhans (CD1a+), S-100+ e FXIIIa+. Embora possa haver diferenças entre a pele não genital e semimucosa proveniente da vulva, por motivos éticos não foi possível obter tecido normal de vulva para compor o grupo controle. A população de CL não difere nas diferentes regiões cutâneas, com exceção das regiões palmar e plantar (Ashworth et al, 1986; Taweechaisupapong et al, 1996). Foi demonstrado também não haver diferenças na densidade de CL da pele de homens e de mulheres (Berman et al, 1983). O grupo controle de nosso estudo era composto por espécimes de pele do tronco e membro inferior.

Células dendríticas

As células de Langerhans são as células apresentadoras de antígenos mais importantes da epiderme ou epitélio. Elas são responsáveis pelo transporte de antígenos para os linfonodos, que promove a migração de células T ativadas para o local de infecção na pele. Embora as CL epiteliais possam ser identificadas com o método imuno-histoquímico através da expressão da proteína S-100, o marcador CD1a foi escolhido para este estudo, visando uma maior especificidade (Sanclemente e Gill, 2002; Taube et al., 2006).

Embora a densidade de CL não tenha diferido entre as lesões vulvares de baixo e alto grau, observamos uma menor população dessas células no epitélio das lesões vulvares relacionadas ao HPV quando comparadas à pele normal controle.

A densidade das CL no epitélio vulvar normal é maior quando comparada à cérvix e à vagina, entretanto a presença de um agente infeccioso como o HPV altera esse valor (Edwards e Morris, 1985).

Os trabalhos da literatura que abordam a população de CL nas lesões genitais induzidas pelo HPV são conflitantes. Ora essas células estão aumentadas em número – como nas neoplasias cervicais (Caorsi e Figueroa, 1986) para onde migrariam a partir de tecido normal adjacente para provável contenção do processo neoplásico (Campaner et al, 2006), ora estariam diminuídas em número, o que se relacionaria a uma falha na resposta imune nas verrugas genitais (Sanclemente, 1999)

Esses dados conflitantes poderiam ser devido ao uso de diferentes marcadores para a identificação das CL. Os trabalhos que realizaram sua identificação pela proteína S100 demonstraram haver uma diminuição de sua densidade e que, com o uso do marcador CD1a não se verifica haver menor número de CL, identificadas por esse marcador mais específico (Tay et al., 1987; Connor et al., 1999).

Em nosso trabalho as CL epiteliais foram identificadas e quantificadas pela marcação com o anticorpo CD1a e observamos menor densidade de CL em ambos os grupos de lesões vulvares quando comparados à pele normal controle. Esses dados estão de acordo com os de Giannini et al. (2002) para

as lesões de HPV do colo uterino e os de Taube e colaboradores (2006) que estudaram lesões vulvares relacionadas ao HPV e co-infecção pelo HIV. Nas lesões vulvares de alto grau foi também demonstrado menor número de CL identificadas pela marcação com CD1a e CD207 (Langherina), ambos marcadores específicos para essa população celular (Van Seters et al., 2008).

A menor densidade de CL nas lesões vulvares relacionadas à infecção pelo HPV seriam consequência de sua migração para o estroma por influência de citocinas liberadas “in situ” (Van Seters et al., 2008). Existem dados da literatura que relacionam essa diminuição das CL ao tabagismo (Nadais et al., 2006). No grupo por nós estudado não tivemos acesso aos antecedentes das pacientes quanto a esse hábito.

Poderíamos explicar a menor densidade de CL epiteliais, nas lesões vulvares de baixo e alto grau, devido a sua migração para o estroma, como o proposto por Van Seters et al (2008), por prováveis alterações fenotípicas com consequente não identificação pelo anticorpo anti-CD1a, ou por sua inibição direta pela presença do HPV, independente do tipo viral presente, se de baixo ou alto risco. A diferença no grau histológico da lesão vulvar

A diferença no grau de lesão não parece estar relacionada a uma vigilância imune inadequada das CL, considerando-se que não houve diferença numérica dessas células entre as lesões de alto e baixo grau.

Como as células de Langerhans epiteliais já haviam sido identificadas através do marcador CD1a, a proteína S-100 foi utilizada para marcar outras células apresentadoras de antígeno do estroma vulvar. Isso está baseado no

fato de que as células S-100 positivas tem morfologia semelhante às CL (Cocchia et al., 1981; Haimoto et al., 1987; Mc Nutt, 1998).

Em nosso trabalho não observamos diferenças na densidade de células S-100+ no estroma vulvar entre os dois grupos de lesão estudados. Quando as lesões de baixo e alto grau foram comparadas com a pele normal, também não foram observadas diferenças expressivas quanto ao número de células S100+. Os dados disponíveis na literatura discutem a quantificação das células S100+ na infecção pelo HPV somente no âmbito epitelial. Os nossos resultados não nos permitem concluir que as células S100+ do estroma tenham papel importante na patogenia da infecção pelo HPV na vulva.

A análise da população de DDFXIIIa+ não demonstrou diferenças entre os grupos de lesão vulvar (baixo e alto grau), assim como quando comparados ao controle de pele normal. Entretanto, os DDFXIIIa+ mostraram-se hipertróficos, com dendritos proeminentes nos dois grupos de lesão pelo HPV.

Encontramos apenas dois trabalhos que descrevem um aumento de DDFXIIIa+ em lesões cervicais e anogenitais relacionadas ao HPV (Al-Saleh et al., 1995; Arrese et al., 2001). Além do presente trabalho, não é de nosso conhecimento que existam outros estudos dos DDFXIIIa+ em lesões de vulva induzidas pelo HPV.

Embora não tenhamos encontrado diferenças na ensidade dos DDFXIIIa+ nas lesões vulvares relacionadas ao HPV, demonstramos que essas células interagem com o vírus. A utilização da reação de hibridização

in situ combinada ao método imuno-histoquímico permitiu a visualização do DNA do HPV no interior dos DDFXIIIa+ (Pereira et al., 2008). A interação de DDFXIIIa+ com outros agentes infecciosos foi anteriormente demonstrada (Pagliari e Sotto, 2002; Sotto et al., 2004; Guedes et al., 2008), entretanto, não é do nosso conhecimento a existência de trabalhos anteriores que tenham demonstrado sua interação com o HPV.

Um achado interessante foi a detecção de um número maior de DDFXIIIa+ em comparação às células S-100+, tanto nas lesões de baixo quanto de alto grau. Uma vez que as células S100+ não diferiram numericamente do grupo controle, o maior número dos DDFXIIIa+ em relação ao daquelas células poderia representar um mecanismo local “compensatório” para desencadear a resposta imune contra o HPV.

Através dos resultados obtidos nesse trabalho podemos inferir que os DDFXIIIa+ participam da resposta imune frente ao HPV. Os seus aspectos morfológicos que sugerem sua ativação, bem como detecção do DNA viral em seu interior nos permitem sugerir seu papel como células apresentadoras de antígenos nas lesões vulvares relacionadas ao HPV.

Expressão de citocinas

O TNF- α foi a citocina mais expressa nos grupos de lesões vulvares predominando sobre a expressão de IFN- γ e IL-10.

O HPV interfere na expressão de citocinas o que pode influenciar na função de células de Langerhans e outras células dendríticas (Woodworth e Simpson, 1993; Ronco et al., 1998).

O TNF- α é um fator que estimula a migração de células de Langerhans do epitélio, através da diminuição da expressão de E-caderina por esse componente celular (Jakob e Udey, 1998). O TNF- α é sintetizado por monócitos/macrófagos, dendrócitos e linfócitos T dos sítios de lesão (Nestle et al., 1994).

Na infecção pelo HPV ocorre diminuição na síntese de TNF- α , associada com a diminuição na expressão da molécula co-estimulatória B7.1. Essas alterações resultam na diminuição da capacidade das células de Langerhans em apresentar antígenos (Frazer e Tindle, 1992).

Como anteriormente relatado, evidenciamos nesse trabalho uma diminuição na quantidade de células de Langerhans nas lesões vulvares de HPV com relação à pele normal. Essas células, além de diminuídas em densidade poderiam ter sua função alterada sob influência do vírus (Frazer e Tindle, 1992).

A interação do HPV com os DDFXIIIa+, evidenciada pela reação de dupla marcação, pode representar um estímulo para que tais células produzam TNF- α , considerando-se sua capacidade em produzir essa citocina (Nestle et al., 1994)

Em nossa casuística não foram detectadas diferenças significativas no número de células com expressão de TNF- α , IFN- γ e IL-10 entre os grupos de lesão (baixo e alto grau).

O IFN- γ é produzido por linfócitos T ativados e células NK. Essa citocina induz a expressão de MHC-II nos queratinócitos e macrófagos, permitindo a tais células atuarem como apresentadoras de antígenos e

subseqüente ativação da resposta imune antiviral. Sendo pertencente ao padrão Th1 de citocinas, atua em conjunto com o TNF-alfa na regressão de lesões pelo HPV (Woodworth et al., 1992, Wu e Kurman, 1997).

A IL-10 está relacionada com a perda da função de células de Langerhans e indução de apoptose (Ludewig et al., 1995).

As citocinas Th2 são consideradas responsáveis por uma resposta imune celular deficiente contra o HPV e indutoras da resposta imune humoral contra o vírus. A polarização da resposta imune para o predomínio de citocinas de padrão Th2 está relacionada com lesões de alto grau mediadas pelo HPV (Scott et al, 1999, Sharma et al, 2007). A infecção viral causa uma disfunção imune local, com diminuição de células intraepiteliais apresentadoras de antígenos e de linfócitos T (McArdle e Muller, 1986; Tay et al., 1987). Isso se traduz na interferência do HPV nos mecanismos de vigilância local, tanto na fase de indução (apresentação de antígenos) como na fase efetora (geração de células T e células produtoras de anticorpos).

O desenvolvimento de lesões intraepiteliais e câncer cervical é associado preferencialmente a citocinas Th2 (IL-4 e IL-6) e/ou imunomoduladoras (IL-10). Desta forma, a atividade funcional das células de Langerhans é alterada, com conseqüente diminuição em sua densidade (Giannini et al., 2002). As lesões de alto risco, como NIC III apresentam predomínio de IL-10 e as de baixo risco estão associadas a citocinas de perfil Th1 (Bais et al., 2007).

A capacidade do HPV de desenvolver mecanismos de evasão tem sido explorada. A resposta mediada por linfócitos T parece não ser eficiente

para a eliminação do vírus, o que refletiria algum mecanismo de escape do agente infeccioso (Rudolf et al., 2000; Garrido et al., 2000). Os queratinócitos infectados pelo HPV poderiam produzir IL-4 e IL-10, configurando um mecanismo de evasão contra a resposta mediada por células T (Kim et al., 1995).

Embora nas lesões cervicais induzidas pelo HPV a sua correlação com o perfil de citocinas pareça estar bem estabelecida, a vulva teria resposta imune *in situ* diferente, pois não observamos diferenças na expressão de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ) ou imunomoduladora (IL-10) nas lesões de baixo e alto grau.

Expressão de E-caderina

A expressão de E-caderina foi semelhante nos dois grupos de lesões vulvares relacionados ao HPV – baixo e alto grau. A expressão de E-caderina apresentou-se com padrão difuso ou focal na camada espinhosa baixa e média e esteve ausente nas áreas de displasia de qualquer intensidade.

A molécula de adesão intercelular E-caderina é participante importante da interação entre os queratinócitos e as células de Langerhans e atua na permanência das CL no epitélio escamoso (Tang et al., 1993). Para que o equilíbrio na migração das CD/CL seja mantido é necessária a expressão intraepitelial de E-caderina, que é dependente do estado de diferenciação dos queratinócitos. Esse processo de diferenciação sofre

alteração na carcinogênese pelo HPV (Smedts et al., 1992; Smedts et al., 1993). A expressão de E-caderina é também parâmetro para avaliar a diferenciação tumoral (Takeichi, 1993; Inoue et al., 1992; Sakuragi et al., 1994; Veath et al., 1994; Vessey et al., 1995; Shiozaki et al., 1996; Wu et al., 2000; Carico et al., 2001).

Como acima referido, não encontramos diferenças na expressão de E-caderina de acordo com o grau de displasia epitelial nas lesões vulvares de HPV que estudamos. Nas lesões intraepiteliais e invasivas do colo uterino relacionada à infecção pelo HPV ocorre diminuição de expressão da E-caderina de acordo com a gravidade do processo (Carico et al., 2001). A diminuição da população de CL também acompanha a menor expressão de E-caderina nas lesões cervicais (Hubert et al., 2005).

O HPV exerce influência na expressão de E-caderina pois nas vulvites crônicas inespecíficas ocorre expressão habitual dessa molécula de adesão e nas lesões vulvares relacionadas ao HPV sua expressão está diminuída ou ausente nos focos de displasia epitelial. Na cérvix uterina, a oncoproteína E6 do HPV inibe diretamente a expressão dessa molécula de adesão nos queratinócitos (Mathews et al., 2003).

Embora em nossa casuística não tenhamos realizado a tipagem do HPV, se de baixo ou alto risco para carcinomas nas lesões, pudemos demonstrar haver ausência de expressão de E-caderina nos focos de displasia epitelial dos dois grupos (baixo e alto grau histológico).

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que nas lesões vulvares ocasionadas pela infecção pelo HPV, independentemente da intensidade do grau de alteração epitelial, ocorrem alterações nos elementos da imunidade inata – representados pelas células de Langerhans, que têm morfologia alterada e densidade diminuída no epitélio alterado. O vírus interage com os DDXIIIa+, que são células com capacidade de apresentação antigênica, participantes da resposta imune *in situ* e produtoras de TNF- α . O vírus altera o epitélio vulvar, interferindo no processo de diferenciação celular, o que se traduz pela diminuição da expressão da molécula de adesão E-caderina nos focos de displasia epitelial, independente de seu grau de intensidade.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A avaliação da densidade de populações de células dendríticas e células com expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 e da molécula de adesão E-caderina em lesões vulvares de baixo e alto grau induzidas pelo HPV nos permitiram as seguintes conclusões:

- ❖ O vírus interfere na expressão das células de Langerhans, pois estas estão diminuídas e possuem morfologia alterada nas lesões de baixo e alto grau em relação à pele normal, apesar de não haver diferenças entre as lesões de baixo e alto grau;
- ❖ Os DDFXIIIa⁺ apresentam-se aumentados em número sobre as células S-100⁺, o que poderia refletir um importante mecanismo local auxiliar de apresentação de antígenos na infecção pelo HPV;
- ❖ As lesões de baixo e alto grau induzidas pelo HPV não apresentam diferenças significativas quanto à densidade de células expressando as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10;
- ❖ As células com expressão de TNF- α predominam entre as três citocinas e há uma correlação positiva entre os DDFXIIIa⁺ e a expressão de TNF- α , o que poderia ser explicado por sua capacidade em produzir tal citocina a partir de um provável estímulo desencadeado pelo HPV;

- ❖ O HPV parece influenciar na expressão da molécula de adesão E-caderina na vulva, tendo-se em vista que o padrão difuso encontrado no grupo das vulvites crônicas inespecíficas diferiu do padrão focal observado nas lesões induzidas pelo vírus, com destaque para a ausência de expressão nas áreas de displasia;
- ❖ O DNA do HPV encontrado no interior dos DDFXIIIa+ aliado às alterações na morfologia celular, o predomínio desta população celular sobre as células S-100+ e a relação encontrada com a citocina TNF- α , indicam que os DDFXIIIa+ têm um papel importante como células apresentadoras de antígeno frente à infecção promovida pelo HPV.

Anexos

8. ANEXOS

Quadro 1 - Identificação de biópsias de vulvite inespecífica: procedência e diagnóstico.

Nº da Biópsia	Procedência	Diagnóstico
1272-04	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
7336-04	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
39619-04	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
37934-03	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
7659-04	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
2813-04	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
40833-03	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
41993-03	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
7598-04	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
40547-03	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica
30166-03	Laboratório Fleury	vulvite inespecífica

Quadro 2 - Identificação de biópsias de lesões provocadas pelo HPV: procedência e diagnóstico.

Nº da Biópsia	Procedência	Diagnóstico
30180-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
22359-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
04420-04	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
35972-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
32475-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
04827-04	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
38876-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
34050-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
36938-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
41589-03	Laboratório Fleury	Condiloma acuminado
A06/00123	AFIP	Condiloma acuminado
A06/00349	AFIP	Condiloma acuminado
A06/00410	AFIP	Condiloma acuminado
A06/00440	AFIP	Condiloma acuminado
A06/00496	AFIP	Condiloma acuminado
A06/00780	AFIP	Condiloma acuminado
A06/00802	AFIP	Condiloma acuminado
11417-04	Laboratório Fleury	NIV-I
23187-04	Laboratório Fleury	NIV-I
23034-03	Laboratório Fleury	NIV-I
26785-03	Laboratório Fleury	NIV-I
42357-03	Laboratório Fleury	NIV-I
34808-03	Laboratório Fleury	NIV-I
02769-04	Laboratório Fleury	NIV-I
20237-03	Laboratório Fleury	NIV-I
15378-02	Laboratório Fleury	NIV-I
17088-03	Laboratório Fleury	NIV-I
18874-03	Laboratório Fleury	NIV-I
A06/01018	AFIP	NIV-I
A06/02627	AFIP	NIV-I
A06/03558	AFIP	NIV-I
A06/03995	AFIP	NIV-I
A06/04254	AFIP	NIV-I
A06/05549	AFIP	NIV-I
39743-03	Laboratório Fleury	NIV-II
38833-02	Laboratório Fleury	NIV-II
40875-02	Laboratório Fleury	NIV-II
33594-02	Laboratório Fleury	NIV-II
36735-03	Laboratório Fleury	NIV-II
18262-02	Laboratório Fleury	NIV-II
06387-03	Laboratório Fleury	NIV-II
02439-03	Laboratório Fleury	NIV-II
33412-02	Laboratório Fleury	NIV-II
A06/00380	AFIP	NIV-II
A06/00756	AFIP	NIV-II
A06/12785	AFIP	NIV-II
A06/13088	AFIP	NIV-II
27064-03	Laboratório Fleury	NIV-III
38939-02	Laboratório Fleury	NIV-III

Quadro 3- Contagens das células CD1a+, S100+ e FXIIIa+ e células expressando as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10. Lesões de baixo grau em azul e alto grau em preto. As indicações em vermelho referem-se a contagens não realizadas por material insuficiente.

Casos	CD1a	S100	FXIIIa	TNF- α	IFN- γ	IL-10
30180-03	0,007	10,5	25,6	16,43	0	2,38
22359-03	0,002	0	4,44	2,13	0	0
04420-04	0,006	7,61	2,73	4,57	0	1,45
35972-03	0,001	1,65	56	6,52	0	1,45
32475-03	0,005	1,36	32	2,86	0	0,66
04827-04	0,01	44,44	221,26	22,32	0	11,87
38876-03	0,015	0	86	0,59	0	0
34050-03	0,007	31,4	30	0	0	0
36938-03	0,008	3,92	3,37	0,89	0	4,57
41589-03	0	1,52	15,56	0	0	0
A06/00123	0,002	0	8,8	0	0	0
A06/00349	0,008	9,6	2,35	0,48	0	0
A06/00410	0,001	1,01	3,78	0	0	0
A06/00440	0,0001	10,72	36,2	0	1,42	4,8
A06/00496	0,0001	4,11	2,8	0	0,46	0
A06/00780	0,0006	7	30,3	0	1,2	0,42
A06/00802	0,015	3,1	0	0	0	0
11417-04	0,004	38,2	38,2	10,18	0	0
23187-03	0,017	6,15	10,35	10,91	0	0
23034-03	0,007	6,86	1,33	1,85	0	0
26785-03	0,006	2,66	35,65	2,07	0	0
42357-03	0,021	7,2	42,9	6,09	0	0
34808-03	0,014	2	99,2	32,44	0	0,22
02769-04	0,015	16	36,57	3,45	0,26	1,25
20237-03	0,005	12	47,05	5,17	0	0
15378-02	0,014	20,8	15,45	2,37	0	1,33
17088-03	0,023	14,22	88	11,2	0	0
18874-03	0,008	0,8	31,06	6,26	0	0
A06/01018	0	39,55	45,9	1,17	0,84	0
A06/02627	0,0001	1,71	11,46	2,06	1,88	1,86
A06/03558	0	2,82	7,33	0	0	0
A06/03995	0,0007	1,49	0	0,42	0	0
A06/04254	0,0003	12,49	2	0	1,16	0
A06/05549	0,0003	12,41	2,73	0	0	0

continua

Continuação

39743-03	0,0009	44,8	108,73	5,03	0	
38833-02	0,032	4,57	30,55	4	0	0
40875-02	0,019	7,43	142	6,32	0	0,47
33594-02	0,006	16	18,46	0	0	0
36735-03	0,004	1,89	11,2	1,6	0	0,69
18262-02	0,007	4	10,67	5,82	0	0
06387-03	0,002	0	18,22	6,96	0	0
02439-03	0,028	6,09	46,77	2,9	0	0
33412-02	0,01	5,87	62,45	3,79	0	0,86
A06/00380	0,001	5	14,9	0,17	0,24	0
A06/00756	0,0007	0	8,69	0	0	0
27064-03	0,002	32	36	2,16	0	0
38939-02	0,018	14,93	61,59		0,25	
A06/12785	0,0001	10,55	1,9	0	0	0
A06/13088	0,0006	19,78	32,15	0,2	0	0



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22.06.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 465/05, intitulado: "Estudo do comportamento de células dendríticas na vulva em lesões HPV induzidas" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte**

Pesquisador (a) Executante: **Sra. Naiura Vieira Pereira**

CAPPesq, 22 de Junho de 2005.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.11.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1075/06**, intitulado: **"Células dendríticas em lesões de vulva mediadas pelo papilomavirus humano: um estudo imuno-histoquímico"**, apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **DRA. Carla Pagliari**

Pesquisador (a) Executante: **DRA. Naiura Vieira Pereira**

CAPPesq, 08 de novembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Referências

9. REFERÊNCIAS

Abdel-Hady E, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, Stern PL, Moore JV, Corbitt G, Kitchener HC, Hampson IN. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Research*.2001;61:192-6.

Akerman G, Dussour C, Haddad B, Paniel BJ, Rouzier R. Epidemiology of vulvar intra-epithelial neoplasias. *Gynecol Obstet Fertil*. 2007;35(12):1251-6.

Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical câncer cells. *Viral Immunol*. 2006; 19(3):481-91.

Al-Saleh W, Delvenne P, Arrese, JE, Nikkels AF, Piérard GE, Boniver J. Inverse modulation of intraepithelial Langerhans cells and stromal macrophage/dendrocyte populations in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch*. 1995;427:41-8.

Alves MT, Roman LC. Estudo do efeito de distintos períodos de fixação em formalina e métodos de recuperação antigênica na técnica imuno-histoquímica. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(1):43-9.

Arany I, Grattendick KG, Tying SK. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res.* 2002;55(2):331-9.

Arrese Estrada J, Piérard GE. Factor-XIIIa-positive dendrocytes and the dermal microvascular unit. *Dermatologica.* 1990;180(1):51-3.

Arrese JE, Paquet P, Claessens N, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Dermal dendritic cells in anogenital warty lesions unresponsive to an immune-response modifier. *J. Cutan. Pathol.* 2001; 28:131-4.

Ashworth J, Turbitt ML, Mackie R. The distribution and quantification of the Langerhans cells in normal human epidermis. *Clin Exp Dermatol.* 1986;2:153-8.

Auvinen E, Niemi M, Malm C, Zilliacus R, Trontti A, Fingerroos R, Lehtinen M, Paavonen B. High prevalence of HPV among female students in Finland. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(11-12):873-6.

Azar KK, Tani M, Yasuda H, et al. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *J Hum Pathol.* 2004; 35(11):1376-84.

Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJLM, Snijders PJF, Helmerhorst TJM. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol.* 2005;58:1096-1100.

Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet.* 1991; 337:211-4.

Barton SE, Maddox PH, Jenkins D, Edwards R, Cuzick J, Singer A. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet.* 1988;2(8612):652-4.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA.* 1991;265(4):472-7.

Bejarano MT, de Wall Malefyt R, Abrams JS et al. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int Immunol.* 1992;4:1389-97.

Berman B, Chen VL, Frace DS, Dotz WI, Petroni G. Anatomical mapping of epidermal Langerhans cells densities in adults. *Br J Dermatol.* 1983;109:553-8.

Beutner KR, Spruance SL, Hougham AJ, Fox TL, Owens ML, Douglas JM Jr. Treatment of genital warts with an immune-response modifier (imiquimod).

J Am Acad Dermatol. 1998;38(2 Pt 1):230–9.

Bhawan J, Dayal Y, Bhan AK. Langerhans cells in molluscum contagiosum, verruca vulgaris, plantar wart, and condyloma acuminatum. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15 (4 Pt 1):645-9.

Bieber T, Ring J, Braun-Falco O. Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin. *Br J Dermatol.* 1988; 118:385-92.

Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD. An electron microscopic study of basal melanocytes and high levels clears cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1961;37:51-64.

Bonvicini F, Venturoli S, Ambretti S, Paterini P, Santini D, Ceccarelli C, Zerbini M, Musiani M. Presence and type of oncogenic Human Papillomavirus in classic and in differentiated vulval intraepithelial neoplasia and keratinizing vulvar squamous cell carcinoma. *J Med Virol.* 2005;77:102-6.

Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: it's cellular constituents and their interactions. *Immunol Today.* 1986;7:235-40.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3(5):1151-7.

Buscema J, Naghashfar Z, Sawada E, Daniel R, Woodruff JD, Shah K. The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1988;71(4):601-6.

Campaner AB, Nadais RF, Galvão MAL, et al. Evaluation of density of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(3):361-6.

Caorsi M, Figueroa CD: Langerhans' cells density in the normal exocervical epithelium and in the cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;93(9):993-8.

Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A. E-cadherin and alpha-catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2001;80(2):156-61.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Treatment guidelines. 2006. [Http://www.cdc.gov/std/treatment/2006](http://www.cdc.gov/std/treatment/2006). Acessado em 5/11/2008.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Human Papillomavirus: HPV Information for clinicians. 2007. <http://www.cdc.gov/std/hpv/common-clinicians/ClinicianBro-br.pdf>. Acessado em 04/11/2008.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Genital HPV Infection - CDC Fact Sheet. <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>. Acessado em 04/11/2008.

Cerio R, Griffiths CEM, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br. J. Dermatol.* 1989;121: 421-31.

Chardonnet Y, Viac J, Thivolet J. Langerhans cells in human warts. *Br J Dermatol.* 1986; 115:669-75.

Chen EY, Howley PM, Levinson AD, et al. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature.* 1982;299:529-34.

Chen CL, Liu SS, Ip SM, Wong LC, Ng TY, Ngan HY. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer.* 2003;39(4):517-23.

Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(13):5799-803.

Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology*. 1994; 37(3-4): 150-8.

Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol*. 1907;48:12-17.

Clereci M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today*. 1994; 15:575-81.

Cocchia D, Michetti F, Donato R. Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*. 1981;294(5836):85-7.

Collins S, Mazloomzadeh S, Winter H, Blomfield P, Bailey A, Young LS, Woodman CB. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG*. 2002;109(1):96-8.

Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*. 1999;274(5):2696-705.

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

Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol.* 1999;52(5):275-82.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9):5771-7.

Danos O, Engel LW, Chen EY, et al. Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol.* 1983;46:557-66.

Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: A novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1982;1:231-6.

Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1993 May;67(5):2521-8.

De Boer CJ, van Dorst E, van Krieken H, Jansen-van Rhijn CM, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol.* 1999;155(2):505-15.

Denk C, Hülsken J, Schwarz E. Reduced gene expression of E-cadherin and associated catenins in human cervical carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 1997;120(2):185-93.

Derchain SFM, Sarian LOZ. Vacinas profiláticas para o HPV. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007; 29(6):281-4.

De Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol.* 1981;40(3):932-5.

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

Diez-Ruiz A, Titz GP, Zangerle R, Baier-Bitterlich G, Wachter H, Fuchs D. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur J Haematol.* 1995;54(1):1-8.

Drijkoningen M, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Desmet V. Epidermal Langerhans cells, dermal dendritic cells and keratinocytes in viral lesions of skin and mucous membranes: an immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res.* 1988; 280: 220-7.

Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. . Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007;297(8):813-9.

Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3812-5.

Edwards JNT, Morris HB. Langerhans cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol*. 1985;92:974.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha-6-integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997;71(3):2449-56.

Fehr MK, Hornung R, Schwarz VA, Simeon R, Haller U, Wyss P. Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia III using topically applied 5-aminolevulinic acid. *Gynecol Oncol*. 2001;80:62–6.

Finzer P, Soto U, Delius H, Patzelt A, Coy JF, Poustka A, zur Hausen H, Rösl F. Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition. *Oncogene*. 2000;19:3235-44.

Fox H, Wells M. Recent advances in the pathology of the vulva. *Histopathol*. 2003;42: 209-16.

Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994a;91(26):12398-402.

Frattini MG, Laimins LA. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology*. 1994b;204(2):799-804.

Frazer I, Tindle R. Cell-mediated immunity to papillomaviruses. *Papillomavirus Report*. 1992;3:53.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991;113(1):173-85.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997;11(16):2090-100.

Garrido F, et al. HLA and Cancer. In: Ochoa (Ed). *Tumor escape mechanisms*. Academic Publishers; 2000.

Giannini SL, Hubert P, Doyen J, et al. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer*. 2002;97(5):654-9.

Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*. 1977;76(2):569-80.

Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer*. 1980;25(5):605-9.

Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol*. 1982;44(1):393-400.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001; 75(3): 1565-70.

Gonçalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(1):1-9.

Grebbe S, Bruvers S, Granstein RD. Effects of immunomodulatory cytokines on the presentation of tumor-associated antigens by epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 1992; 99: 66S-68S.

Greenfield I, Cuthill S. Antivirals. In: Sterling JC, Tyring SK, editores. Human papillomaviruses. Clinical and scientific advances. London (U.K.): Arnold; 2001. p. 120–30.

Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, Beutner K, Coyne MY, Liang H et al. Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to

HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2058–63.

Guedes F, de Andrade HF Jr, Fernandes ER, Tuon FF, Brasil RA, Pagliari C, Duarte MI. The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon-gamma response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus-infected and uninfected individuals. *Br J Dermatol.* 2008 Sep;159(4):839-46.

Haimoto H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest.* 1987;57(5):489-98.

Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G; GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364(9447):1757-65.

Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *Int J Gynecol Pathol.* 2001;20(1):16-30.

Hashimoto M, Niwa O, Nitta Y, Takeichi M, Yokoro K. Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn J Cancer Res.* 1989;80(5):459-63.

Headington JT. Dermal dendrocyte. *Adv Dermatol.*1986;1:159-71.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006;16(2):83-97.

Herod JJ, Shafi ML, Rollason TP, Jordan JA, Luesley DM. Vulvar intraepithelial neoplasia with superficially invasive carcinoma of the vulva. *Br J Obstet Gynaecol.*1996;103:453-6.

Herrenknecht K, Ozawa M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Lenter M, Kemler R. The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(20):9156-60.

Hillemanns P, Untch M, Dannecker C, Baumgartner R, Stepp H, Diebold J, Weingandt H, Pröve F, Korell M. Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer.* 2000;85:649–53.

Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol.* 1994;125(6):1327-40.

Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe D M, Howley PM. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2300-1.

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

Ikenberg H, Gissmann L, Gross G, Grussendorf-Conen EI, zur Hausen H. Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int J Cancer*. 1983;32(5):563-5.

Inoue M, Ogawa H, Miyata M, Shiozaki H, Tanizawa O. Expression of E-cadherin in normal, benign, and malignant tissues of female genital organs. *Am J Clin Pathol*. 1992;98(1):76-80.

International Agency for Research on Cancer (WHO), International Association of Cancer Registries: cancer incidence in five continents – Vol IV. 1982. Lyon: IARC Scientific Publications 42.

International Agency for Research on Cancer (WHO). International Association of Cancer Registries: cancer incidence in five continents – Vol VI. 1992. Lyon: IARC Scientific Publications 120.

- Jakob T, Udey MC. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J Immunol.* 1998;160:4067-73.
- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 1995;69(5):2989-97.
- Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;11(16):2101-11.
- Jones RW, Rowan DM. Vulvar intraepithelial neoplasia III: a clinical study of the outcome in 113 cases with relation to the later development of invasive vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1994;84:741-5.
- Jones RW, Baranyai J, Stables S. Trends in squamous cell of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1997;90:448-52.
- Joura EA. Epidemiology, diagnosis and treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2002;14(1):39-43.

Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol.* 2006;107(5):1018-22.

Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galán JE, Harhaj E, Flavell RA. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity.* 2006;25(6):941-52.

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

Kjaer SK, Munk C, Tran TN, Tryggvadottir L, Sparen P, Dasbach E, Liaw K-L, Nygaard J, Nygaard M. The burden of genital warts. A study of nearly 70,000 women from four Nordic countries. In: *Proceedings of European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia (EUROGIN)*; 2006. Paris, France (Abstract SS21-04).

Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996;10(9):1054-72.

Koch F, Heufler C, Kämpgen E, Schneeweiss D, Böck G, Schuler G. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating

factor, without inducing their functional maturation. *J Exp Med.* 1990;171(1):159-71.

Koshiol JE, Laurent SA, Pimenta JM. Rate and predictors of new genital warts claims and genital warts-related healthcare utilization among privately insured patients in the United States. *Sex Transm Dis.* 2004;31:748–52.

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

Kuo SR, Liu JS, Broker TR, Chow LT. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem.* 1994;269(39):24058-65.

Lancaster WD, Olson C. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev.* 1982;46:191-207.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2):362-72.

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

Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR et al. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD-40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1995;25:1943-50.

Luiz FG. Avaliação da resposta tecidual “in situ” do fenótipo, da expressão de HHV-8/LANA e de citocinas em lesões cutâneas de sarcoma de Kaposi associado à AIDS na era pré e pós-terapia anti-retroviral combinada [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.

Lusky M, Hurwitz J, Seo YS. Cooperative assembly of the bovine papilloma virus E1 and E2 proteins on the replication origin requires an intact E2 binding site. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15795-803.

Majewski S, Jablonska S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa.. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(5 Pt 1):659-85.

Malejczyk J, Malejczyk M, Breitburd F, Majewski S, Schwarz A, Expert-Besançon N, Jablonska S, Orth G, Luger TA. Progressive growth of human papillomavirus type 16-transformed keratinocytes is associated with an increased release of soluble tumour necrosis factor (TNF) receptor. *Br J Cancer*. 1996;74(2):234-9.

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

McArdle JP, Muller HK. Quantitative assessment of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia and wart virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:509-15.

McNally OM, Mulvany NJ, Pagano R, Quinn MA, Rome RM. VIN 3: a clinicopathologic review. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12:490-5.

McNutt NS. The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol*. 1998;25(10):521-9.

Medeiros F, Nascimento AF, Crum CP. Early vulvar squamous neoplasia: advances in classification, diagnosis, and differential diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2005;12(1):20-6.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*. 1990; 250(4988):1694-9.

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

Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident

human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001;285(23):2995-3002.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.

Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A; Instituto Nacional de Cancerologia HPV Study Group. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 2004;190(12):2077-87.

Nadai RF, Campaner AB, Piato S, et al. Langerhans' cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2006;102(2):356-60.

Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*. 1991 ;65(5):849-57.

Nestle FO, Turka L, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest*. 1994; 94:202-9.

Nickoloff BJ, Griffiths CE. Lymphocyte trafficking in psoriasis: a new perspective emphasizing the dermal dendrocyte with active dermal recruitment mediated via endothelial cells followed by intra-epidermal T-cell activation. *J Invest Dermatol.* 1990;95(5 Suppl):35S-37S.

Nickoloff BJ, Karabin GD, Barker SNWN, Griffiths EM, Sarma V, Mitra RS, Elder JT, Kunkel SL, Dixit VM. Cellular localization of interleukin 8 and its inducer, tumor necrosis factor- alpha in psoriasis. *Am J Pathol.* 1991; 138:129-40.

Nickoloff BJ. *Dermal immune system.* Boca Raton: CRC Press;1993.

Orth G, Favre M, Croissant, O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977;24(1):108-20.

Paavonen J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. *Int J Infect Dis.* 2007;11 Suppl 2:S3-9.

Pagliari C, Sotto MN. Correlation of factor XIIIa+ dermal dendrocytes with paracoccidioidomycosis skin lesions. *Medical Mycology.* 2002; 40: 407-10.

Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003; 25(2):107-12.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.

Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006;24 (Suppl 3):S11–S25.

Pereira NV, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Sotto MN, Duarte MI. Interaction of human papillomavirus DNA with factor XIIIa-positive dermal dendrocytes in vulvar lesions. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(4):391-3.

Piato S. *Tratado de Ginecologia.* São Paulo: Artes Médicas; 2002.

Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Nikkels AF, al-Saleh W, Delvenne P, Piérard GE. Factor XIIIa-positive dendrocytes and proliferative activity of cutaneous cancers. *Virchows Arch.* 1996;429(1):43-8.

Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrão F, Villa LL. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brazil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecologic Oncology.* 1999; 74: 61-67.

Preti M, Mezzetti M, Robertson C, Sideri M. Inter-observer variation in histopathological diagnosis and grading of vulvar intraepithelial neoplasia: results of an European collaborative study. *BJOG.* 2000 May;107(5):594-9.

Ranscht B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6(5):740-6.

Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS*. 2003;111(7-8):725-40.

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 1998;12:2061-72.

Rudolf MP, Small LA, Velders MP et al. Vaccine delivery and immunosuppression in cervical cancer. In: Stern PL, Beverley PCL, Carroll MV (eds). *Cancer Vaccines and Immunotherapy*. Cambridge University Press; 2000. p. 82-106.

Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology*. 1998;250(1):19-29.

Sakuragi N, Nishiya M, Ikeda K, Ohkouch T, Furth EE, Hareyama H, Satoh C, Fujimoto S. Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecol Oncol*. 1994;53(2):183-9.

Sancllemente G. HPV infection and its effects on the expression of cytokines and skin Langerhans cells [dissertação]. London: Imperial College School of Medicine; 1999.

Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *Euro Acad Dermatol Venerol.*2002;16:231-40.

Sanders CM, Stenlund A. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3522-34.

Schröder JM. Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol.* 1995;105(1 Suppl):20S-24S.

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

Sedman T, Sedman J, Stenlund A. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol.* 1997;71(4):2887-96.

Sharma A, Rajappa M, Saxena A, Sharma M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17:879-85.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, Ito F. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol.* 1995;128(5):949-57.

Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*. 1996;77(8 Suppl):1605-13.

Sideri M, Jones RW, Wikinson EJ, et al. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med* 2005; 50:807-10.

Silberberg-Sinakin I, Gigli I, Baer RE, Thorbecke GJ. Langerhans cells: role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and macrophages. *Immunol Rev*. 1980; 53:203-32.

Slade HB. Cytokine induction and modifying the immune response to human papilloma virus with imiquimod. *Eur J Dermatol*. 1998;8(7 Suppl):20–1.

Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, Leigh I, Plantema F, Vooijs P. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 1992;140(3):601-12.

Smedts F, Ramaekers F, Leube RE, Keijser K, Link M, Vooijs P. Expression of keratins 1, 6, 15, 16, and 20 in normal cervical epithelium, squamous metaplasia, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *Am J Pathol*. 1993;142(2):403-12.

Song SH, Lee JK, Lee NW, Saw HS, Kang JS, Lee KW. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol Oncol*. 2008;108(3):543-8.

Sotto MN, De Brito T, Silva AM, Vidal M, Castro LG. Antigen distribution and antigen-presenting cells in skin biopsies of human chromoblastomycosis. *J Cut Pathol*. 2004;31(1):14-8.

Spellberg B, Edwards JE. Type 1/ type 2 immunity in infections diseases. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:76-102.

Sprecher E, Becker Y. Dendritic cells in the epidermis and the lymph nodes – a review. In: Becker Y, editors. *Skin Langerhans (dendritic) cells in virus infections and AIDS*. Boston: Kluwer Academic, 1991: 3-23.

Srodon M, Stoler MH, Baber GB, Kurman RJ. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). *Am J Surg Pathol*. 2006;30(12):1513-8.

Staddon JM, Smales C, Schulze C, Esch FS, Rubin LL. p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol*. 1995;130(2):369-81.

Stanley M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections--current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):117-24.

Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol.* 2007;107(2 Suppl 1):S2-5.

Streilein JW. Skin associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol.* 1983; 80:125-65.

Streilein JW. Sunlight and skin-associated lymphoid tissues (SALT): if UVB is the trigger and TNF alpha is its mediator, what is the message? *J Invest Dermatol.* 1993;100(1):47S-52S.

Sturgeon SR, Brinton LA, Devesa SS, Kurman RJ. In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973 to 1987). *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(5):1482-5.

Sundberg JP. Papillomavirus infections in animals. In: Syrjanen K, Gissmann LL, Koss LG, eds. *Papillomaviruses and Human Disease*. Berlin: Springer-Verlag; 1987. p.40-103.

Sverdrup F, Khan SA. Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol.* 1994;68(1):505-9.

Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:237-52.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991;251(5000):1451-5.

Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5(5):806-11.

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

Taube JM, Nichols AD, Bornman LS, Bornman DM, Jackson JB. Langerhans cell density and high-grade vulvar intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus infection. *J Cutan Pathol.* 2007;34(7):565-70.

Taweechaisupapong S, Angsubahakorn S, Sriurairatana S, Bhamarapravati N. A comparative study of human epidermal Langerhans cells densities in 10 anatomical sites in healthy and diseased skin. *Br J Dermatol.* 1996 Jan;134(1):187-8.

Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Champion M, Singer A. Subpopulations of Langerhans' cells in cervical neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987;94(1):10-5.

Tewari KS, DiSaia PJ. Primary prevention of uterine cervix cancer: focus on vaccine history and current strategy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2002;29(4):843-68.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Reviews*. 2002; 2:1-7.

Todd RW, Etherington IJ, Luesley DM The effects of 5% imiquimod cream on high-grade vulval intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2002;85:67–70.

Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*. 1993;8(1):195-202.

Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J*. 1991;10(2):449-57.

Veatch AL, Carson LF, Ramakrishnan S. Differential expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells. *Int J Cancer*. 1994;58(3):393-9.

Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, Stamp GW, Pignatelli M. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1995;176(2):151-9.

Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, Skjeldestad FE, Olsson SE, Steinwall

M, Brown DR, Kurman RJ, Ronnett BM, Stoler MH, Ferenczy A, Harper DM, Tamms GM, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Jansen KU, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 2005;6(5):271-8.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999;189:12-19.

Wierrani F, Kubin A, Jindra R, Henry M, Gharehbaghi K, Grin W, Söltz-Szötz J, Alth G, Grünberger W. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of intraepithelial neoplasia and human papillomavirus of the uterine cervix—a new experimental approach. *Cancer Detect Prev.* 1999;23:351–5.

Wilkinson EJ, Kneale B, Lynch PJ. Report of the ISSVD terminology committee. *J Reprod Med.* 1986;31-973.

Wilkinson EJ, Teixeira MR. Epithelial tumours of the vulva. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, PA: IARC Press; 2003:316-25.

Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003;157(3):218-26.

Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis.* 2005;191:731–8.

World Health Organization (WHO). Human papillomavirus and HPV vaccines: technical information for policy-makers and health professionals. 2007. Geneva, Switzerland, World Health Organization, http://www.who.int/reproductive-health/publications/hpvvaccines_techinfo/. Acessado em 5/11/2008.

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

Wu H, Lotan R, Menter D, Lippman SM, Xu XC. Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2000;20(3A):1385-90.

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996;13(11):2323-30.

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*. 1995;37(4):417-29.

Zur Hausen H. Papillomaviruses - to Vaccination and Beyond. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73(5):498-503.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)