

HLA DE CLASSE I E II NO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO E LESÕES PRECURSORAS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

ALINE DO NASCIMENTO BOLPETTI

**Tese apresentada a Fundação Antonio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração : Oncologia

Orientadora: Dra Luisa Lina Villa

Fundação Antonio Prudente
pl. Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kunin
Coordenadora Pós-Graduação

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

São Paulo

2005

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Bolpetti, Aline do Nascimento

HLA de classe I e II no desenvolvimento do carcinoma do colo do útero e lesões precursoras associadas ao papilomavírus humano (HPV) / Aline do Nascimento Bolpetti -- São Paulo, 2005.

115p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Luisa Lina Villa

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO COLO UTERINO/genética/imunologia
2. INFECÇÕES POR PAPILOMAVIRUS/epidemiologia. 3. ANTÍGENOS
HLA. 4. TIPAGEM DE HLA.

DEDICATÓRIA

Com carinho, dedico este trabalho aos meus pais **José Carlos** e **Loide**.
Obrigada por todo apoio e amor constantemente dedicados, e pela força que me estimulou a realizar mais uma etapa.

Ao meu irmão **André**, pelo carinho e amizade, que apesar da distância esteve sempre perto, torcendo e incentivando cada passo desta trajetória.

Ao meu querido **Fran** por todo amor e carinho, obrigada pela força essencial para a conclusão de mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Dra **Luisa Lina Villa** pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, pelos ensinamentos, incentivos e por permitir que este trabalho se conclua com sucesso.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe de Pós-graduação da Fundação Antônio Prudente.

À Suely, Carlinhos, Severino e Miyuki pela contribuição na confecção das lâminas de Imunohistoquímica.

À Dra Isabela Werneck pela imensa ajuda na leitura das lâminas utilizadas neste estudo.

À amiga Patrícia Sávio pela enorme contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos, Ana Paula, Andréa, Enrique, Carina, Fabiana, João, José, Katiana, Lara, Laura e Tatiana que com muita alegria e amizade, além dos valiosos ensinamentos, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às amigas Antonieta, Isa, Lenice, Maria Cecília, Neide e Raquel pelo apoio e amizade.

A Stella pela simpatia e dedicação.

Às amigas Danielle, Vanessa, Ana Paula, Mariana e Luciane pela amizade, apoio e carinho dia a dia.

A todos os meus amigos que torceram por mim,

Muito obrigada!

RESUMO

Bolpetti AN. **HLA de classe I e II no desenvolvimento do carcinoma do colo do útero e lesões precursoras associadas ao papilomavírus humano (HPV)**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O curso da infecção por HPV depende de fatores intrínsecos ao vírus, bem como do controle da infecção por parte do hospedeiro pela ação do sistema imune. Dados da literatura descrevem a freqüente perda de expressão de moléculas HLA-I e ganho de expressão de moléculas de classe II em alguns tumores, sugerindo possíveis mecanismos de escape do sistema imunológico por estas células. Dessa forma, nos propomos a avaliar a expressão dos marcadores HLA-I e HLA-II em lesões de colo uterino em diferentes estágios, assim como a caracterização de células do infiltrado inflamatório destas lesões, através da técnica de imunoistoquímica (IHQ). Em nossos resultados, pudemos observar a freqüente perda de expressão das moléculas HLA-I. Aproximadamente 70% das amostras de tumores invasivos do colo uterino apresentaram algum grau de perda de expressão destas moléculas. Além disso, alguns destes casos apresentaram marcação citoplasmática, sugerindo retenção destas moléculas no citoplasma das células neoplásicas por possíveis mecanismos associados ao HPV. Na análise de HLA-II foi observada a expressão destas moléculas em 45% dos tumores. Após análise do infiltrado inflamatório, observamos elevada quantidade de linfócitos no estroma adjacente a lesão em 75% dos casos de NIC-III e em 86% dos tumores invasivos. Além disso, as quantidades de linfócitos TCD3+ e TCD8+ nestas amostras foram semelhantes. Ainda com o objetivo de elucidar o papel das moléculas HLA na história natural de lesões associadas ao HPV, nos propomos a analisar o polimorfismo dos genes HLA-I no desenvolvimento da resposta imune e sua contribuição na susceptibilidade ao desenvolvimento destas lesões. Neste estudo, foram utilizadas amostras de DNA provenientes de esfregaços de colo do útero de mulheres de um amplo estudo epidemiológico que vem sendo realizado em São Paulo (coorte Ludwig-McGill). Os resultados ainda que preliminares, apontam possíveis associações com infecção pelo HPV em mulheres portadoras de determinados alelos HLA-A.

SUMMARY

Bolpetti AN. **HLA class I and II in the development of cervical cancer and precursor lesions HPV associated.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Human Papillomavirus infection and disease associated development depends on intrinsic virus factors, as well as its control by the host immune system. Data from literature frequently show loss of HLA class I and up regulation of HLA class II molecules in tumor cells, as a mechanism of evasion of host immune surveillance. The aim of this work was to evaluate the expression of HLA-I and II in samples of cervical cancer and precursors lesions grade I to III, and to characterize the tumor infiltrated lymphocytes by immunohistochemistry technique. Our results show that down regulation of HLA-I antigen expression occurs in about 70% of the invasive tumors, although, in some of them we detected these molecules in the cytoplasm of the neoplastic cells suggesting a possible mechanism for retention of these proteins by HPV. In this report we also find up regulation of HLA-II expression in 45% of tumors.

To evaluate the role of HLA-I in the natural history of HPV and cervical lesions, we also investigated the polymorphisms of HLA class I genes. In this study we analyze DNA samples from the Ludwig-McGill cohort. The typing was performed by PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotide Probe), and preliminary results suggest possible associations of some HLA-A alleles and infection by HPV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do genoma completo do HPV.	6
Figura 2: Mapa da região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) no genoma humano.	15
Figura 3: Esquema de amplificação da região do gene HLA-A que compreende os exons 2 e 3.	28
Figura 4: Gráfico ilustrando a distribuição dos casos de tumores invasivos e suas lesões precursoras do colo do útero em nossa casuística.	37
Figura 5: Gráfico ilustrando a distribuição de raças em nossa casuística.	37
Figura 6: Gráfico que ilustra a distribuição dos tumores invasivos de acordo com o grau histológico da lesão.	40
Figura 7: Gráfico ilustrando a evolução das pacientes portadoras de tumores invasivos até o ano de 2005.	40
Figura 8: Gráfico ilustrando o padrão de expressão das moléculas de classe I nos casos de tumores invasivos do colo uterino (Carcinomas Epidermóides e Adenocarcinomas).	46
Figura 9: Reação de Imunohistoquímica (IHQ) para HLA de classe I em casos de Carcinomas Epidermóides do Colo do útero.	47
Figura 10: Gráfico que ilustra o padrão de expressão de HLA de classe I encontrado nos casos de lesões precursoras do colo uterino.	46
Figura 11: Caso de NIC-I submetido a coloração com hematoxilina-eosina e IHQ para HLA-I.	48
Figura 12: Casos de NIC-III submetidos a reação de IHQ para HLA-I.	48
Figura 13: Gráfico ilustrando o padrão de expressão das moléculas HLA-II nos casos de tumores invasivos.	51
Figura 14: Gráfico que ilustra o padrão de expressão de HLA-II nas lesões precursoras de colo do útero.	51
Figura 15: Reação de IHQ para HLA de classe II em casos de tumores invasivos.	52
Figura 16: Casos de NIC-III submetidos a reação de IHQ para HLA-II.	52

Figura 17: Casos de NIC-II submetidos à reações de IHQ para HLA de classe I e II. 56

Figura 18: Exemplos de dois tipos de infiltrados inflamatórios encontrados nos casos de tumores invasivos. 58

Figura 19: Caso de NIC-III submetido a reação de IHQ para os marcadores CD3 e CD8. 67

Figura 20: Caso de Carcinoma Epidermóide do Colo uterino submetido a reação de IHQ para CD3 e CD8. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados nas reações de Imunohistoquímica (IHQ). 25

Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação de amplificação do fragmento do gene HLA-A. 27

Tabela 3: Condições das reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) empregadas para amplificação de HLA-A. 27

Tabela 4: Iniciadores e condições utilizadas nas reações de sequenciamento. 32

Tabela 5: Sequências das sondas empregadas nas reações de hibridização para tipagem de HLA-A. 35

Tabela 6: Dados coletados nos prontuários com relação a evolução das pacientes diagnosticadas com NIC-II e NIC-III. 38

Tabela 7: Tipos de HPV nos casos de tumores invasivos e lesões precursoras do colo uterino. 42

Tabela 8: Caracterização dos infiltrados inflamatórios nos casos de NIC-I e NIC-II. 60

Tabela 9: Distribuição e intensidade dos infiltrados predominantemente linfocíticos ou linfoplasmocíticos nos casos de NIC-III. 60

Tabela 10: Análise quantitativa e qualitativa dos infiltrados inflamatórios nos casos de tumores invasivos. 62

Tabela 11: Quantificação dos linfócitos T CD3+ e T CD8+ nos casos de tumores invasivos e lesões precursoras do colo uterino. 66

Tabela 12: Frequências dos grupos de alelos HLA-A na Coorte Ludwig-McGill. 73

ÍNDICE

1 Introdução	1
1.1 O carcinoma do colo uterino	1
1.2 Papilomavírus Humano	3
1.3 Resposta imune às infecções virais	9
1.4 Sistema HLA	10
2 Objetivos	21
3 Materiais e Métodos	22
3.1 Amostras	22
3.2 Imunohistoquímica	23
3.3 Tipagem HLA	26
4 Resultados	36
4.1 Casuística	36
4.2 HPV nos casos de CCU e lesões precursoras	41
4.3 Expressão das moléculas HLA	43
4.4 Análise dos infiltrados inflamatórios	57
4.5 Evolução da doença	69
4.6 Tipagem HLA-A	71
5 Discussão	74
6 Conclusões	89
7 Referencias Bibliográficas	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARCINOMA DO COLO DO ÚTERO

1.1.1 Epidemiologia

O Carcinoma invasivo do Colo Uterino (CCU) é a segunda neoplasia mais freqüente em mulheres no mundo todo, depois do câncer de mama, e a primeira em países em desenvolvimento. De acordo com dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) estima-se que pouco mais de 493.200 novos casos de câncer de colo do útero foram diagnosticados em 2002. Em torno de 83% deles diagnosticados em países em desenvolvimento; sendo responsável por 273.500 mortes por ano em todo o mundo (GLOBOCAN, 2002). De fato, maiores taxas de incidência do CCU são observadas em países da América Latina, África e centro sul da Ásia (PISANI et al, 2002).

No Brasil, estima-se que o câncer de colo do útero seja a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo superado pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama. As estimativas de incidência do CCU no país apontam a ocorrência de 20.690 novos casos no ano de 2005 (Ministério da Saúde, 2005).

1.1.2 Fatores de risco

Evidências epidemiológicas baseadas em estudos moleculares comprovaram a associação causal entre determinados tipos de Papilomavírus Humano (HPV) e o câncer de colo do útero (BOSCH et al, 2002). Entretanto, as infecções por HPV são, em geral, de caráter transitório, apenas uma pequena proporção de mulheres apresentam infecções persistentes por um mesmo genótipo de HPV. O principal fator de risco para infecção por HPV em mulheres consiste no maior número de parceiros sexuais (BASEMAN e KOUTSKY, 2005), indicando claramente seu caráter de doença sexualmente transmissível.

Características inerentes ao vírus influenciam o risco de infecção persistente, uma vez que os diversos tipos de HPV têm mostrado diferenças quanto ao potencial oncogênico. Muitos estudos da literatura têm tentado encontrar associações entre determinadas variantes de HPV e risco de desenvolvimento de lesões no colo uterino (HILDESHEIM e WANG, 2002).

Outros fatores de risco, como tabagismo, alto número de gestações e uso prolongado de contraceptivos orais foram apontados como cofatores que contribuem para o desenvolvimento do CCU em mulheres com infecção persistente pelo HPV (BASEMAN e KOUTSKY, 2005).

A prevalência de infecção pelo HPV em mulheres jovens é maior e o vírus parece entrar em latência com o passar dos anos (BASEMAN e KOUTSKY, 2005). Dados compilados a partir de diversos estudos em todo o mundo, mostraram que a infecção pelo vírus ocorre logo após o início da atividade sexual e é eliminada em alguns anos. No entanto, mulheres HPV-

positivas com mais de 30 anos podem representar um grupo seletivo de maior risco para o desenvolvimento de lesões do colo uterino associadas ao HPV (BOSCH et al, 2003).

Além dos fatores ambientais e dos inerentes ao HPV, características genéticas do hospedeiro são extremamente importantes para o entendimento do desenvolvimento de neoplasias do colo uterino (SOUZA e VILLA, 2003). Fatores, como determinados polimorfismos dos genes HLA de classe I (WANG et al, 2002) e de classe II (MACIAG et al, 2000, MACIAG et al, 2002) parecem influenciar o risco de desenvolvimento de doença.

1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.2.1 Tipos de HPV e Potencial Oncogênico

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus de DNA que infectam epitélios. Até o momento, existem descritos mais de 100 tipos de HPV, dentre os quais, mais de 40 infectam o trato anogenital (zur HAUSEN, 1996). Os tipos não genitais infectam principalmente a pele causando as verrugas comuns, além dos tipos específicos que causam a epidermodisplasia verruciforme, tumores de pele raros.

Os HPV genitais são divididos de acordo com o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas. Os HPVs de baixo risco oncogênico, como HPV-6, 11 e 42, estão associados ao desenvolvimento de lesões benignas do colo uterino e verrugas genitais. No entanto, têm-se descritos até o momento 15 tipos de HPV de alto risco associados às lesões

intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos de colo do útero (MUNOZ et al, 2003). Dentre os HPV de alto risco, HPV-16, 18, 31, 33 e 45 são responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de carcinomas epidermóides, e de forma semelhante, 94% dos adenocarcinomas são causados pelos tipos HPV-16, 18, 33, 45 e 59 (BOSCH et al, 2003).

O HPV-16 é um dos mais prevalentes em mulheres sexualmente ativas e com citologia cervical normal, com taxas entre 15 e 40% (VILLA, 1997), porém, é também o responsável por grande parte dos casos de câncer; sozinho, ele corresponde por 50 a 60% dos casos de CCU (BOSCH et al, 2003).

Estudos realizados a partir de análises por sequenciamento revelaram a existência de diferenças intra-típicas de determinados HPV (BERNARD et al, 1994). Estas variantes moleculares diferem em suas seqüências de nucleotídeos em não mais de 2% nas regiões codificadoras do DNA viral. Em trabalho publicado por nosso grupo foi demonstrado maior risco de persistência e desenvolvimento de lesão precursora em mulheres infectadas por variantes não-Européias de HPV-16 e 18 (VILLA et al, 2000).

1.2.2 Biologia do vírus

Os HPV pertencem à família *Papillomaviridae*, e são constituídos por um capsídeo não envelopado com diâmetro em torno de 55nm que engloba uma molécula de DNA circular dupla fita de aproximadamente 8000pb (zur HAUSEN, 1996).

A organização genômica dos HPV é conservada, e aparece ilustrada na figura 1. O genoma do vírus está dividido em 3 regiões: a região regulatória (LCR, *long control region*), região precoce (*early*) e região tardia (*late*). Os genes L1 e L2, localizados na região tardia, codificam as proteínas do capsídeo viral. A região LCR contém a origem de replicação do DNA, além de ser o local onde se ligam diversos fatores de transcrição que regulam a expressão gênica. Os genes da região precoce, E1 e E2, codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e no controle da transcrição. Os genes E6 e E7 codificam proteínas com atividade de transformação e imortalização celular.

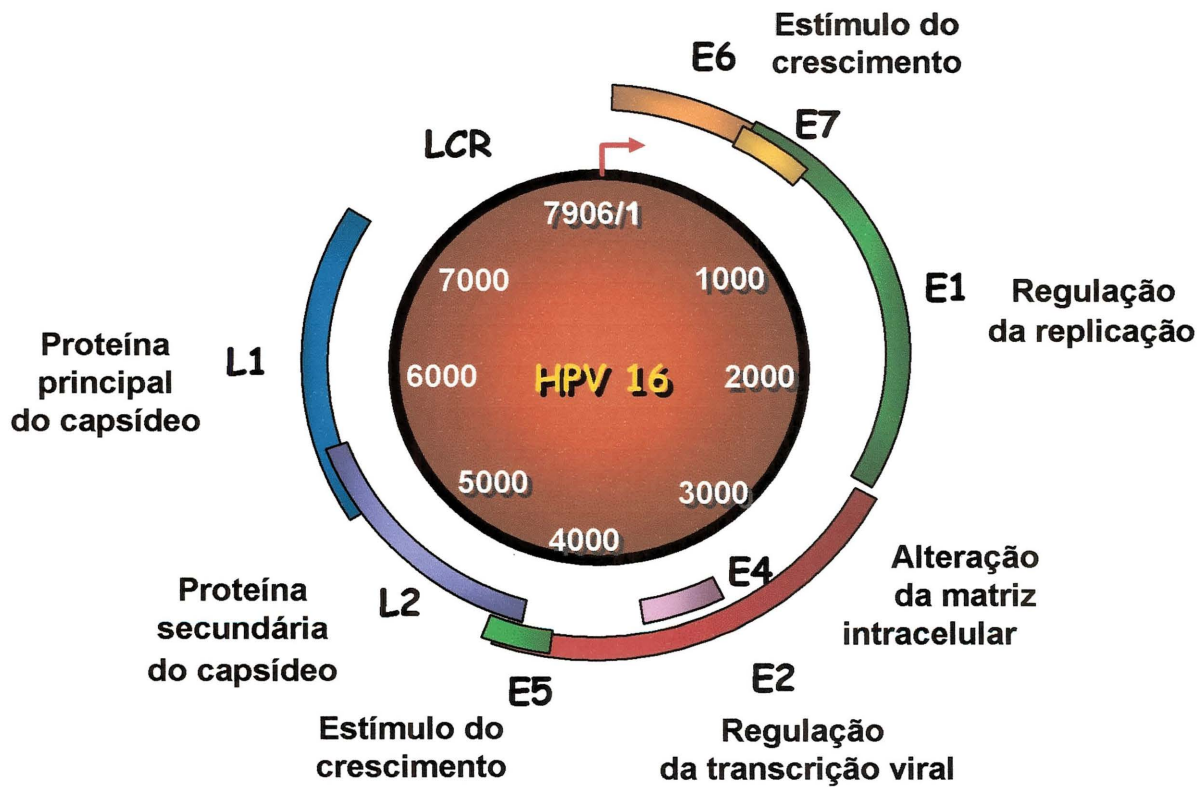


Figura 1: Genoma completo do Papilomavírus Humano (HPV).

A infecção produtiva pelo HPV está relacionada com o grau de diferenciação do epitélio. A infecção ocorre nas células epiteliais da camada basal, uma vez que o vírus se utiliza da alta capacidade destas células de se reproduzirem, para a replicação do DNA viral e expressão dos genes precoces que estimulam o ciclo celular (McMURRAY et al, 2001).

O genoma viral é mantido no estado epissomal no núcleo das células normais infectadas pelo HPV, entretanto, aparece integrado no genoma celular na maioria das células neoplásicas (revisado por VILLA, 1997). Dados da literatura demonstraram que a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, gerado pela ruptura do genoma viral entre os genes E1 e E2, inibe o efeito regulador de E2 sobre a região promotora e estimula a expressão contínua de E6 e E7 (FINZER et al, 2002). Dessa forma, a integração é um passo importante no desenvolvimento de lesões malignas do colo do útero, uma vez que estudo realizado em nosso laboratório encontrou relação entre a forma integrada do vírus e progressão da doença (TREVISAN, 2004).

O potencial oncogênico dos HPV de alto risco pode ser atribuído principalmente à duas proteínas virais precoces E6 e E7 (MUNGER e HOWLEY, 2002). Ambas estão presentes em células neoplásicas do epitélio do colo do útero (zur HAUSEN, 1996). É sabido que E6 de HPV de alto risco é capaz de interagir e inativar a proteína supressora de tumor p53. E6 forma um complexo com p53 e induz sua degradação via dependente de ubiquitina (SCHEFFNER et al, 1990), no entanto, este mecanismo parece ser

específico de HPV de alto risco, pois a proteína E6 de HPV de baixo risco não é eficiente na inativação de p53 (WERNESSE et al, 1990).

Trabalhos na literatura descreveram a interação da proteína E7 de HPV com pRb, induzindo a inativação da proteína supressora de tumor. E7 se liga preferencialmente a forma hipofosforilada de pRb (MURGER et al, 1989), promovendo sua degradação via proteassoma (BOYER *et al*, 1996). Dessa forma, as atividades de E6 e E7 de HPV de alto risco, sobre as proteínas p53 e pRb, respectivamente, contribuem para a imortalização e transformação das células infectadas pelo vírus (revisado por MUNGER e HOWLEY, 2002).

A proteína E5 é sabidamente a principal proteína transformante em papilomavírus bovinos (BPV) (SCHILLER et al, 1986), no entanto, em células infectadas por HPV seu papel ainda não está totalmente elucidado. E5 aparece expresso nos estágios iniciais da infecção pelo HPV, porém, deixa de ser expresso conforme a lesão progride para malignidade (revisado por O'BRIEN e CAMPO, 2002). Estudos têm sido realizados na tentativa de melhor compreender o papel de E5 de HPV no processo de desenvolvimento de neoplasias associadas ao vírus. ASHRAFI et al. (2005), demonstraram a capacidade de E5 em regular negativamente moléculas HLA de classe I em células infectadas por HPV-16, sugerindo um possível mecanismo de evasão do sistema imune por estas células. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre estes mecanismos de escape que leva ao estabelecimento de infecções persistentes pelo HPV.

1.3 RESPOSTA IMUNE ÀS INFECÇÕES VIRAIS

Grande parte das mulheres infectadas por HPV genitais é assintomática, e apenas uma pequena proporção (menos de 1%) progride para o desenvolvimento do carcinoma invasivo do colo do útero. Este fato indica que outros fatores estão envolvidos na progressão de uma célula infectada pelo HPV para uma célula transformada com potencial invasivo. Dessa forma, diversos estudos têm tentado elucidar os diferentes mecanismos envolvidos no processo de evasão do sistema imune por estes vírus (TINDLE, 2001).

A infecção persistente pelo HPV pode gerar uma resposta imunológica deficiente, sendo a imunidade celular o principal mecanismo de combate à estas infecções, e crucial no controle do desenvolvimento de tumores associados a estes vírus. O papel dos linfócitos T, capazes de reconhecer peptídeos antigênicos associados às moléculas HLA é fundamental neste tipo de resposta imune. Peptídeos complexados as proteínas HLA são expressos nas superfícies de células apresentadoras de antígenos (APC), células infectadas por vírus e células tumorais.

A ativação das células T CD4+ e T CD8+ depende do reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T através da interação do receptor da célula T (TCR) e do complexo HLA-peptídeo da célula apresentadora. Nesta interação estão envolvidas outras moléculas coestimulatórias necessárias para a proliferação clonal das células T (BAL et al, 1990). A via de sinais coestimulatórios envolve a interação entre as moléculas B7-1 e B7-2,

presentes na apresentadora de antígenos, com CD28, presente na superfície do linfócito. A expressão de B7 é induzida em células epiteliais estimulada por citocinas, porém, isto parece não acontecer em células infectadas por HPV em latência ou células transformadas pelo vírus (TINDLE, 2001).

Apesar do potencial antigênico de várias proteínas de HPV (de JONG et al. 2002; SHEPHERD et al. 1996) e da detecção de células T CD8+ específicas para estes antígenos (NIMAKO et al. 1997; EVANS et al. 1997), a resposta imune parece não ser efetiva na eliminação do vírus e regressão das lesões em algumas pacientes. Dessa forma, inúmeros fatores, genéticos e ambientais, devem estar envolvidos no controle da resposta imune e história natural das infecções pelo HPV.

1.4 SISTEMA HLA

As moléculas HLA de classe I são expressas na superfície da maioria das células nucleadas, e sua principal função é apresentar continuamente peptídeos intracelulares antigênicos aos linfócitos T CD8+ (citotóxicos). Este processo dá início a resposta imune adaptativa quando peptídeos não próprios são gerados no interior de células infectadas por vírus, por exemplo. As células infectadas por vírus apresentam peptídeos das proteínas virais em sua superfície através das moléculas HLA-A, B e C, e os linfócitos T CD8+ ativados reconhecem o complexo HLA-peptídeo promovendo a lise destas células. As moléculas de classe I também são reconhecidas por receptores

de inibição de lise das células “natural killer” (KIR: *killer inhibitory receptor*) (GUMPERZ e PARHAM, 1995).

O processo de apresentação de antígenos via HLA de classe I envolve além da formação do complexo HLA-peptídeo, moléculas responsáveis pela degradação de proteínas pelo proteassoma (LMP2 e LMP7) e transporte do peptídeo para dentro do retículo endoplasmático (TAP1 e TAP2) (VAN KAER, 2002). O peptídeo é parte integrante do complexo HLA, sendo fundamental para estabilidade deste complexo dentro e na superfície da célula. Após a formação do complexo HLA-peptídeo no interior do retículo, este segue para o Complexo de Golgi e em seguida é transportado para a superfície da célula através de vesículas exocíticas. Na superfície da célula pode então ser reconhecido pelo linfócito T CD8⁺. Os peptídeos complexados com moléculas de classe I têm aproximadamente 8 a 10 resíduos de aminoácidos (ABBAS e LICHTMAN, 2000).

As moléculas HLA de classe II têm sua expressão restrita às APCs, como as células dendríticas, linfócitos B e macrófagos, as quais captam antígenos exógenos em sítios periféricos e migram aos órgãos linfóides secundários, onde ativam células T CD4⁺ (auxiliares) (ZINKERNAGEL et al., 1997). Estes linfócitos, através de sua capacidade de secreção diferencial de citocinas, têm um papel imunorregulador, sendo capazes de ativar, por exemplo, os linfócitos T CD8⁺, que possuem papel efetor na eliminação de células tumorais ou infectadas por vírus.

Os peptídeos apresentados pelas moléculas de classe II possuem em média 16 aminoácidos, podendo ser maiores, com até 30 resíduos (ABBAS e

LICHTMAN, 2000). Eles são provenientes de proteínas exógenas que são internalizadas e degradadas em endossomos, estruturas que apresentam diversas proteínas proteolíticas como as catepsinas. Os endossomos contendo os peptídeos sofrem fusão com vesículas exocíticas contendo moléculas HLA-II, e os complexos HLA-peptídeo são expressos na superfície da célula apresentadora de antígeno (VILLADANGOS e PLOEG, 2000), prontos para serem reconhecidos pelas células T CD4+.

1.4.1 Moléculas HLA

As moléculas HLA de classe I e II são estruturalmente semelhantes. As moléculas de classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente. A cadeia α (ou cadeia pesada), codificada por genes HLA de classe I, possui em torno de 45 kD, enquanto a cadeia β (ou cadeia leve) é codificada pelo gene da β_2 -microglobulina e tem 12 kD. A molécula de classe I é composta por uma região de ligação do peptídeo, $\alpha 1$ e $\alpha 2$, formando uma fenda fechada incapaz de acomodar peptídeos maiores; uma região conservada e semelhante á imunoglobulina ($\alpha 3$), que contém um sítio para ligação da molécula CD8; um domínio transmembrana e uma região citoplasmática intracelular (ABBAS e LICHTMAN, 2000).

As moléculas HLA de classe II são formadas por duas cadeias polipeptídicas, α e β , ambas codificadas por genes HLA-II. A fenda de ligação do peptídeo é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ codificados pelo exon 2 dos genes responsáveis pelas cadeias α e β , respectivamente. Por exemplo, na molécula HLA-DQ, a cadeia α é codificada pelo gene HLA-DQA1 e a cadeia

β pelo gene HLA-DQB1. A região semelhante a imunoglobulina é composta pelos domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$, neste último encontra-se o sítio de ligação da molécula CD4.

1.4.2 Genes HLA

Os genes HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6, em 6p21.3, região denominada Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) que compreende aproximadamente 3800 kb, onde estão localizados pelo menos 200 genes. Esta região aparece ilustrada na figura 2.

O MHC humano está dividido em três regiões denominadas de classe I, II e III. Na região HLA de classe I, próxima ao telômero estão os genes HLA-A, B, C, E, F, G e H; na região de classe II, mais próxima ao centrômero, encontram-se os genes que codificam as moléculas HLA-DP, DQ e DR; e na região de classe III estão localizados os genes que codificam as proteínas do sistema complemento e o fator de necrose tumoral (TNF) (MOSS e KHANNA, 1999).

Os genes que codificam as moléculas HLA de classe I são altamente polimórficos, resultando em grande número de variações nas seqüências de aminoácidos das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, que correspondem aos aminoácidos formadores do sítio de ligação do peptídeo (HUGHES e NEI, 1988). Estas variações polimórficas ocorrem principalmente nos exons 2 e 3 dos genes HLA-I responsáveis pela codificação dos módulos $\alpha 1$ e $\alpha 2$, respectivamente. O módulo $\alpha 3$, codificado pelo exon 4, interage com polipeptídeos conservados, como β_2 -microglobulina e a molécula CD8 de linfócitos T

citotóxicos. Este exon apresenta substituições, em sua maioria silenciosas, que podem ser justificadas pelo não envolvimento direto no sítio de ligação do peptídeo e pela seleção natural conservadora. Qualquer mudança de aminoácido neste módulo poderia perturbar as interações estáveis com os polipeptídeos conservados (PARHAM et al. 1988). O gene que codifica a cadeia β das moléculas HLA de classe I (β_2 -microglobulina) está localizado no cromossomo 15 e, portanto, não pertence a região gênica do MHC.

Os genes HLA de classe II também são altamente polimórficos e as variações nucleotídicas concentram-se no exon 2. Estas variações conferem a diversidade das seqüências de aminoácidos que compõem a fenda de ligação do peptídeo nas moléculas de classe II.

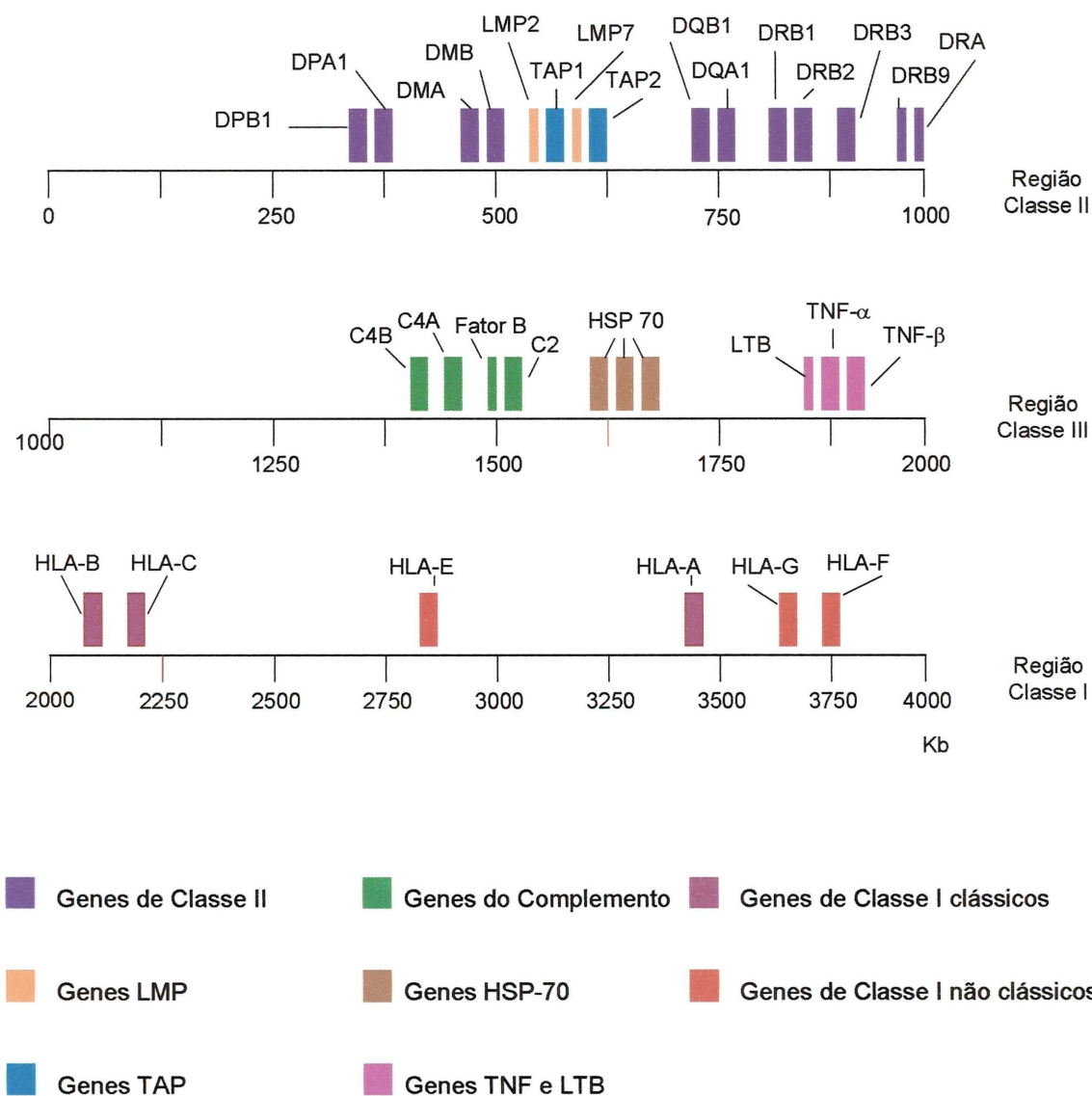


Figura 2: Mapa simplificado do MHC humano.
(Modificado de CAMPBELL e TROWSDALE, 1993)

1.4.3 Polimorfismo e susceptibilidade

O importante papel das moléculas HLA na apresentação de antígenos, implica na influência de seus polimorfismos no desenvolvimento da resposta imune. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar uma possível associação entre alelos e/ou haplótipos de HLA e diversas doenças.

Apesar do papel crucial das moléculas HLA de classe I na eliminação de uma infecção viral e do CCU, poucos estudos foram realizados investigando o papel do polimorfismo dos genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, quando comparados aos estudos de HLA classe II (DE ARAÚJO SOUZA e VILLA, 2003). Este fato deve-se, em parte à dificuldade de tipagem de alta resolução destes genes, que são altamente polialélicos e polimórficos. Até abril de 2005, foram descritos 199 alelos de HLA-C, 396, de HLA-A e 700 de HLA-B (www.ebi.ac.uk/imgt/hla).

Estudos que avaliaram o papel dos polimorfismos de HLA de classe II encontraram associações positivas com o carcinoma de colo do útero e suas lesões precursoras em mulheres portadoras de determinados alelos dos genes DRB1 e DQB1 (HILDESHEIM et al. 1998; MACIAG et al. 2000). Em trabalho realizado por outros pesquisadores do nosso grupo foi demonstrada associação entre haplótipos HLA-DRB1 e DQB1 e risco de infecção persistente por HPV (MACIAG et al. 2002).

Os estudos de associação com genes de classe I mostraram resultados diferentes nas populações analisadas. Na população da Costa Rica, foi descrito um maior risco de desenvolvimento de lesões cervicais entre portadoras de HLA-B*07 (WANG et al. 2001). Associações

semelhantes também foram descritas num estudo caso-controle realizado na população norte americana (HILDESHEIM et al. 1998). Entre mulheres holandesas, um maior risco foi observado entre portadoras de HLA-B*44 (BONTKES et al. 1998a). Em uma população de mulheres holandesas e alemãs foi demonstrado maior frequência de HLA-B*55 em mulheres com tumores de colo do útero cujo HPV não pode ser detectado (KRUL et al. 1999). No entanto, não foram observadas associações entre alelos dos genes HLA de classe I e CCU relacionado ao HPV em grupo de mulheres inglesas (GLEW et al. 1993).

Dessa forma, um de nossos objetivos neste trabalho é investigar a variabilidade dos genes de classe I na história natural da infecção pelo HPV, e possível relação com o desenvolvimento de lesões no colo uterino.

1.4.4 Expressão das moléculas HLA em tumores

A ausência de expressão das moléculas de HLA de classe I por diferentes tipos de tecidos tumorais tem sido descrita na literatura (HICKLIN et al. 1999), sugerindo ser um dos mecanismos de escape do sistema imune frequentemente desenvolvidos pelas células neoplásicas. A expressão alterada das moléculas de classe I na superfície das células tumorais tem sido atribuída a diversos fatores, como a deficiente expressão de componentes da maquinaria de apresentação de antígenos (APM) e mutações nos genes envolvidos neste processo (GARCIA-LORA et al. 2003). A regulação negativa da expressão de moléculas envolvidas no processamento de apresentação de antígenos, como das proteínas

transportadoras TAP-1 e TAP-2 (VITALE et al. 1998; CROMME et al. 1994), e das subunidades do proteassoma LMP-2 e LMP-7 (RITZ et al. 2001), é um dos mecanismos que pode gerar falha na resposta imune contra o desenvolvimento de tumores.

Análises por imunoistoquímica têm demonstrado a perda de expressão das moléculas HLA-I em diferentes tecidos tumorais, incluindo câncer de mama (VITALE et al. 1998) e melanomas (FERRONE e MARINCOLA, 1995). Entretanto, esta perda ocorre em diferentes frequências dependendo do tipo tumoral (HICKLIN et al. 1999). Alguns estudos demonstraram a perda da expressão de componentes da APM e moléculas HLA de classe I em carcinoma de colo uterino (CROMME et al. 1994; KEATING et al. 1995; RITZ et al. 2001), assim como o ganho de expressão de moléculas HLA classe II pelas células desta mesma neoplasia (GLEW et al. 1992). No entanto, o papel das moléculas de classe I e de classe II no desenvolvimento do CCU e de suas lesões precursoras associadas ao HPV, ainda não está bem esclarecido, sendo de suma importância a investigação da expressão destas moléculas em lesões de colo uterino em seus diferentes estágios. Portanto, este trabalho tem como um dos objetivos avaliar a expressão das moléculas HLA de classe I e II em amostras de carcinoma de colo uterino e lesões precursoras, e estabelecer uma possível correlação com grau de agressividade da doença.

1.4.5 Papel do infiltrado inflamatório

Embora o sistema imune seja extremamente importante para o controle da infecção por HPV, pouco se sabe a respeito do papel das células responsáveis por esta resposta. Os linfócitos T responsáveis pelo reconhecimento de antígenos via moléculas de HLA estão presentes em lesões de colo uterino associadas ao HPV (COLEMAN et al. 1994; EVANS et al. 1997). No entanto, a caracterização destes infiltrados linfocitários ainda é controversa, uma vez que, alguns estudos demonstraram maior resposta mediada por linfócitos T CD4+ (COLEMAN et al. 1994; HOHN et al. 1999), enquanto outros pesquisadores encontraram maior frequência de linfócitos T CD8+ nas lesões associadas ao HPV (FERGUSON et al. 1985; GLEW et al. 1992).

É sabido que uma resposta imune eficaz é gerada a partir da cooperação entre as células T CD4+ e T CD8+, no entanto, muitos estudos têm tentado elucidar os mecanismos de cada resposta no combate ao desenvolvimento de tumores. A resposta mediada pelas células T CD4+ específicas para antígenos virais de HPV tem sido considerada, em muitos trabalhos, a mais importante no controle destas infecções (DE JONG et al. 2004; WARRINO et al. 2004; HOHN et al. 2000). Entretanto, o papel dos linfócitos T CD8+ no combate às infecções virais é conhecido e considerado o mais importante neste tipo de resposta (KAGI et al. 1994). Além disso, alguns estudos têm identificado peptídeos específicos complexados às moléculas HLA de classe I que são reconhecidos pelas células T citotóxicas em diferentes tipos tumorais (COX et al. 1994; RESSING et al. 1995). Epítomos provenientes de proteínas codificadas pelo HPV tem sido descritos

em associação com moléculas HLA-B na ativação de linfócitos T CD8+ específicos (BOURGAULT et al. 2000; MONROY-GARCIA et al. 2002). Dessa forma, torna-se importante a caracterização do tipo de infiltrado presente nos tecidos de tumores invasivos, assim como de suas lesões precursoras do colo do útero, na tentativa de contribuir para elucidação da resposta imune contra a infecção pelo HPV e desenvolvimento destas lesões.

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto são avaliar o polimorfismo dos genes HLA de classe I e a expressão das moléculas HLA de classe I e II em amostras de carcinoma de colo uterino e lesões precursoras. Para tanto, propusemos os seguintes objetivos específicos:

1. Em séries históricas de tumores invasivos de colo do útero e lesões precursoras: avaliar a existência de alterações na expressão das moléculas HLA-I e HLA-II, e caracterizar a presença de infiltrado inflamatório através da técnica de imunohistoquímica (IHQ). E correlacionar estes dados com grau de severidade da doença;
2. Em esfregaços frescos do colo uterino provenientes do Estudo Prospectivo Ludwig-McGill da história natural da infecção por HPV: definir alelos HLA de classe I (HLA-A e B), e correlacionar os achados com diferentes riscos de infecções persistentes por HPV.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas na análise por imunoistoquímica foram obtidas no IBCC (Instituto Brasileiro de Controle do Câncer) no período de 1999 a 2002, com a colaboração dos cirurgiões Dr. Ronaldo Costa, Dr. Francisco Coelho e respectivas equipes, tendo sido devidamente aprovadas pelos Comitês de Ética das instituições envolvidas. As amostras de tecidos tumorais são de pacientes com Carcinomas Epidermóides de Colo Uterino (CEC) ou Adenocarcinomas, que não apresentavam histórico de quimioterapia ou radioterapia, e foram obtidas durante o ato cirúrgico (Cirurgia de Wertheim-Meigs ou Histerectomia Total). As pacientes com lesões precursoras (NIC-II e III) foram atendidas no ambulatório, e submetidas à Cirurgia de Alta Frequência (CAF) (ou conização). Um total de 139 amostras de tumores invasivos (CEC e Adenocarcinomas) e lesões precursoras de baixo (NIC-I) e alto grau (NIC-II e NIC-III) são provenientes de 105 pacientes, significando que alguns casos de NIC em diferentes estágios foram obtidos de uma mesma paciente.

As amostras de esfregaços cervicais utilizadas na tipagem de HLA foram obtidas do estudo prospectivo sobre a história natural da infecção por HPV e da neoplasia do colo do útero que vem sendo realizado no Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, filial São Paulo (ILPC-SP), sob responsabilidade da Dr^a. Luisa Lina Villa (ILPC-SP) e Dr. Eduardo Franco

(McGill University, Montreal, Canadá). Foram acompanhadas em torno de 2,5 mil mulheres, por um período de 5 anos, e os retornos das pacientes foram quadrimestrais no primeiro ano de seguimento, e semestrais a partir do segundo ano (FRANCO et al. 1999). Os esfregaços cervicais foram coletados para análise citológica, detecção do DNA de HPV e definição do genótipo viral, através de PCR-SSO (TING e MANOS, 1990), complementadas por análise de RFLP (BERNARD et al. 1994).

Para obtenção de controles utilizados nas reações de hibridização para HLA-A, foram selecionadas amostras previamente tipadas para HLA de classe II (HLA-DRB1 e DQB1), e que foram submetidas à reação de sequenciamento do gene HLA-A. Estas amostras são provenientes de um estudo realizado por outro pesquisador do nosso grupo.

3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

As 139 amostras de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, foram submetidas à reação de IHQ para HLA-I e II. A análise dos infiltrados inflamatórios destas lesões foi realizada com anticorpos específicos para linfócitos T (CD3+ e CD8+). O anticorpo monoclonal anti HLA-I (HC-10, cód. SB04-159) reconhece uma porção específica da cadeia pesada da molécula de classe I, sendo mais específico para moléculas HLA-B e HLA-C, e ainda sendo capaz de reconhecer um pequeno número de moléculas correspondentes aos alelos HLA-A. O anticorpo monoclonal anti HLA-II (LGII-612.14, cód. SB04-160) é capaz de reconhecer porção

específica das moléculas HLA-DR, DQ e DP; ambos foram gentilmente cedidos pelo Dr Soldano Ferrone (*Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA*). Os anticorpos anti-CD3 (policlonal, DAKO, Dinamarca) e anti-CD8 (clone 1A5, Novocastra, Inglaterra) são marcadores específicos para células T e linfócitos T citotóxicos, respectivamente.

Cortes de aproximadamente 4µm foram dispostos em lâminas revestidas com silano (Superfrost Plus, *Erviagas Instrumentel Cirúrgico Ltda*) que melhora a aderência do tecido, e em seguida permaneceram em estufa à 90°C por no mínimo 2 horas. As lâminas passaram pelo processo de desparafinização por meio de banhos sucessivos em xilol, sendo então submetidas à desidratação com álcool absoluto, e banho em PBS (*phosphate-buffered saline*) por 5 minutos. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% durante 10 minutos. Em seguida os cortes foram lavados com PBS e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,01M, pH 6,0 em microondas por 15 minutos. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram lavadas novamente com PBS, e aos cortes foi adicionada solução bloqueadora (soro não imune 10% de coelho ou cabra) por 10 minutos, em seguida, as lâminas foram tratadas com o anticorpo primário de acordo com suas respectivas concentrações. Os tecidos permaneceram em câmara úmida à 4°C *overnight*. Seguiu-se tratamento com anticorpo biotilado do Kit StreptABComplex/HRP Duet (anti-IgG de coelho ou camundongo) (DAKO, Dinamarca), diluído 1:200 em PBS. As lâminas foram então lavadas em PBS,

e para amplificação do sinal, foram incubadas com peroxidase acoplada a estreptavidina (diluição 1:200), por 30 minutos à temperatura ambiente. Para revelação do sinal foi adicionada solução de 3-3' *diaminobenzidine* (DAB) (Sigma, EUA) por 5 minutos, seguida da adição do corante hematoxilina de Harris (contra-coloração). Após desidratação com banhos sucessivos em álcool absoluto e xilol, foi realizada montagem das lâminas com resina sintética Entelan. A reação foi analisada em microscopia óptica convencional.

Nas reações de IHQ para HLA-I e II foram incluídos os seguintes controles: tecido contendo epitélio normal tratado com anticorpo anti-citoqueratina (pan-Citoqueratina, 1:500) (DAKO) para controle da qualidade do sistema de amplificação do sinal; corte histológico de amígdala normal submetido a tratamento com anti-HLA-I (HC-10) ou anti-HLA-II (LGII-612.14) utilizado como controle positivo para nossa reação; e como controle negativo, epitélio normal tratado apenas com soro irrelevante de camundongo. Amostras de amígdalas também foram utilizadas para controle nas reações com os anticorpos anti-CD3 e -CD8. As concentrações dos anticorpos utilizados nas reações de IHQ estão ilustradas na tabela 1.

Tabela1: Anticorpos empregados nas reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição
Anti HLA-I	HC-10	1:20
Anti-HLA-II	LGII-612.14	1:50
Anti-CD3	—	1:100
Anti-CD8	1A5	1:20

3.3 TIPAGEM HLA-A

A tipagem dos genes HLA-A foi realizada através da técnica PCR-SSOP. A amplificação do fragmento que compreende os exons 2 e 3 do gene HLA-A, o processo de obtenção dos controles para as hibridizações, assim como a padronização das reações de hibridização com sondas específicas recomendadas pelo 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade estão descritas a seguir.

3.3.1 Amplificação do gene HLA-A

De um total de 666 amostras inicialmente selecionadas para tipagem de HLA provenientes do estudo prospectivo Ludwig-McGill, 647 foram amplificadas para HLA-A, fragmento que compreende do intron 1 ao intron 3 abrangendo os exons 2 e 3, que constituem as regiões polimórficas. As demais amostras (n=19) não apresentaram sinais satisfatórios na reação de amplificação do DNA, por isso foram excluídas de nossa casuística. A amplificação do gene foi realizada em duas etapas: uma primeira reação de PCR, seguida de uma *Nested* PCR gerando um produto de aproximadamente 1000pb. As seqüências dos iniciadores, recomendados pelo 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade, e as condições utilizadas em ambas reações de PCR para HLA-A estão ilustradas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. A figura 3 esquematiza a região amplificada do gene HLA-A.

Tabela 2: Iniciadores para amplificação de HLA-A.

	Iniciadores	Seqüência 5'-3'
Primeira PCR	AAmp1a F	GCCTCTGCGGGGAGAAGCAA
	AAmp1b F	GCCTCTGTGGGGAGAAGCAA
	AAmp2 R	GTCCCAATTGTCTCCCCTCCTT
Nested PCR	AAmp3a F	AGCCGCGCCGGGAAGAGGGTCG
	AAmp3b F	AGCCGCGCCTGGAAGAGGGTCG
	AAmp4 R	GGCCCCTGGTACCCGTGCGCTG

Tabela 3: Condições das reações de PCR empregadas na amplificação de HLA-A.

	Constituintes da reação	Perfil de ciclagem
Primeira PCR	3µl Buffer 10X (<i>Amersham</i>); 3µl dNTP 2mM; 1,2µl MgCl ₂ 25mM; 0,12µl Taq polimerase 5U/µl (<i>Amersham</i>); 0,3µl Iniciadores 20µM, para volume final de 30µl	96°C- 3' (1X) / 96°C- 25"; 65°C- 45"; 72°C- 35" (26X) / 96°C- 25"; 55°C- 1' (4X) / 72°C- 5' / ∞ 4°C
Nested PCR	3µl Buffer 10X (<i>Amersham</i>); 3µl dNTP 2mM; 0,9µl MgCl ₂ 25mM; 0,12µl Taq polimerase 5U/µl (<i>Amersham</i>); 0,18µl Iniciadores 20µM, para volume final de 30µl	96°C- 3' (1X) / 96°C- 30"; 56°C- 30"; 72°C- 30" (30X) / 96°C- 30"; 56°C- 1'; 72°C- 2' (4X) / 72°C- 5' / ∞ 4°C

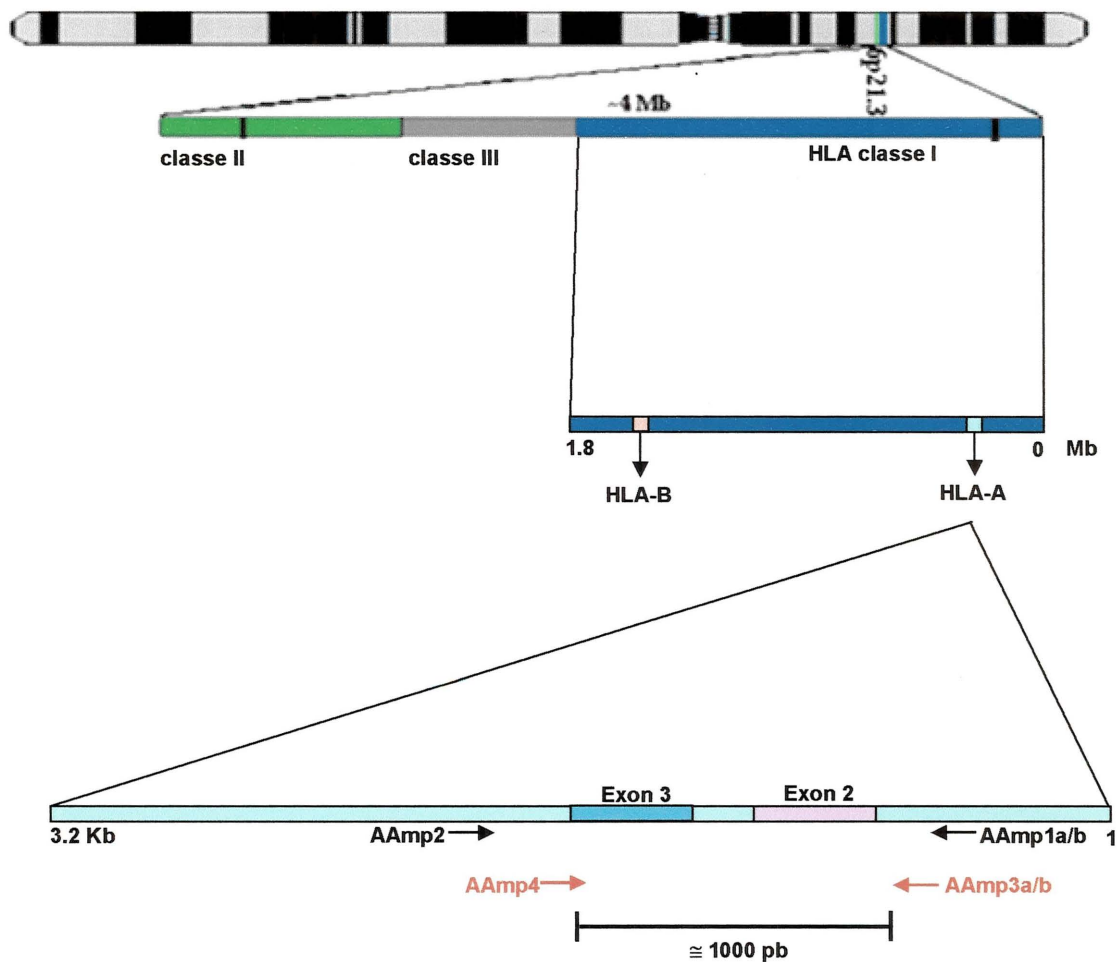


Figura 3: Esquema ilustrando a região do gene HLA-A amplificado pelos iniciadores **AAmp1a/b** e **AAmp2** na **primeira PCR**, e pelos iniciadores **AAmp3a/b** e **AAmp4** na reação **Nested PCR**. Na primeira PCR, os iniciadores AAm1a/b e AAm2 são complementares às regiões que compreendem os códons 26-46 do intron 1 e os códons 95-74 do intron 3, respectivamente. Na reação *Nested PCR*, os iniciadores AAm3a/b e AAm4 são complementares às regiões que compreendem os códons 80-101 do intron 1 e os códons 180(exon 3)-12(intron 3), respectivamente. O produto destas reações tem tamanho aproximado de 1000 pb de acordo com o alelo HLA-A.

3.3.2 Clonagem e Sequenciamento

Os produtos gerados a partir de uma reação *Nested PCR* para amplificação do gene HLA-A de 18 amostras previamente selecionadas foram clonados e sequenciados visando a obtenção de amostras controles para as reações de hibridização com sondas específicas para HLA-A. Os processos de clonagem e isolamento do DNA alvo ligado ao vetor que antecedem o sequenciamento foram realizados com a utilização dos kits *p-Gem^R-T Easy Vector Systems* e *Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, USA), respectivamente.

Ligação dos fragmentos HLA-A ao vetor pGem

Para cada reação de ligação foram utilizados 5µl do tampão de ligação (*2X Rapid Ligation Buffer*), 1µl do vetor (*p-Gem-T Easy Vector*) (50ng), 1µl de T4 DNA ligase (3 Weiss U/µl) e 2µl do DNA amplificado de forma a obter uma relação de 4 de fragmento para 1 de vetor, conforme indicado pelo fabricante, em um volume final de 10µl. As reações foram mantidas a 4°C por aproximadamente 14 horas.

Termotransformação

Para a clonagem dos vetores recombinantes foram utilizadas bactérias termocompetentes *E.coli* da linhagem JM 109. A cada 100µl de bactérias competentes foram adicionados 10µl do produto da reação de ligação, mantidos em gelo por 20 minutos. O choque térmico foi dado a 42°C por 50

segundos seguido de incubação em gelo por mais 2-5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1ml de meio LB (*Luria Bertani*) (1g triptona; 0,5g extrato de levedura; 0,5g NaCl; 1ml Tris-HCl 1M pH7,4; 0,1ml MgSO₄ 1M, para 50ml de água destilada deionizada) com posterior incubação a 37°C e 200rpm por 1 hora. A seguir, 600µl das culturas foram plaqueados em meio LB-agar 1,5% contendo ampicilina (100µg/ ml) e mantidos em estufa a 37°C por aproximadamente 12 horas. De cada placa foram selecionadas 5 colônias submetidas a reação de PCR com iniciadores complementares ao vetor p-Gem.

Foram selecionadas a partir da PCR das colônias, as que apresentaram o fragmento do tamanho esperado. Em seguida transferidas para um tubo contendo 5ml de meio LB e 5µl de ampicilina (50µg/ml), incubadas a 37°C e 150rpm por aproximadamente 12 horas. Foram selecionadas 3 colônias de cada amostra para o isolamento do DNA.

Isolamento do DNA dos vetores recombinantes

O processo de isolamento do DNA a partir dos vetores recombinantes foi realizado com a utilização do kit *Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, USA) segundo as orientações do fabricante. Aproximadamente 3ml da cultura foram centrifugados a 12000rpm por 2 minutos, em seguida, o *pellet* formado foi ressuspensionado em 250µl da solução de ressuspensão (Tris-HCl 50mM pH7,5; EDTA 10mM; *RnaseA* 100µg/ml) sob agitação. A seguir, para promover a lise das bactérias e

liberação do vetor recombinante, foram adicionados 250µl da solução de lise (NaOH 0,2M; SDS 1%) seguida de agitação para homogeneização da solução, seguida da adição de 10µl de protease alcalina e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após o processo de degradação protéica foram adicionados 350µl da solução de neutralização (Acetato de potássio 1,32M pH4,8) seguida de agitação e centrifugação a 12000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microcoluna e centrifugado por 1 minuto. O eluido foi dispensado e à coluna foram adicionados 750µl de solução de lavagem (NaCl 200mM; Tris-HCl 20mM pH7,5; EDTA 5mM diluído em etanol 95%), Após a centrifugação por 1 minuto, foi realizada nova lavagem com 250µl da solução anterior e centrifugação por mais 2 minutos. A coluna foi então transferida para um novo tubo (1,5ml) e submetida a eluição com 80µl de água livre de nucleases. Para verificar a eficiência da purificação do DNA alvo, 5µl foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Sequenciamento

Os DNA extraídos a partir da técnica de mini-preparação descrita no item anterior foram submetidos a reação de sequenciamento baseada em protocolo fornecido pelo fabricante do kit *Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA). O seqüenciador automático ABI PRISM™ 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA) foi utilizado

para as análises das seqüências. Os iniciadores, constituintes da reação e perfil de ciclagem estão ilustrados na tabela 4.

Tabela 4: Iniciadores e condições utilizadas nas reações de sequenciamento.

<i>Iniciadores</i>	<i>Constituintes da reação</i>	<i>Perfil de ciclagem</i>
T7 (ATT ATG CTG AGT GAT ATC CC)	3µl Save money; 2µl BigDye; 1,8µl T7 (5µM); 3µl DNA; para volume final de 15µl	96°C - 2' / 96°C - 45"; 50°C - 30"; 60°C - 4' (35X) / 4°C ∞
pUC/M13 - R (TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC)	3µl Save money; 2µl BigDye; 0,5µl pUC-R (20µM); 3µl DNA; para volume final de 15µl	

Todos os clones das 18 amostras iniciais foram seqüenciados com ambos os iniciadores ilustrados na tabela 4, totalizando 108 seqüências. A partir dos iniciadores T7 e pUC/M13-R foram obtidos os fragmentos completos dos exons 2 e 3 do gene HLA-A, respectivamente.

3.3.3 Hibridização

A padronização das reações de hibridização com as 45 sondas específicas para HLA-A foi realizada com a utilização de membranas Hybond N+ (Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) carregadas positivamente. Inicialmente, foram aplicados nas membranas 1,5µl dos produtos da *Nested* PCR para HLA-A das 18 amostras previamente seqüenciadas, além dos produtos da PCR das colônias geradas a partir da clonagem destes fragmentos, processo descrito anteriormente. Em seguida,

Fundação Antonio Prudente

 Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
 Coordenadora Pós-Graduação

as membranas foram desnaturadas em NaOH 0,4M por 3 minutos e hidratadas em SSPE 3X (SSPE 20X: NaCl 3,6M; NaH₂PO₄. H₂O 200mM; EDTA dissódico 20mM; SDS 20%) por mais 3 minutos. A fixação das amostras de DNA amplificado na membrana foi realizada em UV *Crosslinker* (Fisher Byotech, USA).

Nas reações de hibridização foram utilizadas garrafas de 200ml e forno *Hybaid* do tipo *rotisserie*. Inicialmente as membranas são bloqueadas em 10ml de SSPE 0,1X - SDS 0,5% durante 20 minutos à temperatura de hibridização que varia de acordo com a sonda utilizada (entre 52 e 65°C). Após o descarte da solução de bloqueio, são adicionados 10ml de SSPE 2X - SDS 0,1%, ou TMACl (tetramethylammonium chloride 3M, 50mM Tris pH 8,0, SDS 0,1%, 2mM EDTA pH 8,0) e incubadas por mais 20 minutos à temperatura de hibridização. Em seguida, adiciona-se 20pmoles de sonda biotinilada e incuba-se por aproximadamente 16 horas. Após a hibridização, são realizadas 2 lavagens de 15 minutos com 10ml da solução SSPE 2X - SDS 0,1% ou TMACl à temperatura de hibridização. Após a lavagem com TMACl é realizada uma última lavagem com SSPE 3X - SDS 0,5% por 10 minutos para retirada do excesso de TMACl. Em seguida, as membranas são incubadas com 15µl do conjugado *horseradish peroxidase-streptavidin* (HRP-SA, 1mg/ml) (*Dynal A.S.*, Norway) por 20 minutos à temperatura ambiente. As membranas, são então submetidas a 2 lavagens de 10 minutos cada com 10ml de SSPE 2X - SDS 0,1%. A revelação através de quimioluminescência é realizada com o kit ECL - *Direct Nucleic acid Labelling and Detection System* (Amershan Life Science). Sobre cada membrana, são adicionados

1ml da solução A e 1ml da solução B do kit ECL. A seguir, as membranas são expostas em filme de raio-X IBF-Medix por 10 minutos, seguida de uma segunda exposição por 1 hora. A remoção das sondas é realizada através do aquecimento das membranas em água mili-Q à 70°C por 15 minutos, para reutilização das mesmas.

As seqüências das sondas complementares aos genes HLA-A, modificadas com biotina na extremidade 5', estão ilustradas na tabela 5. A tipagem de HLA-B prevista em nossos objetivos não foi realizada.

Tabela 5: Sondas complementares ao gene HLA-A.

Sonda	Codons	Sequência 5'-3'
A00903	7-13	TAT TTC TAC ACC TCC GTG T
A05603a	53-59	CAG GAG AGG CCT GAG TAT T
A06201	61-67	GAC GAG GAG ACA GGG AAA G
A06202	60-66	GG GAC CGG AAC ACA CGG AA
A06203	60-66	GG GAC CTG CAG ACA CGG AA
A06204	62-68	GG AAC ACA CGG AAA GTG AA
A06205	57-63	GG GAC GGG GAG ACA CGG AA
A06501	64-70	ACA CGG AAT ATG AAG GCC C
A06503	63-69	G ACA CGG AAT GTG AAG GCC
A07001a	68-73	T CTG TGA CTG GGC CT
A07002	67-73	TG AAG GCC CAC TCA CAG AC
A07002a	70-75	GTC AGT CTG TGA GTG G
A07402	71-77	CA CAG ATT GAC CGA GTG GA
A07403a	71-77	A CAG ACT GAC CGA GTG GAC
A07601	74-80	C CGA GCG AAC CTG GGG ACC
A07602	74-80	C CGA GTG GAC CTG GGG ACC
A07603	74-80	C CGA GAG AAC CTG CGG ATC
A07604a	74-80	AC CGA GAG AGC CTG CGG AT
A07605	74-80	C CGA GAG AAC CTG GGG ACC
A07606	76-82	GTG GAC CTG GCG ACC CTG C
A09501	93-99	CAC ACC ATC CAG ATA ATG T
A09502a	93-99	CAC ACC GTC CAG AGG ATG T
A11401	113-119	TAC CGG CAG GAC GCC TAC G
A11402	113-119	TAC CAG CAG GAC GCT TAC G
A11403	113-119	TAT GAA CAG CAC GCC TAC G
A11408	113-119	TAC CAG CAG GAC GCC TAC G
A14201	140-146	T CAG ATC ACC CAG CGC AAG
A14202	140-146	T CAG ATC ACC AAG CGC AAG
A14203	140-146	T CAG ACC ACC AAG CAC AAG
A14801	147-153	G GAG GCG GCC CAT GTG GCG
A14802	147-153	G GAG ACG GCC CAT GAG GCG
A14808	148-154	AG GCG GCC CGT CGG GCG GA
A14809	148-154	AG GCG GCC CGT GTG GCG GA
A15601	153-159	G GAG CAG CGG AGA GTC TAC
A15602	153-159	G GCG GAG CAG TTG AGA GCC
A15603	153-159	G GCG GAG CAG TGG AGA GCC
A15604	153-159	G GCG GAG CAG CAG AGA GCC
A16101	159-165	C CTG GAT GGC ACG TGC GTG
A16301	162-168	GC ACG TGC GTG GAG TGG C
A16302	162-168	GC CGG TGC GTG GAC GGG C
A16303	162-168	GGC GAG TGC GTG GAG TGG C
A16304	162-168	GC ACG TGC GTG GAC GGG C
A16305	162-168	GC CGG TGC GTG GAG TGG C
A16307	162-168	GGC GAG TGC GTG GAC GGG C
A16602	164-170	TGC GTG GAC GGG CTC CGC A

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Nossa casuística é constituída por 139 amostras de tecidos incluídos em parafina provenientes de 105 pacientes atendidas no Instituto Brasileiro de Controle do Câncer. Estas amostras compreendem 51 casos (36,7%) de tumores invasivos, dentre estes, 46 são Carcinomas Epidermóides do Colo Uterino (CEC) e 5 Adenocarcinomas. O restante são amostras de lesões precursoras de baixo (NIC-I) e alto grau (NIC-II e NIC-III); 56 (40,3%) são casos de Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau III (NIC-III) ou Carcinoma *in situ*, 12 casos (8,6%) de NIC-II e 20 amostras (14,4%) de NIC-I. A distribuição dos casos de tumores invasivos e suas lesões precursoras que constituem nossa casuística aparece ilustrada na figura 4.

Foram analisados 100 prontuários das 105 pacientes incluídas em nossa casuística. A idade média destas pacientes é de 41 anos, variando de 18 a 68 anos. Mulheres diagnosticadas com tumores invasivos apresentaram idade média de 44 anos; enquanto nos casos de lesões precursoras a média diminui para 38 anos. Com relação a raça, predominam as mulheres brancas (46,6%), seguidas de pardas ou mestiças (34,3%) e apenas 3 negras (3%). Em 16% delas a raça não foi informada. Estes dados estão ilustrados na figura 5.

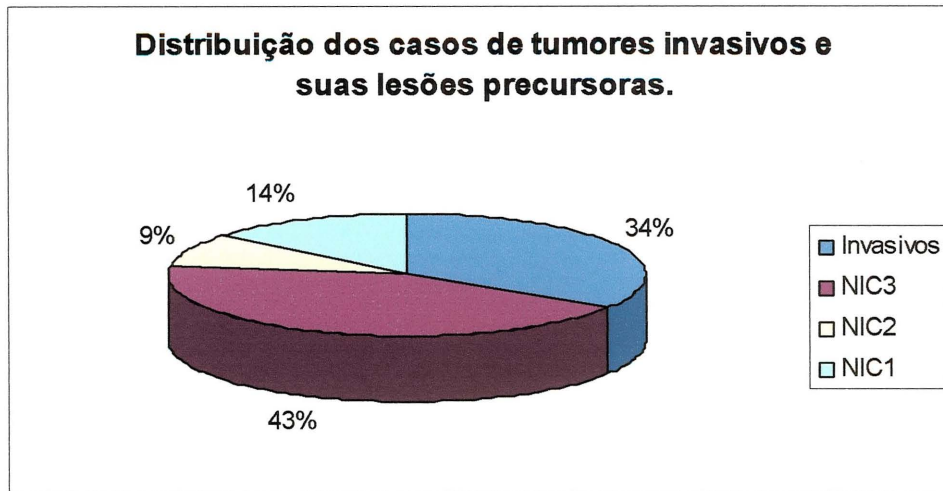


Figura 4: Gráfico de distribuição dos casos de tumores invasivos (CEC e adenocarcinomas) e suas lesões precursoras em nossa casuística.

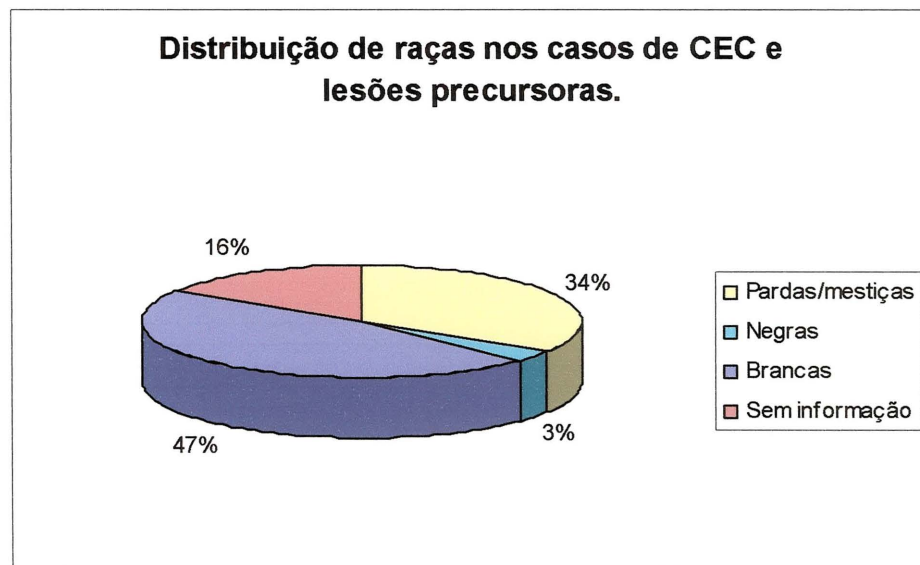


Figura 5: Distribuição de raças nos casos de tumores invasivos de colo do útero (CCU) e suas lesões precursoras.

Os 51 casos de tumores invasivos foram classificados de acordo com o grau histológico da lesão; 35,3% dos CEC são de grau III, pouco mais de 31% são de grau II e apenas 7,8% dos casos de CEC são de grau I; 15,7% dos casos não foram graduados. A frequência de adenocarcinomas é baixa (9,8%), incluindo apenas um caso de adenocarcinoma de células claras, bastante raro na população em geral. A figura 6 ilustra a distribuição dos tumores de acordo com o grau histológico.

De acordo com os dados coletados nos prontuários pudemos observar que a maioria das mulheres portadoras de tumor invasivo ou lesão precursora (NIC) apresenta-se livre de doença até o presente ano (2005). Das 54 mulheres portadoras de lesões precursoras de alto grau (NIC-II e NIC-III), 81,5% estão curadas atualmente. Não obtivemos informação sobre a evolução de 8 pacientes (14,4%). A tabela 6 resume os dados com relação a evolução das pacientes com lesões precursoras.

Tabela 6: Evolução das pacientes diagnosticadas com NIC-II e III, submetidas a CAF.

<i>Diagnóstico (n)</i>	<i>LD</i>	<i>ASCUS</i>	<i>NIC-II</i>	<i>SI</i>
NIC-II (13)	11 (84,6%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (15,4%)
NIC-III (41)	33 (80,5%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)	6 (14,6%)
Total (54)	44 (81,5%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)	8 (14,8%)

LD - livre de doença; ASCUS - Atipias de epitélio escamoso de significado indeterminado; NIC-II - paciente com lesão de grau II após tratamento da lesão primária NIC-III; SI - sem informação sobre a evolução da paciente.

De forma semelhante, dentre as pacientes diagnosticadas com CEC ou adenocarcinoma (total de 51 casos), 60,8% (n=31) delas apresentam-se livres de doença, até o momento. No entanto, 5 (9,8%) destas pacientes

faleceram devido ao câncer, e 2 (3,9%) apresentam recidiva. Não há informação sobre a evolução da doença em aproximadamente 24% dos casos de tumores invasivos. Os dados quanto a evolução das pacientes portadoras de tumores invasivos aparecem ilustrados na figura 7.

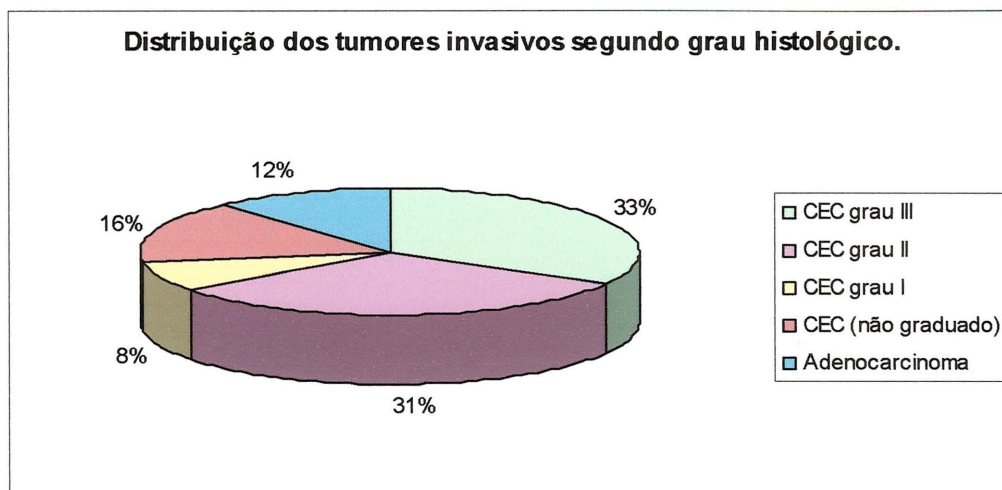


Figura 6: Gráfico de distribuição dos tumores invasivos segundo tipo e grau histológico.

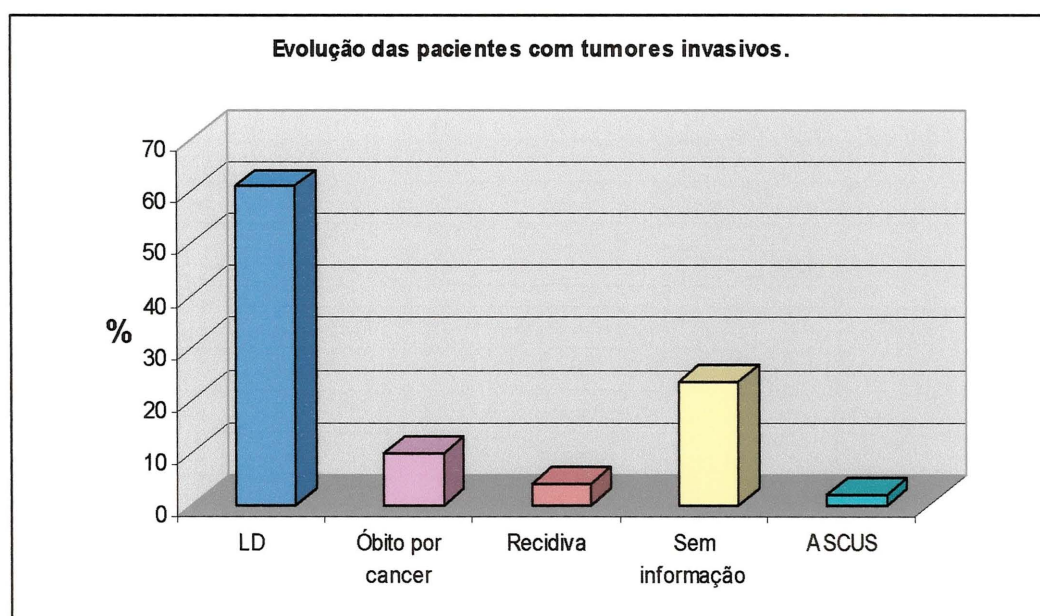


Figura 7: Evolução das pacientes portadoras de tumores invasivos (CEC ou adenocarcinoma) até o presente ano (2005). LD - livre de doença; ASCUS - Atipias de epitélio escamoso de significado indeterminado.

4.2 HPV NOS CASOS DE CCU E LESÕES PRECURSORAS

Os casos de tumores invasivos e suas lesões precursoras foram submetidos a tipagem de HPV através de PCR com iniciadores específicos para o gene de L1. Em nossa casuística foi observada maior frequência de HPV-16 nas amostras analisadas. Dentre os casos de tumores invasivos, aproximadamente 73% são positivos para HPV-16, sendo 2 destes casos com infecção concomitante por HPV-18, um caso com infecção múltipla por HPV-33 e 52, e outro com infecção concomitante por HPV-45. De forma semelhante, a maioria das lesões precursoras de alto grau são positivas para HPV-16 (n=26). A presença de HPV-18, 33, 45, 52, 53 e 58 foi detectada em poucas amostras. A tabela 7 ilustra os dados de HPV nas amostras utilizadas neste estudo. O número total de mulheres diagnosticadas com tumores invasivos e lesões precursoras do colo do útero apontados na tabela, não confere com a soma de infecções por HPV, devido à existência de pacientes com infecções por múltiplos tipos de HPV.

Tabela 7: HPV nos casos de CEC e adenocarcinomas, e nas lesões precursoras (NIC-I, II e III).

	<i>HPV</i>	<i>N (%)</i>
Tumores invasivos	16	37 (72,5)
	18	4 (7,8)
	outros	7 (13,7)
	nd	7 (13,7)
	total	51 *
Lesões precursoras	16	26 (48,2)
	18	1 (1,9)
	outros	8 (14,8)
	nd	24 (44,5)
	total	54**

* número total de mulheres portadoras de tumores invasivos

** número total de mulheres diagnosticadas com lesões precursoras

outros - HPV-33, 45, 51, 52, 53 e 58**nd** - não determinado

4.3 EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA

A expressão das moléculas HLA de classe I e II avaliadas através da técnica de IHQ foi quantificada de acordo com o grau de expressão destas moléculas na superfície das células neoplásicas. Com relação às moléculas de classe I, usualmente expressas na maioria das células nucleadas do organismo, foi analisado o grau de perda de expressão destas proteínas na superfície das células. Ao contrário das moléculas de classe II, expressas normalmente apenas pelas APCs, a análise foi baseada no ganho de expressão destas proteínas também na superfície das células tumorais.

Estudos publicados na literatura diferem quanto a forma de avaliação dos resultados obtidos em IHQ com relação a quantificação da expressão destas moléculas em casos de tumores de colo uterino (GLEW et al. 1992; KEATING et al. 1995). Em nosso estudo, optamos por caracterizar a expressão destas proteínas conforme a porcentagem do tecido acometido pela perda ou ganho de expressão de HLA-I ou HLA-II, respectivamente. Todos os casos foram analisados em conjunto com a dra Isabela Werneck do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

4.3.1 Expressão de HLA de classe I

De acordo com o padrão de expressão das moléculas de classe I, os casos foram divididos em: 1) aqueles que apresentaram perda de expressão em 80% ou mais das células neoplásicas que compõem a lesão (alto grau de perda); 2) aqueles que apresentaram perda entre 40 e 70% da lesão (grau de

perda intermediário); 3) casos que tiveram perda em menos de 40% das células tumorais (baixo grau de perda); e 4) aqueles que foram amplamente positivos para HLA-I, ou seja, que não houve perda.

Na maioria dos casos (36/51; 70,6%) de tumores invasivos de colo do útero, foi observado algum grau de perda de expressão das moléculas de classe I na superfície das células. Em 35,3% dos casos de CEC houve perda de expressão destas moléculas em 80% ou mais das células tumorais. A frequência de casos totalmente positivos para HLA-I foi de 29,4%. Os dados encontrados nesta análise estão ilustrados na figura 8.

Em algumas das amostras negativas para HLA de classe I, ou seja, que perderam a expressão destas proteínas na membrana das células neoplásicas, foi observada expressão destas moléculas no citoplasma destas células. Dez casos (19,6%) de tumores invasivos, um deles do tipo adenocarcinoma, apresentaram esta característica. As reações de IHQ para HLA de classe I estão ilustradas na figura 9.

A análise por IHQ das lesões precursoras do colo do útero revelou que na maioria dos casos não houve perda de expressão de HLA de classe I. Todos os casos de NIC-I apresentaram-se positivos nas células das camadas basais e supra-basais, padrão semelhante ao observado no epitélio normal. De forma semelhante, grande parte dos casos de NIC-II (75%) também não perderam a expressão destas moléculas. No entanto, dentre os casos de NIC-III foram observados diferentes padrões de expressão de HLA-I; incluindo 16% dos casos que perderam a expressão destas moléculas em 80% ou mais das células tumorais. Por volta de 18% dos casos de NIC-III

apresentaram um grau de perda intermediário, ou seja, entre 40 e 70% das células neoplásicas perderam a expressão das moléculas de classe I; e em aproximadamente 20% destes casos foi observado baixo grau de perda, nos quais menos de 40% das células que compõem a lesão perderam a expressão destas proteínas. Os resultados obtidos nas reações de IHQ para HLA de classe I nos casos de NIC-I, II e III aparecem ilustrados na figura 10. As figuras 11 e 12 ilustram casos de NIC-I e NIC-III, repectivamente, submetidos a coloração com hematoxilina-eosina e à reação de IHQ para HLA-I.

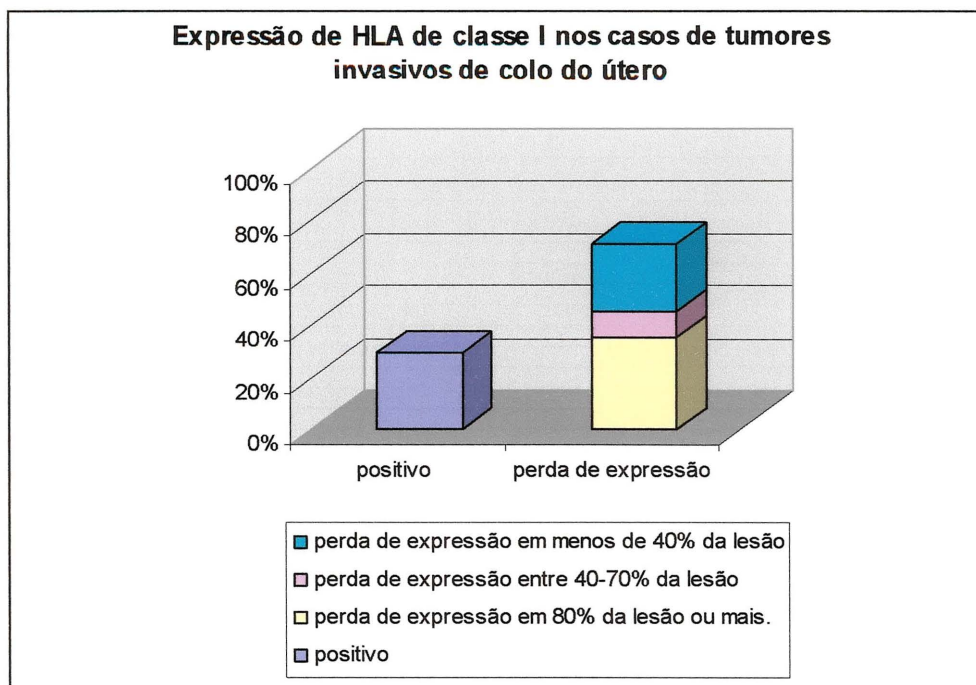


Figura 8: Padrão de expressão de HLA de classe I nos casos de Carcinomas Epidermóides do Colo uterino e Adenocarcinomas. Dados obtidos por IHQ.

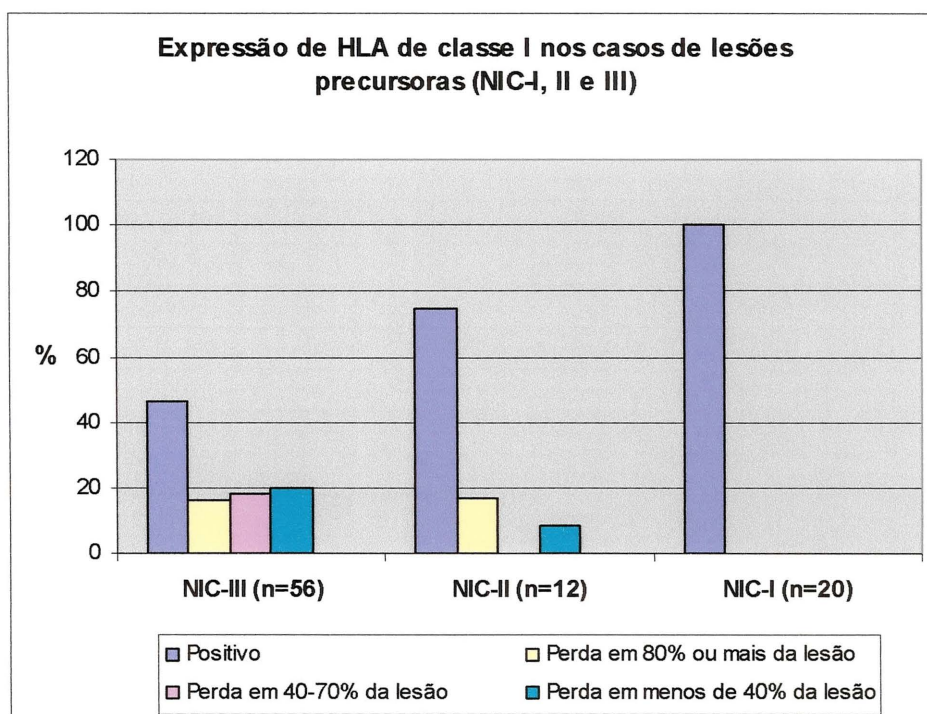


Figura 10: Expressão das moléculas HLA de classe I nos casos de lesões precursora do colo uterino. N corresponde ao número total de casos em cada categoria. Nos casos de NIC-I a positividade é restrita às camadas basais e supra-basais.

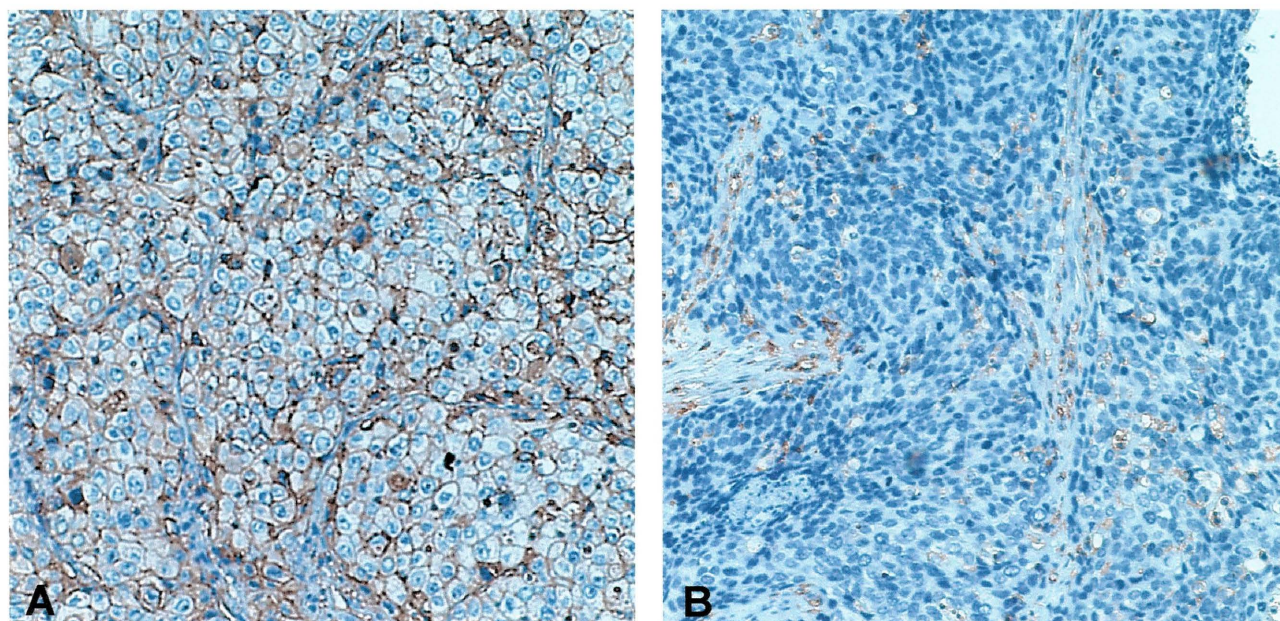


Figura 9: Reação de IHQ para HLA -I (aumento de 100X). Em **A**: caso de CEC positivo para HLA-I. Em **B**: caso de CEC negativo para HLA de classe I.

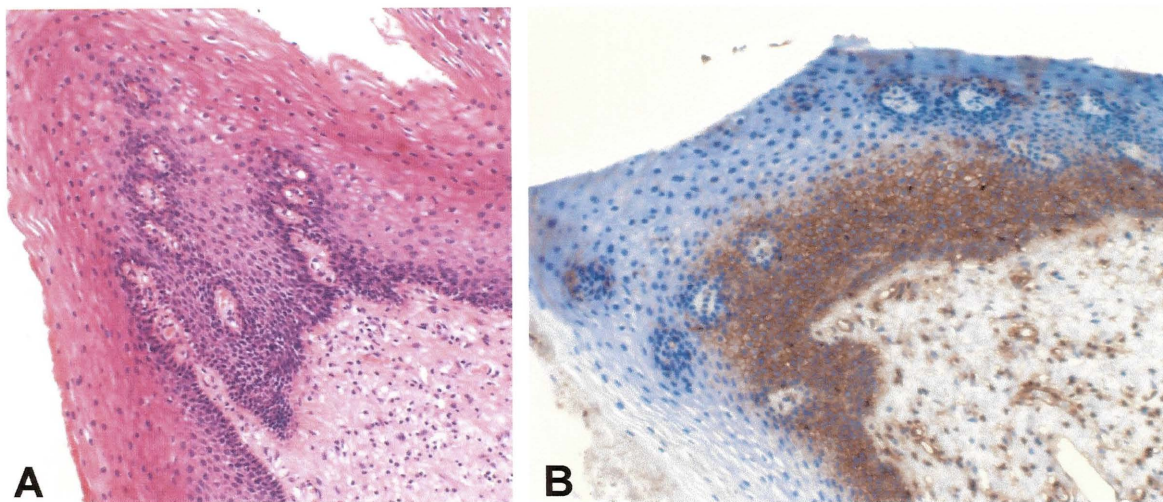


Figura 11: Caso de NIC-I, aumento de 200X. Em **A**: HE; Em **B**: Imunoistoquímica positiva para HLA-I; células positivas predominantemente nas camadas basal e supra-basal.

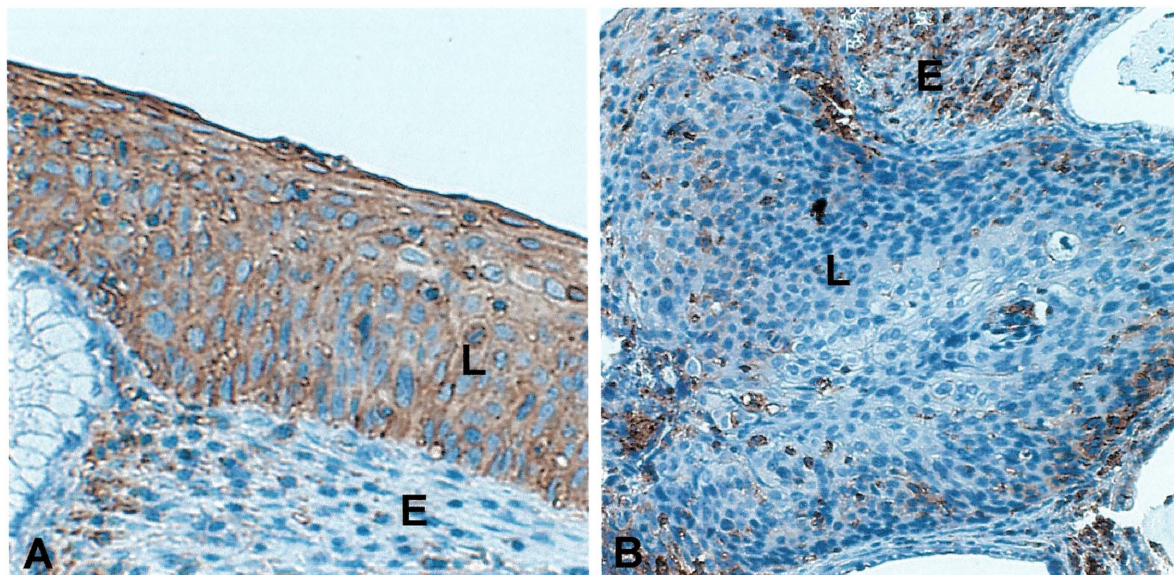


Figura 12: Em **A**, caso de NIC-III positivo para HLA de classe I, aumento de 400X. Em **B**, caso de NIC-III negativo para HLA-I, aumento de 200X. L - lesão; E - estroma.

4.3.2 Expressão de HLA de classe II

Os casos submetidos a análise de HLA de classe II foram classificados de acordo com o padrão de expressão destas moléculas na superfície das células tumorais, e estão divididos em: 1) aqueles que passaram a expressar HLA-II em 80% ou mais das células neoplásicas; 2) casos que apresentaram ganho de expressão em 40 a 70% das células da lesão (ganho intermediário); 3) aqueles que passaram a expressar HLA-II em menos de 40% da lesão; e 4) casos negativos para as moléculas de classe II, ou seja, que não houve ganho de expressão.

A avaliação da expressão de HLA -II revelou que aproximadamente 45% dos casos de CEC e adenocarcinomas apresentaram diferentes padrões de positividade destas moléculas pelas células neoplásicas. No entanto, por volta de 1/3 destes casos passaram a expressar HLA-II em menos de 40% das células tumorais. Em torno de 55% do total de casos analisados continuaram negativos para HLA-II. A figura 13 ilustra os resultados obtidos nas reações de IHQ para HLA de classe II nos casos de tumores invasivos do colo uterino.

Na análise por IHQ das moléculas de classe II foi observada marcação citoplasmática em 4 casos de tumores invasivos, um deles apresentou apenas marcação no citoplasma das células neoplásicas, sem marcação de membrana, enquanto nos outros 3 casos observou-se a expressão destas proteínas em ambas localizações celulares.

Em geral, as amostras de lesões precursoras de baixo e alto grau não expressam as proteínas HLA-II. Apenas um caso de NIC-I passou a

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninani
Coordenadora Pós-Graduação

expressar moléculas de classe II em todas as células da lesão, enquanto, todos os outros (19/20) casos desta categoria foram negativos para estas moléculas. De forma semelhante, a grande maioria dos casos de NIC-II (9/12; 75%) também não apresentaram ganho de expressão de HLA-II. Entretanto, quando avaliados os casos de NIC-III, pode-se observar diferentes padrões de expressão anormal das moléculas de classe II. Embora aproximadamente metade dos casos de NIC-III tenham sido negativos para HLA-II (48,2%), parte destes casos passaram a expressar estas moléculas em quantidades significativas nestas lesões. Os casos que passaram a expressar HLA de classe II em 80% ou mais das células que compõem a lesão, assim como aqueles que apresentaram ganho de expressão entre 40 e 70% das células tumorais, somam 19 do total de 56 amostras (34%) de NIC-III. A figura 14 resume os dados obtidos com HLA-II nestas lesões precursoras. As figuras 15 e 16 ilustram as reações de IHQ para HLA de classe II em casos de tumores invasivos e NIC-III, respectivamente.

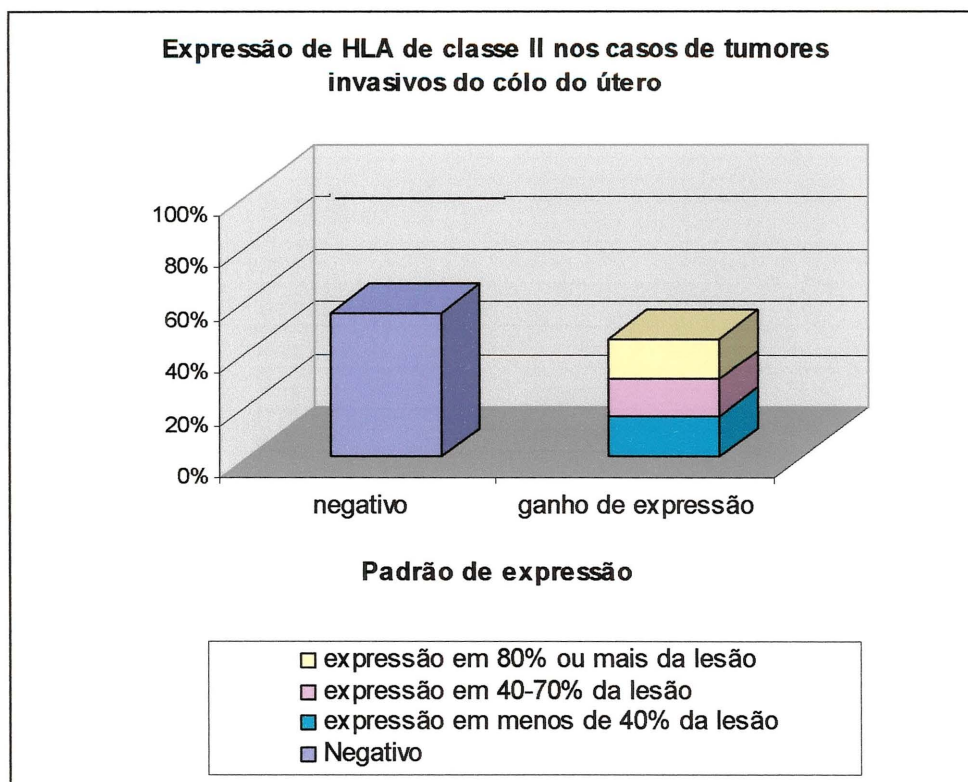


Figura 13: Gráfico do padrão de expressão de HLA de classe II nos casos de Carcinomas Epidermóides e Adenocarcinomas do Colo uterino.

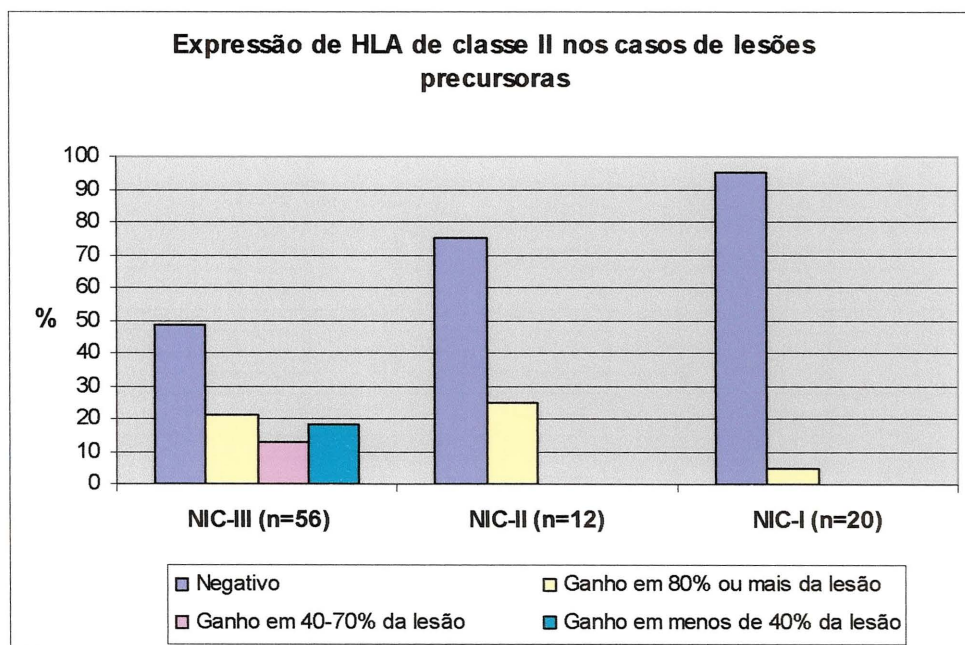


Figura 14: Padrão de expressão das moléculas HLA de classe II nos casos de lesões precursoras do Carcinoma de Colo do Utero de baixo (NIC-I) e alto grau (NIC-II e NIC-III). N corresponde ao número total de casos em cada categoria.

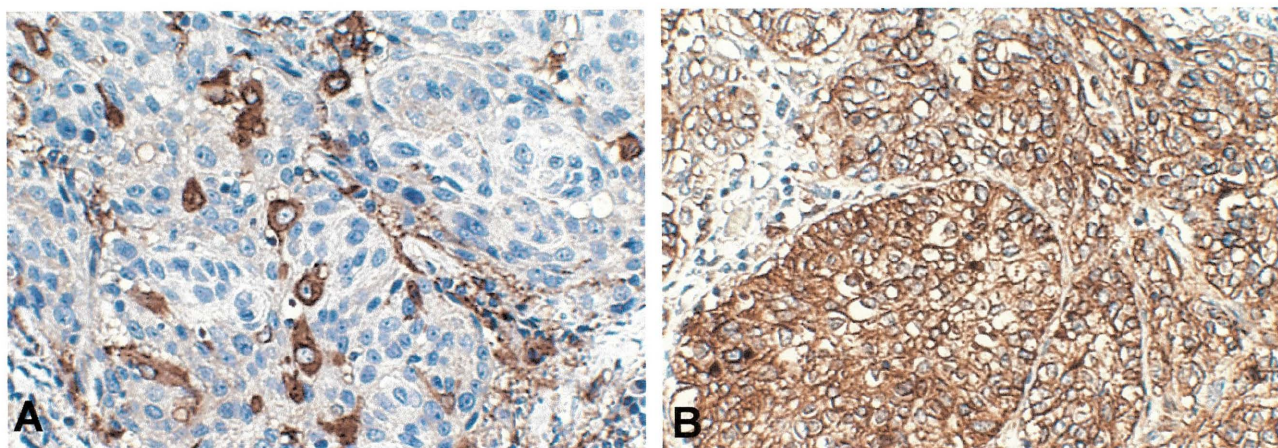


Figura 15: Imunoistoquímica para HLA-II. **A** - Caso de Carcinoma Epidermóide do Colo do útero negativo para HLA-II com presença de células dendríticas marcadas, aumento de 400X; **B** - Caso de CEC onde a grande maioria das células neoplásicas aparecem positivas para HLA-II (80% ou mais da lesão), aumento de 400X.

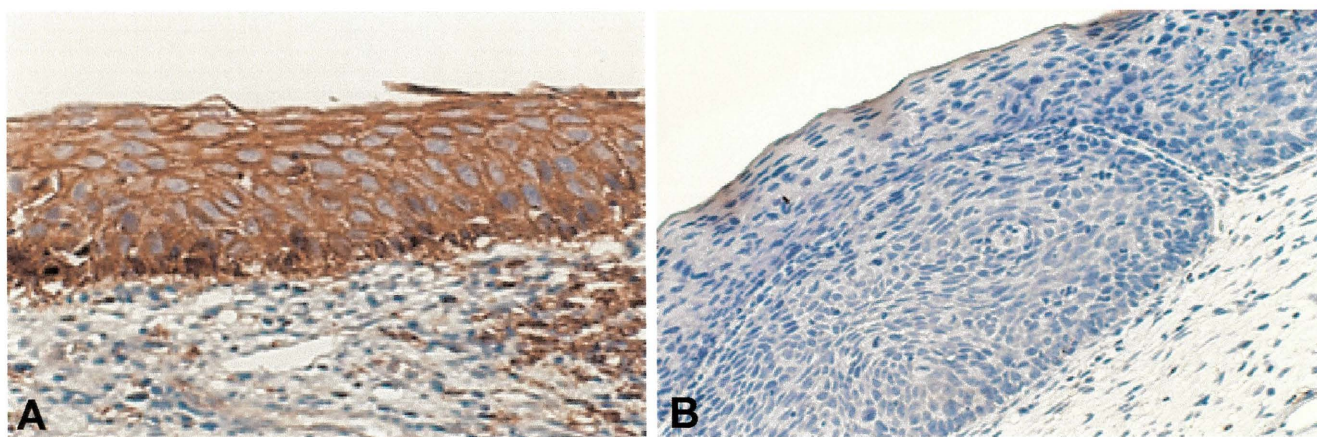


Figura 16: Imunoistoquímica para HLA-II. **A** - Caso de NIC-III predominantemente positivo, aumento de 200X; **B** - Caso de NIC-III negativo para HLA-II, aumento de 200X.

4.3.3 HLA de classe I e II nos tumores invasivos

Quando avaliados em conjunto, os resultados obtidos com os anticorpos anti-HLA-I e anti-HLA-II, observa-se diversos padrões de expressão destas moléculas nos casos de tumores invasivos e suas lesões precursoras. Sete casos de CEC (13,7%) apresentaram perda de expressão de HLA-I e ao mesmo tempo passaram a expressar HLA de classe II. Entretanto, ao analisar com cuidado cada área dos tecidos estudados observamos a ocorrência concomitante de células expressando HLA-I e II em 4 destes casos. Nestes casos especificamente o ganho de expressão das moléculas de classe II parece ocorrer antes que a célula perca a expressão das moléculas de classe I. Nos outros 3 casos houve perda de expressão de classe I em toda a lesão, assim como ganho de HLA-II.

Em 29,4% dos casos (15/51) de tumores invasivos, que incluem 2 adenocarcinomas e 13 CEC, foi possível observar perda de expressão das moléculas de classe I em quantidades significativas das lesões, porém estas células neoplásicas não passaram a expressar HLA-II. Baixo grau de perda de HLA-I foi observado em 11 casos (21,6%) do total de amostras analisadas, dentre os quais 8 deles não apresentaram ganho de HLA-II e 3 casos passaram a expressar estas moléculas. Apenas 5 casos (9,8%) não apresentaram perda nem ganho de HLA-I e II, respectivamente.

Aproximadamente 6% dos casos (3/51) avaliados perderam expressão de HLA de classe I, e no entanto, passaram a expressar HLA-II em pequenas proporções (menos de 40% da lesão). Dez casos (19,6%), incluindo 2 adenocarcinomas e 8 CEC, continuaram expressando as moléculas de

classe I, porém, passaram a expressar concomitantemente HLA de classe II. Estes casos compreendem 7 tumores que apresentaram ganho em porções significativas da lesão (em 80% ou mais das células neoplásicas, ou em 40-70% do total da área da lesão), e 3 casos nos quais houve ganho em pequenas quantidades.

4.3.4 HLA de classe I e II nas lesões precursoras do CCU

A grande maioria dos casos de NIC-I (19/20; 95%) apresentaram expressão de HLA de classe I nas células das camadas basal e supra-basal do epitélio, assim como não passaram a expressar HLA de classe II, mesmo padrão de expressão observado nas células epiteliais normais. Apenas um caso de NIC-I passou a expressar HLA-II em todas as células da lesão, apesar de não ter perdido a expressão das moléculas de classe I. Assim como os casos de NIC-I, 50% dos casos de NIC-II (6/12) continuaram expressando HLA de classe I sem expressar HLA-II. Nesta categoria também estão incluídos 11 casos de NIC-III (19,7%).

Os casos que perderam HLA de classe I na superfície das células neoplásicas, porém não ganharam expressão de HLA-II somam 19 amostras, sendo 16 casos de NIC-III e 3 NIC-II. Dentre estes casos, pudemos observar perda significativa da expressão destas moléculas em 11 casos; os demais (n=8) perderam HLA de classe I em pequenas quantidades da lesão. Ao contrário dos casos que não passaram a expressar HLA de classe II, foi observado ganho de expressão destas moléculas em 8 amostras de NIC-III que também perderam HLA-I. Os casos que passaram a expressar HLA de

classe II em pequenas proporções e perderam HLA-I de forma significativa somam 3 casos de NIC-III.

O total de casos que não perderam a expressão das moléculas de classe I e que passaram a expressar HLA de classe II, incluem 15 amostras de NIC-III, 3 casos de NIC-II e um NIC-I. Todos estes casos de NIC-I e II, assim como 9 casos de NIC-III, passaram a expressar HLA-II na superfície da maioria das células que compõem a lesão. No entanto, nos demais casos de NIC-III (n=6) a expressão de HLA-II foi observada em pequenas quantidades na lesão. Em uma última categoria enquadram-se 3 casos de NIC-III que perderam HLA de classe I em pequenas proporções no tumor, porém passaram a expressar HLA-II em grandes quantidades. Estes dados sugerem, como aqueles apresentados em alguns casos de tumores invasivos, que a expressão de HLA de classe II antecede a regulação negativa das moléculas de classe I pelas células tumorais. A figura 17 ilustra um caso de NIC-II que perdeu expressão de HLA-I e não expressa HLA-II, assim como casos de NIC-II positivos para ambas as moléculas.

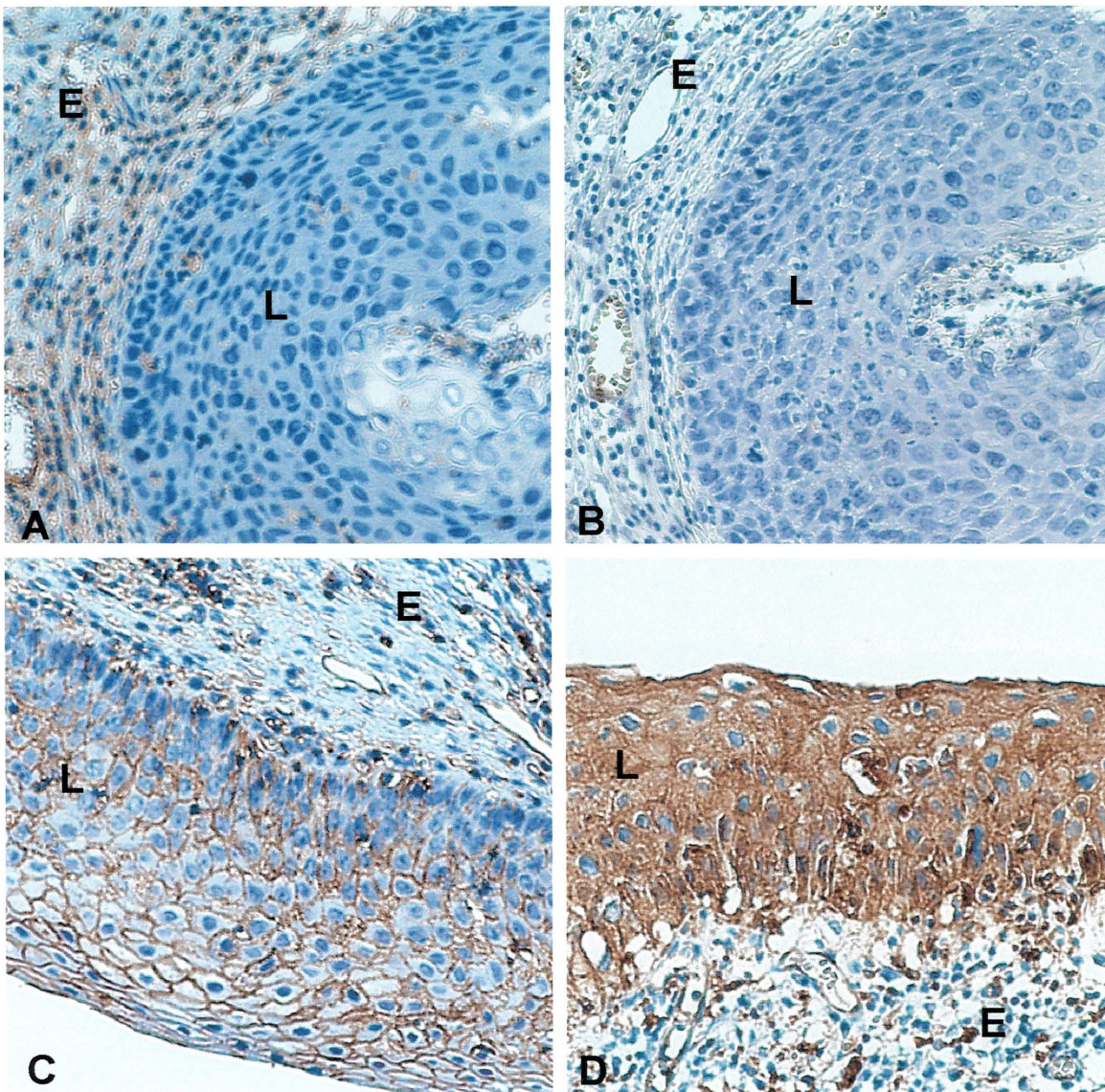


Figura 17: NIC-II submetido a IHQ para HLA. Em A e B temos um único caso de NIC-II que não expressa HLA de classe I (A) e de classe II (B) concomitantemente. Em C: caso positivo para HLA-I; Em D: caso positivo para HLA-II. L - lesão; E - estroma

4.4 ANÁLISE DOS INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS

A primeira análise dos infiltrados inflamatórios consistiu na caracterização do tipo de infiltrado que predomina dentro e fora (região do estroma peri-lesional) da lesão, conforme identificado na coloração com hematoxilina-eosina. Além disso, todos os casos de tumores invasivos e suas lesões precursoras foram submetidos a reação de IHQ para investigação dos marcadores CD3+ e CD8+, que detectam, respectivamente, linfócitos T em geral e T citotóxicos.

O infiltrado foi quantificado subjetivamente, conforme sua intensidade: – (ausência de infiltrado), + (infiltrado discreto), ++ (infiltrado moderado), +++ (infiltrado intenso), ++++ (infiltrado muito intenso). Se o tipo celular predominante é mononuclear o infiltrado pode ser classificado como linfocítico (presença apenas de linfócitos) ou linfoplasmocítico (presença de linfócitos e plasmócitos). Além disso, o infiltrado pode ser granulocítico, quando há presença de neutrófilos, e/ou eosinofílico (presença de eosinófilos). A distribuição do infiltrado foi classificada como difusa, focal ou multifocal. A figura 18 exemplifica diferentes tipos de infiltrados encontrados em casos de tumores invasivos.

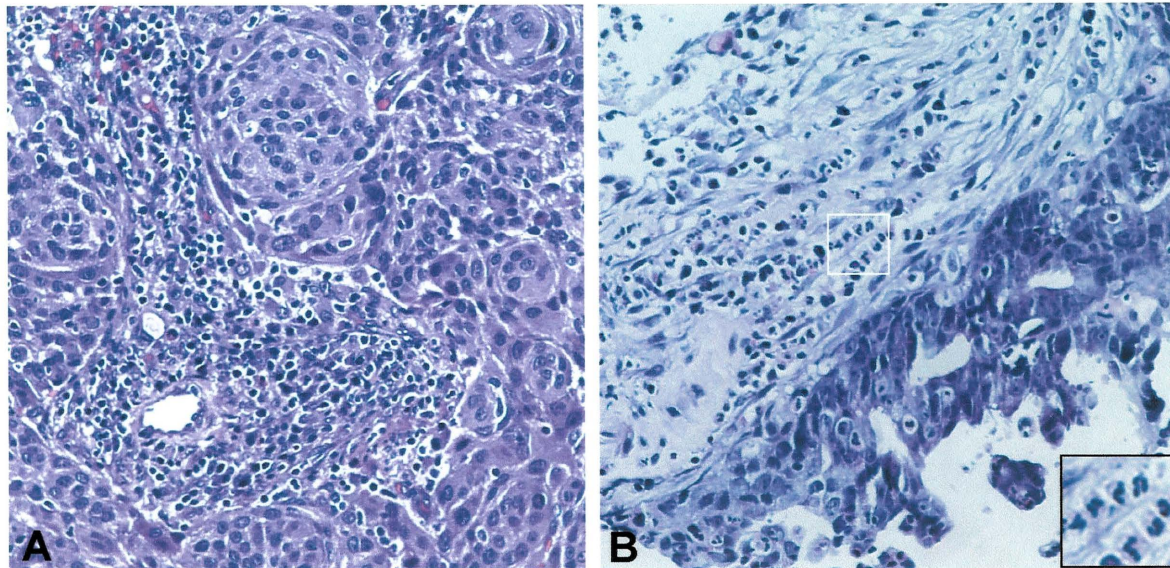


Figura 18: Infiltrado inflamatório em tecido corado com hematoxilina-eosina (aumento de 200X). Em **A**: caso de CEC com infiltrado intenso predominantemente linfocítico. Em **B**: caso de adenocarcinoma com infiltrado intenso predominantemente neutrofílico; no destaque notar células com núcleos lobulares (neutrófilos) em aumento de 400X.

Todos os casos de NIC-I apresentaram pouca quantidade de infiltrado peri-lesional, sendo sempre difusa sua distribuição, e com predomínio de linfócitos. Dentro da lesão observam-se raras células do sistema imune, também positivas para CD3+. De forma semelhante, os resultados obtidos com as amostras de NIC-II, mostraram predomínio de infiltrado inflamatório do tipo linfocítico (10/12; 83%); apenas 2 casos apresentaram infiltrado predominantemente linfoplasmocítico.

Dentre os casos de NIC-III houve predomínio do tipo linfoplasmocítico, observado em 32 das 56 amostras avaliadas (57%). Dentre estes 32 casos, 5 deles também apresentaram uma parcela de infiltrado do tipo granulocítico, porém em menor quantidade. As tabelas 8 e 9 resumem as análises dos infiltrados nas amostras de NIC-I e II, e NIC-III, respectivamente.

Tabela 8: Caracterização dos infiltrados inflamatório nos casos de NIC-I e II.

	<i>Distribuição</i>	<i>Linfocítico (%)</i>	<i>Linfoplasmocítico (%)</i>
NIC-I (n=20)	Difuso	19 (95%)	0
	Focal	0	1 (5%)
NIC-II (n=12)	Difuso	5 (41,7%)	1 (8,3%)
	Focal	5 (41,7%)	1 (8,3%)

Tabela 9: Distribuição e intensidade dos infiltrados predominantemente Linfocítico ou Linfoplasmocítico nas amostras de **NIC-III**.

<i>Distribuição</i>	<i>Intensidade</i>	<i>Linfocítico(%)</i>	<i>Linfoplasmocítico (%)</i>
Difuso	++++	0 (0)	1* (3,0)
	+++	1 (4,4)	11*** (33,3)
	++	3 (13,0)	8* (24,3)
	+	7 (30,4)	1 (3,0)
Focal	++++	0 (0)	2 (6,1)
	+++	1 (4,4)	2 (6,1)
	++	3 (13,0)	1 (3,0)
	+	2 (8,7)	1 (3,0)
Multifocal	++++	0 (0)	1 (3,0)
	+++	3 (13,0)	3 (9,1)
	++	2 (8,7)	2 (6,1)
	+	1 (4,4)	0 (0)
Total (n=56)		23 (100)	33 (100)

* um caso apresenta componente Granulocítico em menor quantidade (+)

*** três casos apresentam componente Granulocítico em menor quantidade (+)

Em geral, as amostras de tumores invasivos apresentaram maior quantidade de infiltrado inflamatório tanto no estroma que permeia a lesão quanto dentro do tumor. Como encontrado nos casos de NIC-III, houve predomínio do tipo linfoplasmocítico, pois 32 dos 51 casos (62,7%) analisados apresentaram maior quantidade de linfócitos e plasmócitos. Dentre estes casos, 4 deles também contém componente granulocítico, sendo um deles com predomínio de neutrófilos em relação aos linfócitos. Em 7 amostras foi observada a presença de eosinófilos, porém em menor quantidade.

Em 19 casos (37,3%) de tumores invasivos houve predomínio de infiltrado do tipo linfocítico, e em dois destes casos também encontramos componente neutrofílico. Em geral, as amostras de adenocarcinoma (5/6; 83,3%) apresentaram menor quantidade de infiltrado quando comparados com os casos de CEC; em apenas um destes casos foi observado infiltrado inflamatório intenso dos tipos linfocítico e granulocítico. Com relação a intensidade dos infiltrados nas amostras de tumores invasivos, apenas 4 dos 51 casos (7,8%) analisados apresentaram infiltrado inflamatório muito intenso, 2 do tipo linfocítico e 2 linfoplasmocítico, sendo todos casos de CEC. A grande maioria dos casos apresentou infiltrado inflamatório intenso ou moderado. A tabela 10 ilustra a análise quantitativa e qualitativa dos infiltrados nestes casos.

Tipos de Infiltrado e Intensidade

				Tipos de Infiltrado e Intensidade			
				Linfocítico	Linfoplasmodiário	Granulocítico	Eosinofílico
Caso	Diagnóstico	Distribuição	Estroma				
33	T57	CEC	difuso		+++	++	+
34	T58	CEC	difuso	+++			+
35	T59	CEC	difuso		++		
36	T63	CEC	multifocal	+			
37	T64	CEC	multifocal		++		
38	T66	Adeno	multifocal		++	++	
39	T67	CEC	multifocal		++		
40	T68	CEC	multifocal	++			
41	T69	CEC	difuso	++			+
42	3	CEC	multifocal		+++		
43	14	Adeno	difuso	+			
44	36	CEC	focal	++			
45	44	CEC	focal		+		
46	54	CEC	difuso		+++		
47	60	CEC	focal	++			
48	65	CEC	focal	++			
49	73	CEC	difuso		++		
50	78	CEC	difuso		+++		
51	83	CEC	multifocal		++++		

A análise dos marcadores CD3 e CD8 revelou que a quantidade de linfócitos presente no interior da lesão é pequena quando comparada com a quantidade de infiltrado peri lesional (estroma), tanto nos casos de tumores invasivos quanto nas lesões precursoras. Em aproximadamente 50% dos casos de CEC foram observados infiltrados moderados tanto de linfócitos T CD3+, assim como de células T CD8+ na região do estroma adjacente à lesão. No interior do tumor, a quantidade de linfócitos T CD3+ mostrou-se discreta na maioria dos casos de CEC (55,5%). Em apenas 2 destes casos observamos infiltrado intenso dentro da lesão. Em um único caso de CEC não foi possível avaliar a expressão de CD3, no entanto, neste mesmo caso foi detectado intenso infiltrado de linfócitos T CD8+ no interior do tumor. Os casos de adenocarcinomas apresentaram-se, na sua maioria, com infiltrados estromais discretos, porém ausentes no interior da lesão.

Nas lesões precursoras de baixo grau (NIC-I) foram observadas pequenas quantidades de linfócitos T CD3+, assim como das células T CD8+. Este infiltrado discreto na região peri-lesional é considerado comum nestes tecidos. Em apenas um caso de NIC-I, o infiltrado de células T CD3+ apresentou-se moderado. No interior da lesão, estas células estão ausentes em mais de 90% destes casos.

Dentre os casos de NIC-II, 7 das 12 amostras (58,3%) avaliadas apresentaram quantidades discretas de linfócitos T CD3+. Em apenas um caso (8,3%) foi observado infiltrado intenso de células T CD3+ e T CD8+ na região adjacente a lesão. E neste mesmo caso, quantidades moderadas destes linfócitos estão presentes no interior da lesão. Entretanto, na maioria

das amostras de NIC-II, as células T CD3+ e T CD8+ estão ausentes no interior da lesão.

Em 12 dos 56 casos de NIC-III (21,4%) foi observada grande quantidade de linfócitos T CD3+ no estroma adjacente ao tumor. No entanto, em apenas 4 destes casos foi detectado intenso infiltrado de linfócitos T CD8+ nesta região. Parte significativa dos casos de NIC-III, aproximadamente 40%, apresentou infiltrado discreto de células T CD3+ e T CD8+ na área peri-lesional. No interior destas lesões, os linfócitos T CD3+ e T CD8+ estão ausentes em 44,6% e 66,0%, respectivamente. Os dados obtidos nas reações de IHQ para moléculas CD3 e CD8 aparecem resumidos na tabela 11. As figuras 19 e 20 ilustram casos de NIC-III e CEC, respectivamente, submetidos a reação de IHQ com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD8.

Tabela 11: Quantificação dos linfócitos T CD3+ e T CD8+ nos casos de tumores invasivos do colo uterino e suas lesões precursoras.

Diagnóstico	Intensidade	CD3 N(%)		CD8 N(%)	
		<i>Estroma</i>	<i>Lesão</i>	<i>Estroma</i>	<i>Lesão</i>
CEC	+++	11 (24,5)	2 (4,5)	2 (4,5)	3 (6,7)
	++	23 (51,1)	4 (8,9)	22 (48,9)	3 (6,7)
	+	10 (22,2)	25 (55,5)	19 (42,2)	20 (44,4)
	-	0 (0)	13 (28,9)	2 (4,5)	19 (42,2)
	NA	1 (2,2)	1 (2,2)	0 (0)	0 (0)
Adenocarcinoma	+++	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	++	2 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	+	4 (66,7)	1 (16,7)	5 (83,3)	1 (16,7)
	-	0 (0)	5 (83,3)	1 (16,7)	5 (83,3)
NIC-III	+++	12 (21,4)	0 (0)	4 (7,1)	0 (0)
	++	21 (37,5)	0 (0)	18 (32,1)	1 (1,8)
	+	23 (41,1)	31 (55,4)	22 (39,3)	17 (30,4)
	-	0 (0)	25 (44,6)	11 (19,6)	37 (66,0)
	NA	0 (0)	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,8)
NIC-II	+++	1 (8,3)	0 (0)	1 (8,3)	0 (0)
	++	4 (33,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	1 (8,3)
	+	7 (58,3)	2 (16,7)	5 (41,7)	1 (8,3)
	-	0 (0)	9 (75,0)	4 (33,3)	10 (83,3)
NIC-I	+++	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	++	1 (5,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	+	19 (95,0)	2 (10,0)	2 (10,0)	1 (5,0)
	-	0 (0)	18 (90,0)	18 (90,0)	19 (95,0)

NA - não avaliável.

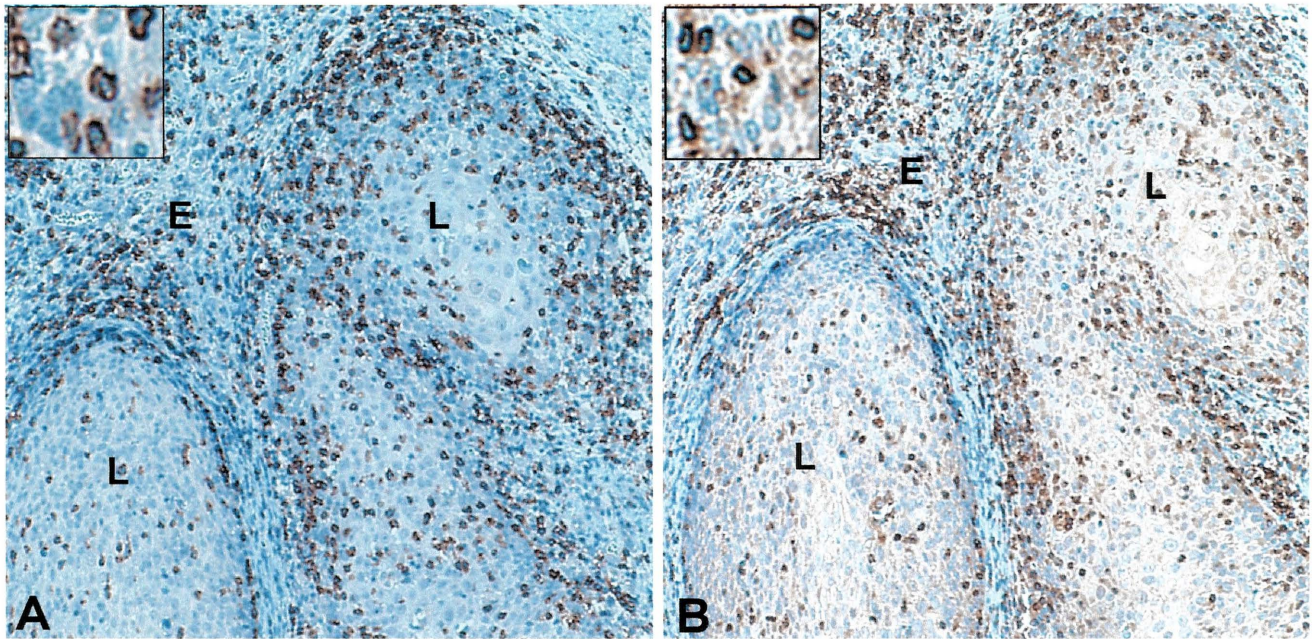


Figura 19: Caso de NIC-III submetido a reação de IHQ para os marcadores de linfócitos T (aumento de 100X). Em **A**: IHQ com anti-CD8; observar linfócitos T citotóxicos dentro e fora da lesão; no destaque, marcação de membrana de linfócitos T CD8+ no aumento de 400X. Em **B**: IHQ com o marcador de linfócitos T anti-CD3; em destaque, visualização da marcação de membrana em aumento de 400X. **L** - lesão e **E** - estroma.

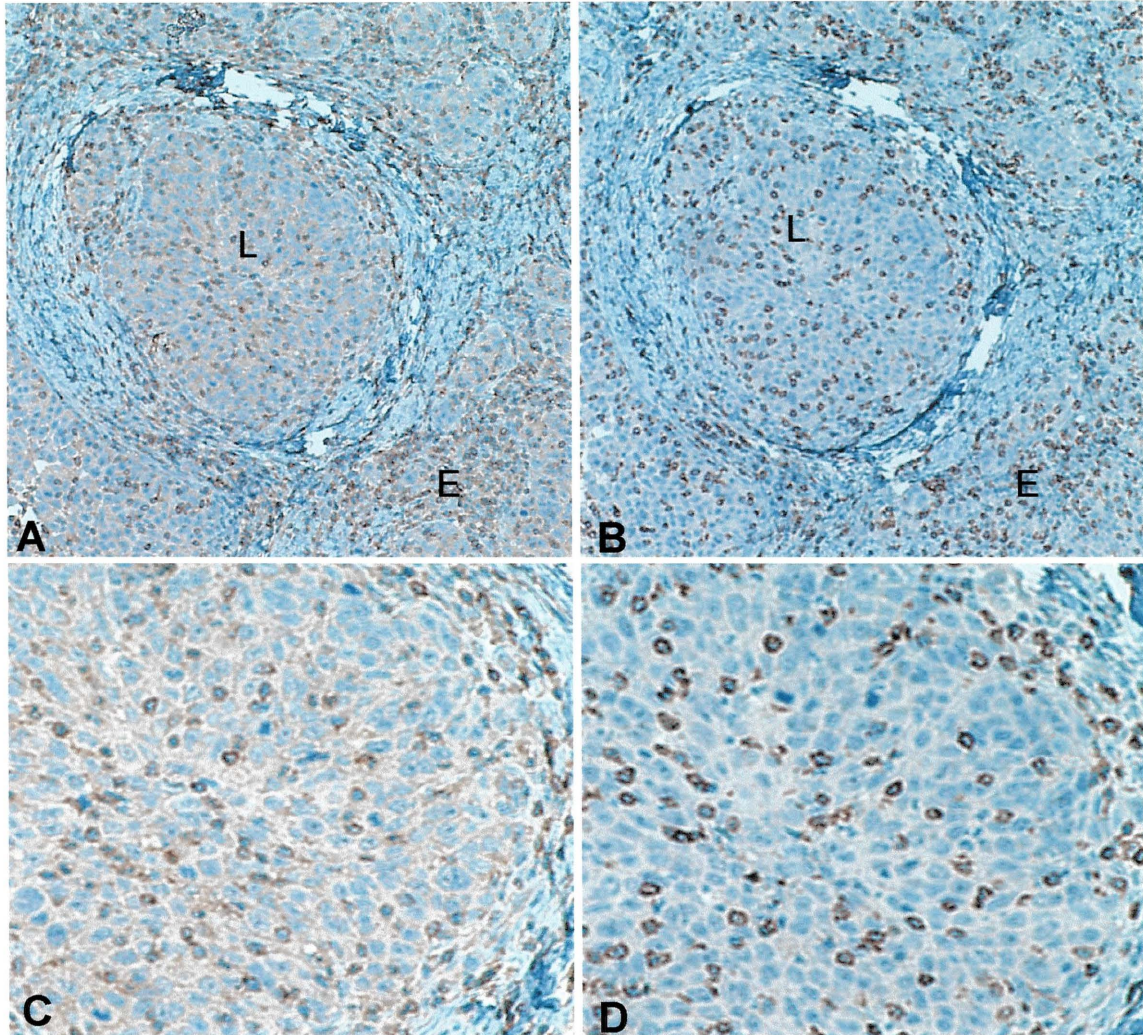


Figura 20: IHQ para os marcadores de linfócitos T em uma única amostra de CEC. Em **A** e **C**: reação de IHQ com anti-CD3 nos aumentos de 100X e 200X, respectivamente. Em **B** e **D**: IHQ com anti-CD8 nos aumentos de 100X e 200X, respectivamente.

4.5 EVOLUÇÃO DA DOENÇA

Os dados coletados nos prontuários médicos nos permitiram verificar que um total de 7 (7/51; 13,7%) mulheres portadoras de tumores invasivos do colo uterino apresentaram recidiva da doença ou faleceram devido ao câncer. Após análise da expressão das moléculas HLA e da caracterização dos infiltrados inflamatórios, pudemos observar que estes 7 casos apresentaram diferentes padrões de expressão de HLA de classe I e II na superfície das células neoplásicas. Entretanto, todas estas amostras apresentaram quantidades significativas de infiltrado inflamatório, assim como de células T CD3+ e T CD8+ no estroma adjacente a lesão. Cinco dos 7 casos apresentaram infiltrado predominantemente linfoplasmocítico intenso ou muito intenso nas regiões peri-lesionais. A quantidade de linfócitos T, assim como das células T citotóxicas apresentou-se moderada nestas áreas; em apenas um caso foi observada maior quantidade destes linfócitos no interior da lesão quando comparado com o estroma.

Com relação a expressão das moléculas HLA, 2 do total de 7 casos, apresentaram perda de expressão de HLA de classe I e ao mesmo tempo passaram a expressar HLA de classe II. Outros 2 também apresentaram perda de HLA-I, porém não passaram a expressar HLA-II. Dois deles não apresentaram alterações na expressão de ambas moléculas HLA, ou seja, foram positivos para HLA de classe I e negativos para HLA-II. E em um único caso, foi observado baixo grau de perda das moléculas de classe I, no entanto, passaram a expressar HLA de classe II em grandes quantidades.

Dessa forma, não foi possível estabelecer nenhuma relação com a evolução clínica destas pacientes, uma vez que não foi observado um único padrão de expressão das moléculas HLA por estas células tumorais.

4.6 TIPAGEM DE HLA-A

As 647 amostras de DNA provenientes do Estudo Prospectivo Ludwig-McGill, cujo gene HLA-A foi amplificado conforme descrito em Materiais e Métodos, foram submetidas a hibridização com 45 sondas específicas para este gene. Estas sondas nos permite identificar 21 grupos que englobam os 396 alelos HLA-A descritos até o momento. O total de mulheres tipadas para HLA-A somam 571, pois 76 delas não tiveram suas tipagens concluídas.

Em nossa casuística foi observado predomínio de mulheres portadoras de alelos do grupo A*02 (168/571; 29,4%). Do total de mulheres portadoras de A*02, 40,5% delas são homozigotas para este grupo. As heterozigotas são principalmente portadoras do genótipo A*02/A*03 e A*02/A*68. Além do grupo A*02, os grupos A*23, A*24, A*31 e A*68 também aparecem com frequência significativa em nossa casuística. Apenas uma mulher apresenta o alelo A*6901. Não foram encontrados os alelos A*4301 e A*8001 na população analisada. O total de heterozigotas constituem 75% das mulheres tipadas para HLA-A.

Além da avaliação da frequência dos grupos de alelos HLA-A em nossa casuística, foi realizada uma análise que relaciona a frequência de mulheres infectadas por HPV ao longo do Estudo Prospectivo Ludwig-McGill e os alelos HLA-A encontrados nesta casuística. A tabela 12 ilustra os resultados da tipagem de HLA-A encontrados no total de mulheres analisadas, assim como nas mulheres infectadas por HPV ao longo do tempo de acompanhamento do estudo. O tipo de HPV presente nestas mulheres,

assim como a detecção de infecção transiente ou persistente não foram considerados, uma vez que a análise epidemiológica completa destes dados ainda não foi realizada. O elevado número de mulheres positivas para HPV é reflexo de uma seleção de amostras do estudo de coorte como estratégia de análise epidemiológica que será realizada após a tipagem de HLA-B.

A tipagem do gene HLA-B será realizada para que em conjunto com os dados dos polimorfismos de HLA-A e HLA de classe II sejam concluídos em uma ampla análise epidemiológica, para enfim serem reunidos com todas as variáveis analisadas no estudo Ludwig-McGill.

Tabela 12: Frequência dos grupos de alelos HLA-A na coorte Ludwig-McGill.

HLA-A	HPV-positivas (%)^a	HPV-negativas (%)^b	Total (%)^c
A*01	22 (6,0)	11 (5,4)	33 (5,8)
A*02	111 (30,2)	56 (27,5)	168 (29,4)
A*03	28 (7,6)	16 (7,8)	44 (7,8)
A*11	28 (7,6)	31 (15,2)	59 (10,3)
A*23	44 (12,0)	22 (10,8)	66 (11,6)
A*24	43 (11,7)	31 (15,2)	75 (13,1)
A*25	13 (3,5)	1 (0,5)	14 (2,5)
A*26	24 (6,5)	8 (3,9)	31 (5,4)
A*29	29 (7,9)	20 (9,8)	50 (8,8)
A*30	33 (9,0)	14 (6,9)	49 (8,6)
A*31	54 (14,7)	21 (10,3)	75 (13,1)
A*32	17 (4,6)	14 (6,9)	31 (5,4)
A*33	25 (6,8)	16 (7,8)	41 (7,2)
A*34	13 (3,5)	10 (4,9)	22 (3,9)
A*36	2 (0,5)	1 (0,5)	3 (0,5)
A*66	9 (2,5)	1 (0,5)	11 (1,9)
A*68	49 (13,4)	29 (14,2)	78 (13,7)
A*69	1 (0,3)	0 (0)	1 (0,2)
A*74	9 (2,5)	9 (4,4)	18 (3,2)
A*80	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	367	204	571

Total: corresponde ao número de mulheres tipadas para HLA-A após as reações de hibridização; **a:** porcentagem baseada no número de mulheres HPV-positivas tipadas para HLA-A (367); **b:** porcentagem com base no total de mulheres HPV-negativas tipadas para HLA-A; (204); **c:** cálculo da porcentagem baseado no número total de mulheres tipadas para HLA-A (571).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram algum grau de perda de expressão das moléculas HLA de classe I em grande parte dos casos de tumores invasivos do colo uterino (36/51; 70,6%). Estes dados, somados aos resultados encontrados na literatura mostram diferentes freqüências nas taxas de regulação negativa das moléculas de classe I em casos de câncer de colo do útero. Estas diferenças se devem provavelmente as diferentes técnicas empregadas pelos pesquisadores (CONNOR e STERN, 1990; KEATING et al. 1995, HICKLIN et al. 1999; KOOPMAN et al. 2000) e à diversidade étnica das pacientes avaliadas. Além disso, os anticorpos utilizados nestes estudos diferem quanto a capacidade de reconhecer as moléculas de classe I referentes aos alelos HLA-A, B e C. O anticorpo empregado em nosso estudo reconhece principalmente moléculas codificadas pelos genes HLA-B e C, embora não seja capaz de detectar todas as moléculas já descritas codificadas pelos diferentes alelos destes loci. Este anticorpo não é eficiente na detecção de moléculas HLA-A, assim, a ausência de expressão das moléculas de classe I não necessariamente significa perda total destas moléculas na superfície das células, podendo ser resultado da incapacidade de detecção de determinadas moléculas HLA-I por este anticorpo.

Apesar da elevada freqüência de casos de tumores invasivos (70,6%) que apresentaram ausência de expressão de HLA-I em diferentes quantidades, aproximadamente 25% das amostras (13/51) apresentaram

baixo grau de perda de expressão. Estes casos (n=13) somados com as amostras positivas para HLA de classe I (n=15) constituem 55% do total de tumores invasivos avaliados neste estudo. Dessa forma, a perda acentuada de expressão de HLA-I foi detectada em 45% das amostras, em contraste com outros estudos que demonstraram maior frequência de perda destas moléculas em lesões do colo uterino (HILDERS et al. 1994; KEATING et al. 1995; KOOPMAN et al. 2000). Esta diferença poderia ser atribuída a utilização de diferentes anticorpos nestes estudos. Como citado anteriormente, o anticorpo empregado em nosso trabalho é capaz de detectar grande número de moléculas HLA-B e -C. Embora a utilização deste anticorpo, que detecta pequeno número de moléculas HLA-A, possa gerar dúvida com relação a ausência de expressão destas moléculas na superfície das células neoplásicas, sua capacidade de reconhecer grande quantidade de moléculas HLA-B e -C, pode não identificar a perda de expressão de algumas destas moléculas que eventualmente possa ocorrer nestas células. Apesar das desvantagens apontadas com relação a utilização deste anticorpo, estes dados indicam que a ausência de expressão de HLA-I identificada com este anticorpo é consistente, uma vez, que estas células não apresentam qualquer sinal de expressão no tecido tumoral, mesmo sendo capaz de detectar grande número de moléculas HLA-B e -C. Vale ressaltar que em todos os casos analisados foi detectada expressão de HLA de classe I em algumas células presentes no estroma.

A maior parte dos estudos descritos na literatura que avaliaram HLA de classe I em carcinoma de colo uterino empregaram anticorpos específicos

capazes de reconhecer moléculas codificadas por determinados alelos HLA-A, B ou C. Por exemplo, os anticorpos anti-HLA-A2, -A3, -Bw4 (CONNOR e STERN, 1990), e anti-Bw6, -B7, -B8, -B12, -A30, -A32, entre outros, foram empregados por KEATING e colaboradores (1995). No entanto, estes estudos realizaram análise *in situ* das moléculas HLA sem tipagem prévia dos genes de classe I. Outra característica destes estudos compreende a análise da expressão de componentes da maquinaria de apresentação de antígenos (APM), como TAP-1 (CROMME et al. 1994), TAP-2, LMP-2, LMP-7, β_2 -microglobulina, calnexina, entre outros marcadores capazes de identificar problemas no processo de apresentação de peptídeos antigênicos às células T CD8+ (RITZ et al. 2001).

A análise de expressão da proteína TAP em diversos tipos de células tumorais tem gerado indícios de que a transformação de células neoplásicas é freqüentemente acompanhada pela regulação negativa da expressão destas proteínas (KAKLAMANIS et al. 1995; MURRAY et al. 1998). Além disso, foi observada maior taxa de regulação negativa de TAP-1 em amostras de tumores invasivos primários, assim como em metastáticos, de colo do útero, quando comparados com outros tipos tumorais (revisado por HICKLIN et al. 1999). Em câncer de mama, a regulação negativa de TAP foi relacionada com a graduação do tumor (VITALE et al. 1998). Já em melanomas, este fenótipo foi identificado como marcador de pior prognóstico da doença (KAGESHITA et al. 1999). Em estudo publicado na literatura, foi demonstrado que a regulação negativa de TAP pode ser ocasionada pela presença de níveis elevados de IL-10 (ZEIDLER et al. 1997). Esta citocina,

de caráter inibitório, tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que aparece expressa em diferentes tumores promovendo redução da função de TAP, e conseqüentemente reduzindo a expressão de HLA de classe I e diminuindo a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8+. No entanto, a IL-10 parece aumentar a citotoxicidade mediada por células *natural killer* (NK) (PETERSSON et al. 1998).

Alternativamente à perda de expressão das moléculas HLA de classe I na superfície das células neoplásicas, estas células passam a ser mais susceptíveis a lise mediada pelas células NK. As células NK apresentam receptores inibitórios (KIR) em suas superfícies, capazes de interagir com determinadas moléculas HLA-I e inibindo a lise da célula apresentadora pela ação da NK. Por isso, embora a perda total de moléculas de classe I na superfície das células neoplásicas confira resistência a lise mediada por linfócitos T citotóxicos e maior susceptibilidade a lise mediada por células NK, a perda seletiva destas moléculas pode promover o desenvolvimento de um fenótipo pelas células tumorais tornando-as resistentes a ambas as respostas (revisado por REES e MIAN, 1999). A expressão de moléculas de classe I HLA-G, -E ou -F, pode gerar sinais inibitórios às células NK, através da interação com os KIRs (RUIZ-CABELLO et al. 1998); moléculas HLA-B e -C também podem interagir com estes receptores (D'ANDREA et al. 1995). Além disso, alguns vírus são capazes de codificar proteínas homólogas a determinadas moléculas HLA de classe I que inibem a ação das células NK (KARRE et al. 1997). Estas e outras características das moléculas de classe I sugerem que a mínima perda da expressão destas moléculas na superfície

das células pode conferir vantagens para o desenvolvimento e manutenção de tumores, uma vez que estas células passam a serem capazes de evadir o sistema imune.

A perda de expressão das moléculas de classe I em lesões precursoras do colo do útero não tem sido amplamente abordada na literatura. TORRES et al. (1993) observaram a expressão de HLA-I em 100% dos casos de NIC de alto e baixo grau analisados em seu trabalho, enquanto 15% e 20% dos casos de carcinomas invasivos apresentaram perda total e parcial, respectivamente, da expressão de HLA-I, sugerindo ser um evento tardio no processo de carcinogênese. No entanto, o pequeno número de casos avaliados neste trabalho nos confere vantagem devido ao número significativo de casos de carcinomas invasivos e lesões precursoras em nossa casuística.

Em nossa análise pudemos observar que a maioria dos casos de NIC-I apresentaram-se positivos para HLA de classe I nas células das camadas basais e supra-basais, padrão semelhante ao observado em epitélio normal. Estes dados sugerem que, em geral, a ausência de expressão destas moléculas não ocorre precocemente no processo de desenvolvimento tumoral. Entretanto, um estudo realizado por BONTKES et al. (1998b) sugere que a regulação negativa de moléculas específicas de classe I, como HLA-B*44, seja um evento precoce no desenvolvimento do carcinoma de colo uterino. Estes autores pressupõem que este fenótipo possa exercer um papel importante na progressão destas neoplasias constituindo um possível mecanismo de evasão do sistema imune. Neste trabalho, os autores

avaliaram 88 mulheres envolvidas num estudo prospectivo, e após tipagem sorológica, foram realizadas reações de IHQ específicas para a molécula HLA-B*44 em tecidos obtidos de biópsias. Os resultados obtidos permitiram identificar a ausência de moléculas B*44 em lesões (NIC-III) que progrediram, em contraste com mulheres portadoras de lesões que não progrediram. Em nosso estudo, os casos de NIC-III que apresentaram perda acentuada de HLA-I (em 80% ou mais da lesão ou perda entre 40-70% das células tumorais) constituem 34% das amostras (19/56). Os casos positivos para estas moléculas somam 26 das 56 analisadas (46,4%), sugerindo que a ausência de expressão das moléculas de classe I parece não ocorrer precocemente no desenvolvimento de lesões do colo uterino associadas ao HPV.

Em 10 casos de tumores invasivos, incluindo um adenocarcinoma, foi observada perda de expressão das moléculas de classe I na superfície das células neoplásicas, porém, estas moléculas aparecem expressas no citoplasma destas células. Dados da literatura sugerem um possível mecanismo para retenção de HLA-I no citoplasma das células tumorais infectadas por HPV (ASHRAFI et al. 2005). A proteína E5 codificada por papilomavírus de bovinos (BPV) é capaz de regular negativamente as moléculas MHC de classe I (ASHRAFI et al. 2002), mantendo-as retidas no Complexo de Golgi das células infectadas (MARCHETTI et al. 2002). Mecanismo semelhante, foi demonstrado com a proteína E5 de HPV-16 em estudo realizado por ASHRAFI et al. em 2005. Além disso, este estudo revelou a regulação negativa seletiva de moléculas HLA-A e -B nas células

que expressam E5, não alterando o transporte de moléculas HLA-C e -E para a superfície das células infectadas. Estes dados sugerem um possível mecanismo de evasão do sistema imune desenvolvido pelo HPV presente em alguns dos casos de tumores invasivos analisados neste trabalho.

A perda de expressão de HLA-I pelas células neoplásicas acompanhada de ganho da expressão das moléculas de classe II também tem sido sugerida como um possível mecanismo de escape do sistema imune, e demonstrada por diversos autores em diferentes tipos tumorais, como câncer de mama (REDONDO et al. 2003), carcinoma de tireóide (KNOLL et al. 1997), inclusive em lesões de colo uterino (GLEW et al. 1992; CHIL et al. 2003). A expressão de HLA de classe II em epitélios normais é detectada apenas nas células de Langerhans (células apresentadoras de antígenos profissionais, APC), no entanto, em nosso estudo, a análise de expressão destas moléculas revelou que aproximadamente 45% dos casos de tumores invasivos apresentaram algum grau de positividade destas moléculas na superfície das células neoplásicas, como sugerido por GLEW et al em 1992.

A expressão de determinadas moléculas de classe II tem sido associada a diferença de prognóstico em alguns tipos tumorais. Em casos de carcinoma de laringe, a expressão de HLA-DR foi associada a um excelente prognóstico (ESTEBAN et al. 1990); de forma semelhante, a expressão das moléculas HLA de classe II em carcinomas de tireóide parece prevenir o aparecimento de metástases (KNOLL et al. 1997), entretanto, em melanoma, HLA-II parece ser marcador de progressão da doença (MORETTI et al.

1997), e em tecido mamário, a expressão destas moléculas está associada ao grau de diferenciação histológico da lesão (CONCHA et al. 1995). No entanto, o significado biológico da expressão destas moléculas pelas células tumorais do colo uterino associadas a infecção pelo HPV ainda é desconhecido.

Em geral, os casos de lesões precursoras analisados neste trabalho, apresentaram-se negativas para HLA-II. Entretanto, 34% dos casos de NIC-III passaram a expressar estas moléculas em quantidades significativas no tecido. A frequência de expressão destas moléculas observada em nossa casuística supera os resultados encontrados por CHIL et al (2003). Estes pesquisadores avaliaram um pequeno número de lesões precursoras, assim como de tumores invasivos, além de suas análises terem sido realizadas apenas com anticorpo anti-HLA-DR. Já o anticorpo empregado em nosso estudo é capaz de detectar moléculas codificadas pelos genes HLA-DR, -DQ e -DP, possibilitando ampla identificação de alterações na expressão destas moléculas de classe II tanto em casos de lesões precursoras, quanto nos casos de CEC e adenocarcinomas.

A expressão concomitante das moléculas HLA de classe I e II observada em alguns casos de tumores invasivos e NIC-III, sugere que o ganho de expressão de HLA-II antecede a perda de expressão de HLA-I. Apesar da identificação de células tumorais que passaram a expressar HLA-II, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos neste tipo de resposta. Tal expressão, na ausência de moléculas co-estimulatórias (B7-1 e

B7-2), necessárias para ativação dos linfócitos T CD4+, poderia constituir um possível mecanismo de evasão do sistema imune pelas células tumorais.

A expressão de HLA de classe II em células tumorais pode ser estimulada, por exemplo, após tratamento com INF- γ , INF- α , IL-2 e TNF (SALTER et al. 1995; MARTH et al. 1996; ANDALIB et al. 1997). Além disso, a transformação por vírus, como o vírus Epstein-Barr (EBV), pode induzir a expressão de moléculas HLA-DR em células de carcinoma de nasofaringe (KOUVIDOU et al. 1995). A expressão destas moléculas pelas células neoplásicas tem sido associada como marcador de progressão tumoral, em casos de melanoma (MORETTI et al. 1997) e carcinomas adrenocorticais (MARX et al. 1996); e prediz um pior prognóstico quando associada com a expressão da cadeia invariante (CLIP) em células de pacientes com leucemia mieloide aguda (CHAMULEAU et al. 2004). No entanto, devido a existência de resultados conflitantes na literatura, os estudos que analisam a expressão destas moléculas em tumores não linfóides são de extrema importância para o entendimento do significado clínico deste fenótipo.

A análise dos infiltrados inflamatórios revelou discreta quantidade de infiltrado no estroma peri-lesional nas amostras de lesões precursoras de baixo grau (NIC-I), assim como nos casos de NIC-II. Entretanto, as amostras de carcinoma *in situ* (NIC-III) e de tumores invasivos apresentaram infiltrados predominantemente linfocítico ou linfoplasmocítico em quantidade relevantes. Porém, no interior das lesões, este infiltrado é discreto na maioria dos casos. As quantidades de células TCD3+, assim com as de células T citotóxicas (CD8+) aparecem em proporções semelhantes no estroma adjacente a

lesão, no entanto, no interior do tumor estas células comumente são mais raras. Na maioria dos casos de CEC foi observado infiltrado discreto de linfócitos T CD3+ e T CD8+ no interior da lesão, e em apenas 6 dos 51 casos, a presença destas células dentro do tumor foi acentuada. As elevadas quantidades de células T CD8+ nestas lesões estão de acordo com os dados publicados por GLEW et al. (1992).

Em estudo realizado por HILDERS et al. em 1995, foi observada redução de linfócitos T CD8+ em lesões metastáticas de colo do útero, nas quais houve perda de expressão de HLA de classe I. Em casos de câncer de mama, a presença de linfócitos T CD3+ parece estar relacionada com a expressão de determinadas moléculas HLA-DR (OLDFORD et al. 2004). De forma semelhante, a presença destes linfócitos em casos de carcinomas de tireóide também parece estar associada a expressão de moléculas de classe II pelas células tumorais (KNOLL et al. 1997). No entanto, ainda existem controvérsias com relação ao tipo de infiltrado predominante e o papel das células do sistema imune no controle do desenvolvimento do câncer de colo do útero (FERGUSON et al. 1985; COLEMAN et al. 1994; DAVIDSON et al. 1997).

Os dados encontrados neste estudo sugerem o importante papel das células T CD8+ na resposta contra o desenvolvimento de lesões associadas ao HPV. Muitos trabalhos da literatura têm descrito inúmeros peptídeos gerados a partir de proteínas codificadas pelo HPV que são apresentados por moléculas HLA de classe I aos linfócitos T citotóxicos (RESSING et al. 1995; NIMAKO et al. 1997; MONROY-GARCIA et al. 2002; BOURGAULT et

al. 2000; CHENG et al. 2005; OERKE et al. 2005). Entretanto, em estudo realizado por BAUER et al. (2000), um peptídeo gerado a partir da proteína E7 de HPV-16 se mostrou imunogênico, porém não processado e apresentado naturalmente pelas células infectadas pelo vírus. A molécula de classe I referente ao HLA-A*02 parece ser importante no processo de apresentação de peptídeos virais (RESSING et al. 1995; SCHOLTEN et al. 2005; CHENG et al. 2005), no entanto, alguns estudos também têm demonstrado a importância das moléculas HLA-B na resposta mediada pelos linfócitos T CD8+ contra infecção pelo HPV (BOURGAULT et al. 2000; MONROY-GARCIA et al. 2002; OERKE et al. 2005).

A resposta mediada pelas células T CD4+ exerce papel fundamental na resposta contra o HPV (HOHN et al, 2000; revisado por LUXTON e SHEPHERD, 2001). Portanto as moléculas HLA de classe II também têm sido alvo de muitos estudos que visam a identificação de peptídeos virais potencialmente apresentados por estas moléculas (HOHN et al, 1999; DE JONG et al, 2004; FACCHINETTI et al, 2005). Estes estudos têm gerado boas perspectivas para o desenvolvimento de imunoterapias no controle do câncer de colo do útero (DE JONG et al. 2005).

A importância das moléculas HLA de classe I e II no desenvolvimento de lesões do colo uterino associadas ao HPV não tem sido apenas relacionada à expressão *in situ* destas moléculas e à ativação de uma resposta imune eficaz mediada por linfócitos T, mas também em estudos de associação que visam identificar polimorfismos nos genes que codificam estas moléculas presentes em mulheres infectadas pelo HPV com maior ou

menor risco de desenvolverem doença (DE ARAÚJO SOUZA e VILLA, 2003; ZOODSMA et al. 2005b).

Os polimorfismos dos genes que codificam determinadas moléculas HLA de classe II parecem estar associados ao risco de infecção persistente, assim como com maior risco de desenvolvimento de lesões no colo uterino (APPLE et al. 1994; GREGOIRE et al. 1994; ALLEN et al. 1996; MACIAG et al. 2000; MADELEINE et al. 2002; ZOODSMA et al. 2005a). Em estudo realizado em nosso laboratório, foram encontradas associações entre o haplótipo HLA-DRB1*0301-DQB1*0201 e menor risco de infecção persistente pelo HPV, assim como maior risco deste tipo de infecção em mulheres portadoras dos haplótipos HLA-DRB1*1601-DQB1*0502 e HLA-DRB1*0807-DQB1*0402 (MACIAG et al. 2002). No entanto, há controvérsias com relação ao papel destes polimorfismos no risco de desenvolvimento de doença em algumas populações (GLEW et al. 1993).

Os estudos de polimorfismos dos genes HLA de classe I são encontrados na literatura em menor quantidade, uma vez que estes genes são muito mais polialélicos dificultando suas tipagens. No entanto, algumas associações já foram descritas com estes alelos e risco de desenvolvimento de lesões associadas à infecção pelo HPV (HILDESHEIM e WANG, 2002).

Estudos de coortes identificaram aumento do risco de desenvolvimento do carcinoma de colo uterino em mulheres portadoras dos alelos B*07 e DQB1*0302 (HILDESHEIM et al. 1998; WANG et al. 2001) em populações dos Estados Unidos e Costa Rica. Outros autores identificaram a presença de HLA-B*07 em desequilíbrio de ligação com os alelos

DQB1*0602 e DRB1*1501 associados com o processo de evasão do sistema imune pelas células infectadas por HPV-16 (ELLIS et al. 1995). Enquanto a presença do alelo DQB1*1301 assim como a do alelo CW*0202 parecem estar associados à redução do risco de doença (WANG et al. 2001, WANG et al. 2002) em determinadas populações. Em estudo realizado na Suécia, foram observadas associações entre os alelos HLA-B*44, -B*51 e -B*57 e infecção por determinada variante de HPV-16 em mulheres com maior risco de desenvolvimento de lesões no colo uterino. Neste mesmo estudo, foi verificado menor risco de infecção por HPV-16 em mulheres portadoras de HLA-B*15 (ZEHBE et al. 2003). Entretanto, este trabalho avaliou pequeno número de mulheres (n=27), o que diminui a consistência destes dados. Recentemente, um estudo de coorte realizado com mulheres norte americanas, observou uma taxa significativa de regressão espontânea de lesões de alto grau (NIC-II e III) em mulheres portadoras do alelo HLA-A*0201 (TRIMBLE et al. 2005). Dessa forma, dados da literatura têm gerado, cada vez mais, evidências de que os polimorfismos dos genes HLA exercem influência na resposta imune contra o desenvolvimento de infecções persistentes pelo HPV e de lesões no colo uterino.

Em nosso estudo, ainda não foi realizada a análise estatística completa dos resultados coletados a partir da tipagem de HLA-A, por isso, os dados epidemiológicos não aparecem aqui descritos. Na tipagem do gene HLA-A foi observada maior frequência do grupo HLA-A*02 em nossa casuística, dado semelhante ao encontrado em estudo que analisou a frequência dos polimorfismos de HLA de classe I na população da cidade de

São Paulo (ROSALES et al. 1992), assim como na cidade de Curitiba no estado do Paraná (BRAUN-PRADO et al. 2000).

A baixa frequência de mulheres heterozigotas em nossa casuística (75%) é devido provavelmente a análise de baixa resolução que determina apenas grupos de alelos HLA-A. Em geral, a frequência de heterozigosidade é em torno de 95% (BRAUN-PRADO et al. 2000) quando realizadas análises de alta resolução para identificação de alelos específicos.

Nossos resultados mostram maior frequência do grupo HLA-A*11 em mulheres negativas para HPV (15,2%) quando comparadas com as positivas (7,6%). Este resultado sugere um possível envolvimento destes alelos no processo de infecção por HPV, no entanto, estes dados serão eventualmente confirmados após análise epidemiológica detalhada.

Os dados de polimorfismos de HLA, apesar de ainda preliminares, são de extrema importância para o entendimento da história natural do HPV em mulheres portadoras de diferentes haplótipos HLA. A diversidade das moléculas HLA nas populações como um todo, parece determinar a susceptibilidade ao desenvolvimento de inúmeras doenças, e no caso, dos tumores de colo do útero associados ao HPV, será fundamental para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas, já que uma resposta diferenciada em indivíduos portadores de determinados alelos HLA têm sido descrita por diversos trabalhos na literatura. As vacinas profiláticas parecem não serem influenciadas pela presença de determinados polimorfismos de HLA, uma vez que foi comprovada sua eficiência na proteção contra determinados tipos

de HPV numa população bastante heterogênea recrutada em diferentes continentes (VILLA et al. 2005).

Os resultados obtidos em nosso estudo indicam que as moléculas HLA influenciam a resposta imune contra o desenvolvimento de tumores do colo do útero. A perda de expressão das moléculas HLA de classe I, assim como o ganho de expressão das moléculas de classe II na superfície das células neoplásicas, estão de acordo com alguns dados descritos na literatura. No entanto, ainda são necessários estudos que desvendem os mecanismos envolvidos nestes processos, visando o desenvolvimento de terapias eficazes no combate ao crescimento destas lesões.

6 CONCLUSÕES

- 1 A perda de expressão das moléculas HLA de classe I na superfície das células tumorais foi observada em 70% dos casos de tumores invasivos e em 53% dos casos de NIC-III.
- 2 Aproximadamente 45% dos casos de tumores invasivos passaram a expressar HLA de classe II na superfície das células neoplásicas , assim como 52% dos casos de NIC-III.
- 3 A expressão de HLA de classe II parece anteceder a perda de expressão das moléculas de classe I, uma vez que em grande parte dos casos foi observada expressão concomitante destas moléculas.
- 4 As lesões precursoras de baixo grau (NIC-I) não apresentaram perda de expressão de HLA-I, apresentando-se positivas nas células das camadas basais e supra-basais do epitélio, sendo também negativas para HLA-II. Padrão de expressão destas moléculas é semelhante ao encontrado nos epitélios normais.
- 5 A tipagem de HLA-A foi concluída, mostrando predomínio do grupo HLA-A*02 na população analisada, no entanto, a análise epidemiológica que relaciona infecção transiente e persistente pelo HPV e risco de desenvolvimento de doença ainda não fora realizada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Lichtman AL. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: Elsevier Science; 2000. The Major Histocompatibility Complex; p.65-80.

Allen M, Kalantari M, Ylitalo N, et al. HLA DQ-DR haplotype and susceptibility to cervical carcinoma: indications of increased risk for development of cervical carcinoma in individuals infected with HPV 18. **Tissue Antigens** 1996; 48:32-7.

Andalib AR, Lawry J, Ali SA, et al. Cytokine modulation of antigen expression in human melanoma cell lines derived from primary and metastatic tumour tissues. **Melanoma Res** 1997; 7:32-42.

Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nat Genet** 1994; 6:157-62.

Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, et al. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. **Oncogene** 2002; 21:248-59.

Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **Int J Cancer** 2005; 113:276-83.

Bal V, McIndoe A, Denton G, et al. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. **Eur J Immunol** 1990; 20:1893-7.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol**. 2005; 32 Suppl 1:S16-24.

Bauer M, Wagner H, Lipford GB. HPV type 16 protein E7 HLA-A2 binding peptides are immunogenic but not processed and presented. **Immunol Lett** 2000; 71:55-9.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis** 1994; 170:1077-85.

Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, et al. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. **Int J Cancer** 1998a; 78:166-71.

Bontkes HJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Stern PL. Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. **Lancet** 1998b; 351:187-8.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol** 2002; 55:244-65.

Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2003; 31:3-13.

Bourgault Villada I, Beneton N, Bony C, et al. Identification in humans of HPV-16 E6 and E7 protein epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B18 and determination of the HLA-B18-specific binding motif. **Eur J Immunol** 2000; 30:2281-9.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Res** 1996; 56:4620-4.

Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, et al. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens** 2000; 56:417-27.

Chamuleau ME, Souwer Y, Van Ham SM, et al. Class II-associated invariant chain peptide expression on myeloid leukemic blasts predicts poor clinical outcome. **Cancer Res** 2004; 64:5546-50.

Cheng WF, Lee CN, Su YN, et al. Induction of human papillomavirus type 16-specific immunologic responses in a normal and an human papillomavirus-infected populations. **Immunology** 2005; 115:136-49.

Chil A, Sikorski M, Bobek M, Jakiel G, Marcinkiewicz J. Alterations in the expression of selected MHC antigens in premalignant lesions and squamous carcinomas of the uterine cervix. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2003; 82:1146-52.

Coleman N, Birley HD, Renton AM, et al. Immunological events in regressing genital warts. **Am J Clin Pathol** 1994; 102:768-74.

Concha A, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Nogales F, Collado A, Garrido F. Different patterns of HLA-DR antigen expression in normal epithelium, hyperplastic and neoplastic malignant lesions of the breast. **Eur J Immunogenet** 1995; 22:299-310.

Connor ME, Stern PL. Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. **Int J Cancer** 1990; 46:1029-34.

Cox AL, Skipper J, Chen Y, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. **Science** 1994; 264:716-9.

Cromme FV, Airey J, Heemels MT, et al. Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. **J Exp Med** 1994; 179:335-40.

D'Andrea A, Chang C, Franz-Bacon K, McClanahan T, Phillips JH, Lanier LL. Molecular cloning of NKB1: a natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. **J Immunol** 1995; 155:2306-10.

Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Pathol Res Pract** 1997; 193:491-5.

de Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. **Mutat Res** 2003; 544:375-83.

de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. **Cancer Res** 2002; 62:472-9.

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

de Jong A, van der Hulst JM, Kenter GG, et al. Rapid enrichment of human papillomavirus (HPV)-specific polyclonal T cell populations for adoptive immunotherapy of cervical cancer. **Int J Cancer** 2005; 114:274-82.

Ellis JR, Keating PJ, Baird J, et al. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. **Nat Med** 1995; 1:464-70.

Esteban F, Ruiz-Cabello F, Concha A, Perez-Ayala M, Sanchez-Rozas JA, Garrido F. HLA-DR expression is associated with excellent prognosis in squamous cell carcinoma of the larynx. **Clin Exp Metastasis** 1990; 8:319-28.

Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Res** 1997; 57:2943-50.

Facchinetti V, Seresini S, Longhi R, Garavaglia C, Casorati G, Protti MP. CD4+ T cell immunity against the human papillomavirus-18 E6 transforming protein in healthy donors: identification of promiscuous naturally processed epitopes. **Eur J Immunol** 2005; 35:806-15.

Ferguson A, Moore M, Fox H. Expression of MHC products and leucocyte differentiation antigens in gynaecological neoplasms: an immunohistological analysis of the tumour cells and infiltrating leucocytes. **Br J Cancer** 1985; 52:551-63.

Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. **Immunol Today** 1995; 16:487-94.

Finzer P, Aguilar-Lemarroy A, Rosl F. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. **Cancer Lett** 2002; 188:15-24.

Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural

history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev Panam Salud Publica** 1999; 6:223-33

Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. **J Cell Physiol** 2003; 195:346-55.

Glew SS, Duggan-Keen M, Cabrera T, Stern PL. HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Cancer Res** 1992; 52:4009-16.

Glew SS, Duggan-Keen M, Ghosh AK, et al. Lack of association of HLA polymorphisms with human papillomavirus-related cervical cancer. **Hum Immunol** 1993; 37:157-64.

GLOBOCAN 2002 - Descriptive Epidemiology Group of IARC. Available from: <[URL:http:// www-dep.iarc.fr/](http://www-dep.iarc.fr/)>. [2005 Aug 5].

Gregoire L, Lawrence WD, Kukuruga D, Eisenbrey AB, Lancaster WD. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. **Int J Cancer** 1994; 57:504-7.

Gumperz JE, Parham P. The enigma of the natural killer cell. **Nature** 1995; 378:245-8.

Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. **Mol Med Today** 1999; 5:178-86.

Hilders CG, Houbiers JG, Krul EJ, Fleuren GJ. The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. **Am J Clin Pathol** 1994; 101:5-12.

Hilders CG, Munoz IM, Nooyen Y, Fleuren GJ. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. **Gynecol Oncol** 1995; 57:366-75.

Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, et al. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 1998; 7:1035-41.

Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus Res** 2002; 89:229-40.

Hohn H, Pilch H, Gunzel S, et al. CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. **J Immunol** 1999; 163:5715-22.

Hohn H, Pilch H, Gunzel S, et al. Human papillomavirus type 33 E7 peptides presented by HLA-DR*0402 to tumor-infiltrating T cells in cervical cancer. **J Virol** 2000; 74:6632-6.

Hughes AL, Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. **Nature** 1988; 335:167-70.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas/2005: incidência por câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, INCA; 2004.

Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature** 1994; 369:31-7.

Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. **Am J Pathol** 1999; 154:745-54

Kaklamanis L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. **Cancer Res** 1995; 55:5191-4.

Karre K, Welsh RM. Viral decoy vetoes killer cell. **Nature** 1997; 386:446-7.

Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, et al. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. **Br J Cancer** 1995; 72:405-11.

Knoll MR, Schwab M, Oestreich K, Rumstadt B, Hagmuller E. HLA class II expression in well differentiated thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological features. **J Exp Clin Cancer Res** 1997; 16:177-82.

Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. **J Exp Med** 2000; 191:961-76.

Kouvidou C, Rontogianni D, Tzardi M, et al. Beta 2-microglobulin and HLA-DR expression in relation to the presence of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinomas. **Pathobiology** 1995; 63:320-7.

Krul EJ, Schipper RF, Schreuder GM, Fleuren GJ, Kenter GG, Melief CJ. HLA and susceptibility to cervical neoplasia. **Hum Immunol** 1999; 60:337-42.

Luxton J, Shepherd P. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition. **Curr Opin Infect Dis** 2001; 14:139-43.

Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:1183-91.

Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. **J Infect Dis** 2002; 186:164-72.

Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, et al. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. **J Infect Dis** 2002; 186:1565-74.

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

Marth C, Zeimet AG, Herold M, et al. Different effects of interferons, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in normal (OSE) and malignant human ovarian epithelial cells. **Int J Cancer** 1996; 67:826-30.

Marx C, Wolkersdorfer GW, Brown JW, Scherbaum WA, Bornstein SR. MHC class II expression--a new tool to assess dignity in adrenocortical tumours. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81:4488-91.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol** 2001; 82:15-33.

Monroy-Garcia A, Weiss-Steider B, Hernandez-Montes J, et al. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B*3901 allele. **Arch Virol** 2002; 147:1933-42.

Moretti S, Pinzi C, Berti E, et al. In situ expression of transforming growth factor beta is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and beta 3 integrin expression. **Melanoma Res** 1997; 7:313-21.

Moss DJ, Khanna R. Major histocompatibility complex: from genes to function. **Immunol Today** 1999; 20:165-7.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO J** 1989; 8:4099-105.

Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res** 2002; 89:213-28.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:518-27.

Murray PG, Constandinou CM, Crocker J, Young LS, Ambinder RF. Analysis of major histocompatibility complex class I, TAP expression, and LMP2 epitope sequence in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease. **Blood** 1998; 92:2477-83.

Nimako M, Fiander AN, Wilkinson GW, Borysiewicz LK, Man S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Cancer Res** 1997; 57:4855-61.

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

Oerke S, Hohn H, Zehbe I, et al. Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. **Int J Cancer** 2005; 114:766-78.

Oldford SA, Robb JD, Watson PH, Drover S. HLA-DRB alleles are differentially expressed by tumor cells in breast carcinoma. **Int J Cancer** 2004; 112:399-406.

Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, et al. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85:4005-9.

Petersson M, Charo J, Salazar-Onfray F, et al. Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. **J Immunol** 1998; 161:2099-105.

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int J Cancer** 2002; 97:72-81.

Redondo M, Garcia J, Villar E, et al. Major histocompatibility complex status in breast carcinogenesis and relationship to apoptosis. **Hum Pathol** 2003; 34:1283-9.

Rees RC, Mian S. Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses. **Cancer Immunol Immunother** 1999; 48:374-81.

Ressing ME, Sette A, Brandt RM, et al. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro

immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. **Immunology** 1995; 154:5934-43.

Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. **Int J Oncol** 2001; 19:1211-20.

Rosales T, Guilherme L, Chiarella J, et al. Human leukocyte A and B antigen, gene and haplotype frequencies in the population of the city of Sao Paulo in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 1992; 25:39-47.

Ruiz-Cabello F, Garrido F. HLA and cancer: from research to clinical impact. **Immunol Today** 1998; 19:539-42.

Salter J, MacLennan KA, Moore J, Dadian G, Riches PG, Gore ME. The phenotypic changes in tumour infiltrating lymphocytes and tumour cells following intra-arterial infusion of interleukin-2 in patients with squamous cell carcinoma. **J Pathol** 1995; 176:167-73.

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

Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, Lowy DR. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. **J Virol** 1986; 57:1-6.

Scholten KB, Schreurs MW, Ruizendaal JJ, et al. Preservation and redirection of HPV16E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer. **Clin Immunol** 2005; 114:119-29.

Shepherd PS, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Luxton JC. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. **J Gen Virol** 1996; 77:593-602.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:59-65.

Ting Y, Manos M. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis MA, editor. **PCR protocols. A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press; 1990; 356-59.

Torres LM, Cabrera T, Concha A, Oliva MR, Ruiz-Cabello F, Garrido F. HLA class I expression and HPV-16 sequences in premalignant and malignant lesions of the cervix. **Tissue Antigens** 1993; 41:65-71.

Trevisan A. **Determinação da carga viral e do estado físico do Papilomavírus Humano (HPV) em células da cérvix uterina**. São Paulo; 2004. **Tese de doutorado**.

Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. **Clin Cancer Res** 2005; 11:4717-23.

Van Kaer L. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. **Tissue Antigens** 2002; 60:1-9.

Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res** 1997; 71:321-41.

Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J Gen Virol** 2000; 81:2959-68.

Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. 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; 6:271-8.

Villadangos JA, Ploegh HL. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? **Immunity** 2000; 12:233-9.

Vitale M, Rezzani R, Rodella L, et al. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. **Cancer Res** 1998; 58:737-42.

Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. **J Infect Dis** 2001; 184:1310-4.

Wang SS, Hildesheim A, Gao X, et al. Comprehensive analysis of human leukocyte antigen class I alleles and cervical neoplasia in 3 epidemiologic studies. **J Infect Dis** 2002; 186:598-605.

Warrino DE, Olson WC, Knapp WT, et al. Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. **Clin Cancer Res** 2004; 10:3301-8.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science** 1990; 248:76-9.

Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom I, et al. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. **Hum Immunol** 2003; 64:538-42.

Zeidler R, Eissner G, Meissner P, et al. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. **Blood** 1997; 90:2390-7.

Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunol Rev** 1997; 156:199-209.

Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, et al. Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. **J Med Genet** 2005a; 42:e49.

Zoodsma M, Nolte IM, Te Meerman GJ, De Vries EG, Van der Zee AG. HLA genes and other candidate genes involved in susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. **Int J Oncol** 2005b; 26:769-84.

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996; 1288:F55-