**INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E NEOPLASIA
DO COLO UTERINO: EFEITO DO POLIMORFISMO DOS
GENES HLA-DRB1 E -DQB1 E RESPOSTAS
LINFOPROLIFERATIVAS CONTRA PEPTÍDEOS VIRAIS**

Paulo Cesar Maciag

Tese de Doutorado

Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa

São Paulo

21/06/02

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004873

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Maciag, Paulo Cesar

M152i Infecções por Papilomavírus humano e neoplasia do
colo uterino: efeito do polimorfismo dos genes HLA-DRB1 E-
DQB1 e respostas linfoproliferativas contra peptídeos virais
/ Paulo Cesar Maciag. -- São Paulo, 2002.
132p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Villa, Luisa Lina

1. Biologia molecular 2. Câncer : Imunologia. I.
T. II. Villa, Luisa Lina, orientador.

574.88 CDD

*“Infecções por Papilomavírus Humano e
Neoplasia do Colo Uterino: Efeito do
Polimorfismo dos Genes HLA-DRB1 e -DQB1
e Respostas Linfoproliferativas Contra
Peptídeos Virais”*

PAULO CESAR MACIAG

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. LUISA LINA VILLA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. MARIA TERÊSA MACHINI DE MIRANDA
IQ – USP

Prof. Dr. JORGE ELIAS KALIL FILHO
FM – USP

Prof. Dr. JOSÉ ELUF NETO
FM – USP

Prof. Dr. JOSÉ ALEXANDRE MARZAGÃO BARBUTO
ICB – USP

SÃO PAULO
25 DE JULHO 2002.

Talvez um dos maiores erros que cometemos é esquecer que antes do segundo passo é importante dar o primeiro.

Dedico esta tese à Janaína e Isadora, pois sem vocês isto não teria sentido

Aos meus pais e avós, os alicerces para que eu esteja aqui

,

Agradecimentos

À minha orientadora, **Dra. Luisa Lina Villa**. A mim você foi uma educadora, uma amiga, um exemplo. Estes anos estão marcados, e com orgulho guardados em meu coração. Amigos para sempre!

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, através do **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**, pelo apoio e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao **grupo de virologia**, minha segunda família: Andrea, Carol, Isa, Jane, Joãozinho, Zé Carlos, Katiana, Lara, Laura, Lenice, Luisa, Mônica, Maria Cecília, Neide, Patricia Savio, Patricia Thomann, Enrique, Raquel, Rômulo, Rodrigo, Stella e Tatiana.

Ao **Joãozinho, Zé Carlos, Silvaneide, Raquel, Mônica, Maria Cecília, Isa e Lenice**, pela dedicação e colaboração para que este trabalho se realizasse.

Ao **Enrique**, pelos ensinamentos e trocas de idéias, além dos churrascos, do futebol, da comilança, da diversão,...

À **Patrícia Sávio**, por todos os passos que demos juntos, obrigado “filha”.

À **Katiana**, nossa menina (ass: Paulo e Enrique).

À **Stella**, nossa guia no burocrático universo dos papéis.

A todos os colegas do Instituto, **Professores, estudantes, técnicos e outros funcionários** pois todos contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Aos **Departamentos de Oncologia e Epidemiologia da Universidade McGill**, em Montreal, Canadá, em especial ao **Nicolas Schlecht** e **Dr. Eduardo Franco**. Obrigado pelos ensinamentos em epidemiologia.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro.

À **Seleção Brasileira de Futebol**, pelo nosso PENTACAMPEONATO!

Ao **BRASIL!**

Sumário

Abreviaturas.....	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas.....	10
Abstract.....	13
1. Introdução.....	14
1.1. O CARCINOMA DO COLO UTERINO E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO	14
1.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO: POTENCIAL ONCOGÊNICO	15
1.3. A RESPOSTA IMUNE CONTRA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO	17
1.4. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA HLA	20
1.5. GENES HLA E SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO CCU	25
2. Polimorfismos dos genes HLA DRB1 e DQB1 e a história natural das infecções por papilomavírus humano e neoplasia intra-epitelial cervical	29
2.1. POLIMORFISMOS DOS GENES HLA DRB1 E DQB1 E A HISTÓRIA NATURAL DAS INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO	30
2.1.1. <i>Materiais e Métodos</i>	31
2.1.1.1. <i>Amostra: Estudo de coorte Ludwig-McGill</i>	31
2.1.1.2. <i>Tipificação dos genes HLA-DRB1 e DQB1</i>	32
2.1.1.3. <i>Análise estatística</i>	35
2.2. POLIMORFISMOS DOS GENES HLA DRB1 E DQB1 E RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS	46
2.2.1. <i>Materiais e Métodos</i>	47
2.2.1.1. <i>Amostras</i>	47
2.2.1.2. <i>Análise estatística</i>	47
2.2.2. <i>Resultados e Discussão</i>	49
2.3. POLIMORFISMOS DOS GENES HLA DRB1 E DQB1 E RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA INVASIVO DE COLO UTERINO	63
2.3.1. <i>Materiais e Métodos</i>	63
2.3.1.1. <i>Amostras</i>	63
2.3.1.2. <i>Tipagem do HPV</i>	65
2.3.1.2.1. <i>Extração de DNA do tecido tumoral</i>	65
2.3.1.2.2. <i>Tipificação de HPV por hibridização reversa</i>	65
2.3.1.3. <i>Tipagem do gene HLA-DRB1</i>	66
2.3.1.4. <i>Análise estatística</i>	66
2.3.2. <i>Resultados e Discussão</i>	67
3. Análise do polimorfismo da posição 86 da cadeia HLA-DR β	74
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
3.1.1. <i>Amostras</i>	76
3.1.2. <i>Análise estatística</i>	76
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78

3.2.1. <i>Análise do polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR e risco de infecção por HPV</i>	78
3.2.2. <i>Análise do polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR e risco de infecção persistente por HPV</i>	82
3.2.3. <i>Análise do polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR e risco de desenvolvimento de neoplasia cervical</i>	87
4. Respostas linfoproliferativas contra peptídeos das proteínas E6 e E7 de HPV16	95
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
4.1.1. <i>Amostras</i>	97
4.1.2. <i>Separação de células mononucleares de sangue periférico</i>	97
4.1.3. <i>Seqüência de peptídeos</i>	98
4.1.4. <i>Ensaio in vitro de proliferação de PBMC na presença de peptídeos antigênicos de HPV16</i>	101
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
5. Referências Bibliográficas.....	120
6. Curriculum Vitae	131

Abreviaturas

BP: *Base Pairs*; pares de bases

CCU: Carcinoma do colo uterino

CI: *Confidence Interval*; intervalo de confiança

CRPV: *Cottontail Rabbit Papillomavirus*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico

HSIL: *High-Grade Squamous intraepithelial lesion*; lesão escamosa intraepitelial de alto grau

HLA: *Human Leukocyte Antigen*; antígenos leucocitários humanos

HPV: *Human Papillomavirus*; papilomavírus humano

IFN: Interferon

IL: Interleucina

LCR: *Long control Region*; região regulatória

LSIL: *Low-Grade Squamous intraepithelial lesion*; lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

MHC: *Major Histocompatibility Complex*; Complexo Principal de Histocompatibilidade

OR: *Odds Ratio*

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*; células mononucleares de sangue periférico

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição

SCCC: *Squamous Cell Carcinoma of the Cervix*; carcinoma de células escamosas do colo uterino

SIL: *Squamous intraepithelial lesion*; lesão escamosa intraepitelial

TAP: *Transporter Associated with Antigen Processing*; transportador associado ao processamento antigênico

TNF: *Tumor Necrosis Factor*; fator de necrose tumoral.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV-16.....	16
Figura 2: Mapa simplificado do MHC humano.....	21
Figura 3: Estrutura das moléculas HLA de classe II.....	23
Figura 4: Estrutura dos pockets da molécula HLA-DR.....	24
Figura 5. Distribuição em porcentagem dos genótipos Gly/Gly (GG), Gly/Val (GV) e Val/Val (VV), correspondentes à composição do <i>pocket</i> 1 da molécula HLA-DR, em amostras negativas para detecção de HPV (Neg), positivas para qualquer HPV (HPV), HPV não-oncogênicos (Nonc), HPV oncogênicos (Onc) e HPV16.....	79
Figura 6. Distribuição em porcentagem dos genótipos Gly/Gly (GG), Gly/Val (GV) e Val/Val (VV), correspondentes à composição do <i>pocket</i> 1 da molécula HLA-DR, em amostras negativas para detecção de HPV (Neg), infecções transientes (1), infecções persistentes de curta (2) e longa (3) duração e infecções persistentes de longa duração por HPV oncogênico (3+/Onc).....	84
Figura 7. Distribuição em porcentagem dos genótipos Gly/Gly (GG), Gly/Val (GV) e Val/Val (VV), correspondentes à composição do <i>pocket</i> 1 da molécula HLA-DR, em amostras normais, positivas para SIL e HSIL. (A) Incluídas todas as amostras; (B) Incluídas somente amostras transitoriamente infectadas por HPV.....	88
Figura 8. Seqüência da proteína E6 de HPV16 e superposição dos peptídeos usados no estudo.....	100
Figura 9. Seqüência da proteína E7 de HPV16 e superposição dos peptídeos usados no estudo.....	100
Figura 10. Proliferação de PBMC da amostra D1 na presença de diferentes peptídeos de E7 de HPV.....	105
Figura 11. Análise do peptídeo de p1-20 da proteína E7 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.....	106
Figura 12. Proliferação de PBMC da amostra T67 na presença de diferentes peptídeos de E7 de HPV.....	107
Figura 13. Análise do peptídeo de p19-38 da proteína E7 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.....	108
Figura 14. Análise da região compreendida entre os resíduos 40 (G) e 80 (E) da proteína E7 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.....	108
Figura 15. Análise da região compreendida entre os resíduos 67 (L) e 98 (P) da proteína E7 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.....	109

Figura 16. Proliferação de PBMC da amostra D1 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV	111
Figura 17. Proliferação de PBMC da amostra T66 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV	112
Figura 18. Análise do peptídeo p131-150 da proteína E6 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.	113
Figura 19. Proliferação de PBMC da amostra T67 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV	114
Figura 20. Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ da amostra T69 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV	115
Figura 21. Análise da região compreendida entre os resíduos 31 (H) e 60 (V) da proteína E6 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.	116
Figura 22. Análise da região compreendida entre os resíduos 71 (D) e 100 (N) da proteína E6 de HPV 16 pelo <i>software</i> TEPITOPE.	116

Lista de Tabelas

Tabela 1. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for cumulative human papillomavirus (HPV) positivity in the first year of follow-up, by HLA-DQB1 alleles.	39
Tabela 2. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for cumulative human papillomavirus (HPV) positivity in the first year of follow-up, by HLA-DRB1 alleles.	40
Tabela 3. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for cumulative human papillomavirus (HPV) positivity in the first year of follow-up, by HLA DRB1-DQB1 haplotypes.	41
Tabela 4. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for human papillomavirus (HPV) transience and persistence in the first year of follow-up, by HLA-DQB1 alleles.	42
Tabela 5. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for human papillomavirus (HPV) transience and persistence in the first year of follow-up, by HLA-DRB1 alleles.	43
Tabela 6. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for human papillomavirus (HPV) transience and persistence in the first year of follow-up, by HLA DRB1-DQB1 haplotypes.	44
Tabela 7. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência e persistência de qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) e prevalência de lesões de alto grau (HSIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DQB1.	57
Tabela 8. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência e persistência de qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) e prevalência de lesões de alto grau (HSIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DRB1.	58
Tabela 9. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DQB1, e estratificada pelo comportamento da infecção por HPV.	60
Tabela 10. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DRB1, e estratificada pelo comportamento da infecção por HPV.	61
Tabela 11. Relação e informações gerais das amostras de CCU coletadas no IBCC.	68
Tabela 12. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para desenvolvimento de CCU, de acordo com os grupos alélicos de HLA-DRB1.	73
Tabela 13. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por qualquer HPV, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.	80
Tabela 14. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por HPV não-oncogênico, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.	80
Tabela 15. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por HPV oncogênico, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.	81

Tabela 16. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por HPV16, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.....	81
Tabela 17. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções transientes no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.....	84
Tabela 18. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.....	85
Tabela 19. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.....	85
Tabela 20. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes por HPV oncogênicos no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.....	86
Tabela 21. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes por HPV oncogênicos no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.....	86
Tabela 22. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de SIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.	89
Tabela 23. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de HSIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.	89
Tabela 24. Razões de chances (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de SIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR, estratificada pelo status da infecção por HPV	90
Tabela 25. Razões de chances (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de HSIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR, estratificada pelo status da infecção por HPV	91
Tabela 26. Seqüência dos peptídeos utilizados neste estudo e a posição dos resíduos de aminoácidos na estrutura primária da proteína.	99
Tabela 27. Conjuntos de peptídeos usados nos ensaios de linfoproliferação.	101

Resumo

Infecção persistente por tipos oncogênicos de papilomavírus humano (HPV) é considerada como o principal fator de risco para desenvolvimento de carcinoma invasivo do colo uterino (CCU) e de lesões intraepiteliais cervicais (SIL). Fatores genéticos do hospedeiro, como o polimorfismo de genes HLA (*human leukocyte antigen*), também têm sido implicados na suscetibilidade a estas patologias e à infecção por (HPV), como observado em diversos estudos caso-controle. Neste estudo investigou-se em uma coorte de mulheres (*Ludwig-McGill cohort*) se a variabilidade dos genes HLA-DRB1 e -DQB1 influenciam na história natural das infecções por HPV e no risco de SIL. A tipificação de DRB1 e DQB1 foi realizada em 620 amostras provenientes de um estudo epidemiológico prospectivo. A positividade para HPV foi testada em amostras da mesma paciente coletadas a cada 4 meses, obtidos durante o primeiro ano de seguimento, enquanto os resultados de citologia perfazem os 2 primeiros anos de seguimento. Infecções persistentes de curta ou longa duração foram definidas como 2 e 3 resultados consecutivos positivos para o mesmo tipo de HPV, respectivamente. As associações foram estimadas através de razões de chance e intervalos de confiança de 95%, ajustadas para potenciais fatores de confusão. Os resultados obtidos indicam que a prevalência da infecção por HPV e o risco de persistência variam dependendo do haplótipo HLA. O haplótipo DRB1*0301-DQB1*0201 mostrou-se protetor contra a infecção por HPV, e DRB1*1102-DQB1*0301 contra infecções persistentes. Já os haplótipos DRB1*1601-DQB1*0502 e DRB1*0807-DQB1*0402 foram fatores de risco para infecções persistentes por HPV. Não foi observada uma forte concordância entre risco de infecção por HPV e risco de SIL associados a determinado HLA, em parte porque o número de pacientes com SIL foi um fator limitante neste estudo. Um risco aumentado de SIL, independente da infecção por HPV, foi associado com DRB1*0301 e DR12. Portadoras de DR4 e DQB1*0601 tiveram uma maior probabilidade de desenvolver SIL e HSIL, respectivamente. Uma associação negativa entre o alelo DQB1*0301 e HSIL foi verificada. Análise do dimorfismo na posição 86 da cadeia β de HLA-DR mostrou que valina nesta posição tem um efeito protetor para prevalência e persistência de infecção por HPV, e maior risco de SIL no grupo com infecções transitórias por HPV. Em outra análise, investigamos a distribuição de grupos alélicos de DRB1 em uma série independente de amostras provenientes de pacientes com CCU. Observamos um risco diminuído de desenvolvimento de CCU associado a DR3. Por outro lado, DR4 e DR8/12 mostraram-se fatores de risco para o CCU nesta população. Estes resultados sugerem que o polimorfismo de HLA desempenha um papel na história natural das infecções por HPV, SIL e CCU. Também analisamos respostas linfoproliferativas em pacientes com CCU, contra peptídeos derivados de E6 e E7 de HPV16. As respostas positivas foram mais frequentes contra peptídeos de E6 do que E7. Não observamos resposta contra um peptídeo ou região em particular. Parte desta diversidade nas respostas linfoproliferativas pode ser relacionada com o polimorfismo de genes HLA e seu papel na seleção de epítomos.

Abstract

Persistent infection with oncogenic human papillomavirus (HPV) is the major risk factor for the development of malignant lesions in the uterine cervix. Host factors have also been implicated in the pathogenesis of these diseases. Associations between human leukocyte antigen (HLA) polymorphisms and cervical cancer, precursor lesions or HPV infections have been reported by case-control studies in several populations. This study investigated through cohort analysis if human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 and DQB1 variability is related to human papillomavirus (HPV) infection and squamous intraepithelial lesions (SIL) prevalence and persistence. HLA-DRB1 and DQB1 genes were typed in 620 samples from the Ludwig-McGill cohort. HPV positivity was tested in specimens collected every 4 months during the first year of follow-up. Persistent and long-term infections were defined as at least 2 or 3 consecutive positive results for the same HPV type, respectively. Analysis of SIL included data obtained during the two first years of follow-up. The magnitudes of associations were estimated by unconditional logistic regression analysis adjusted for potential confounders. Certain HLA alleles and haplotypes were associated with HPV either HPV prevalence or persistence. The DRB1*0301-DQB1*0201 haplotype was associated with a lower risk for HPV infection and DRB1*1102-DQB1*0301 for HPV persistence. DRB1*1601-DQB1*0502 and DRB1*0807-DQB1*0402 were associated with a increased risk for persistent HPV infection. It was not observed a strong concordance between the associations verified for HPV prevalence/persistence and SIL, possibly due to the limited number of SIL specimens. A higher risk for SIL, independent of HPV infection, was observed for DRB1*0301 and DR12. DR4 and DQB1*0601 carriers showed a higher frequency of SIL and HSIL, respectively. A negative association between DQB1*0301 and HSIL was verified. Valine at position 86 of the DR β chain was associated with reduced risks of HPV positivity and persistence, as compared to glycine carriers. However, valine carriers had a higher risk of SIL if transiently infected by HPV. We also analyzed an independent sample of patients with invasive cervical, and a protective effect was observed for DR3. On the other hand, DR4 and DR8/12 were associated with a higher risk for cervical cancer in this population. Our results suggest that HLA class II polymorphisms and pocket 1 profile are involved in clearance and maintenance of HPV infection and the risk of SIL and CCU, consistent with the hypothesis that genetic background is important in the natural history of HPV infections and associated lesions. We also analyzed lymphoproliferative responses against HPV16 E6 and E7 peptides, in patients with invasive cervical cancer. Lymphoproliferative responses were more frequent for E6 peptides than for E7 peptides. The responses were not restricted to a particular peptide, which is expected based on HLA variability observed among patients.

1. Introdução

1.1. O Carcinoma do Colo Uterino e o Papilomavírus Humano

O carcinoma do colo uterino (CCU) é um dos tumores mais freqüentes entre as mulheres. É responsável por aproximadamente 203 mil óbitos anualmente, dos quais 79% ocorrem em países em desenvolvimento (Pisani *et al.*, 1993). Incidências acima de 30 casos de CCU por 100.000 mulheres são comumente observadas em países do Sudeste Asiático, África e América do Sul (IARC, 2001). O Brasil apresenta, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), taxas brutas de incidência e mortalidade por CCU de 18,9 e 4,3 casos por 100 mil mulheres, respectivamente (INCA, 2000).

O carcinoma do colo uterino comporta-se epidemiologicamente como uma doença sexualmente transmissível. O número de parceiros sexuais e a idade precoce do início da atividade sexual estão associados com um risco aumentado de desenvolvimento de CCU (Schiffman *et al.*, 1993, Bosch *et al.*, 1997). No entanto, a atividade sexual é o principal fator de risco para infecção por papilomavírus humano (HPV), que é um vírus de DNA transmitido sexualmente e considerado o agente etiológico do CCU (Bosch *et al.*, 1997, Peyton *et al.*, 2001). A infecção anogenital por HPV é bastante prevalente entre mulheres com citologia cervical normal, com taxas variando entre 15 e 40% (Villa, 1997). A incidência da infecção é mais elevada em mulheres jovens, na faixa etária entre 22 e 25 anos (Schiffman, 1992). Entretanto, estas infecções são de caráter transitório e apenas uma pequena proporção de mulheres apresenta infecções persistentes por um mesmo genótipo HPV. A infecção persistente por tipos oncogênicos de HPV é o mais importante fator de risco para o

desenvolvimento e progressão de lesões neoplásicas intra-epiteliais cervicais, consideradas lesões precursoras ao carcinoma invasivo, e CCU (Londesborough *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1997). O DNA de HPV é detectado em mais de 90% dos casos de CCU, sendo o HPV 16 o mais comum, presente em 50 a 60% destes tumores, seguido pelo HPV 18 (Muñoz e Bosch, 1996, Walboomers *et al.*, 1999).

Outros fatores de risco, coadjuvantes à infecção por HPV, também são importantes para o desenvolvimento do CCU, como: tabagismo, uso de contraceptivos orais, paridade, infecção por *Chlamydia trachomatis* e soropositividade para HIV (Schiffman *et al.*, 1993, Bosch *et al.*, 1997, Ahdieh *et al.*, 2000, Koskela *et al.*, 2000, Anttila *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2002).

1.2. Papilomavírus Humano: Potencial Oncogênico

Os HPV são vírus epiteliotrópicos, e dentre os mais de 70 genótipos descritos, aproximadamente 30 infectam especificamente mucosas e a região anogenital (Zur Hausen, 1996). Estes HPV são classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas. Os tipos de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 43 e 44) são mais freqüentes em verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino. Os tipos de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56) são encontrados principalmente em lesões intra-epiteliais de alto grau e no carcinoma invasor do colo uterino (Lowy *et al.*, 1994).

O HPV é um vírus de DNA e seu genoma circular contém aproximadamente 8000 pares de bases. São reconhecidas três regiões no genoma viral: região precoce (E), região tardia (L) e a região LCR (figura 1). Os genes da região precoce codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e regulação da

transcrição gênica (E1 e E2), e transformação celular (E5, E6 e E7). 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 e elementos reguladores da expressão gênica dos HPV (Zur Hausen, 1996). Os genes E6 e E7 dos HPV codificam para duas oncoproteínas, envolvidas em processos de imortalização e transformação celulares (Schlegel *et al.*, 1988). A proteína E6 do HPV promove a degradação da proteína P53, produto do gene supressor tumoral p53 (Werness *et al.*, 1990). Outro produto de gene supressor tumoral, a proteína pRB, é inativada por E7 (Dyson *et al.*, 1989).

Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV-16.

Em lesões do colo uterino de baixo grau (LSIL) ou benignas, o DNA de HPV conserva seu estado epissomal, permitindo a formação de partículas virais. Em lesões de alto grau (HSIL) e CCU, mais associadas a infecções por HPV oncogênicos, o DNA viral está geralmente integrado ao genoma da célula hospedeira (Vernon *et al.*, 1997). A integração ocorre mediante a quebra da molécula circular de DNA na região onde se localizam E1 e E2, o que resulta em um aumento da expressão e da estabilidade dos transcritos de E6 e E7 (Jeon e Lambert, 1995).

1.3. A Resposta Imune Contra o Papilomavírus Humano

Pacientes com imunodeficiência celular, iatrogênica ou adquirida, apresentam um aumento da incidência de verrugas genitais e da pele, além de aumento na persistência de infecção por HPV e progressão de lesões do colo uterino associadas ao vírus (Petry *et al.*, 1994, Palefsky *et al.*, 1999). Estas observações sugerem que a resposta imune celular é importante no controle da infecção por HPV. Por outro lado, o papel da resposta humoral na infecção por HPV é pouco conhecido. A presença de anticorpos contra proteínas de capsídeo de HPV não está associada com a eliminação do vírus, e sim com persistência viral e progressão de doença (Wideroff *et al.*, 1995, de Gruijl *et al.*, 1997, Bontkes *et al.*, 1999).

A ativação de células T CD4⁺ é um passo fundamental na elaboração de uma resposta eficiente contra infecções virais e processos neoplásicos (Hung *et al.*, 1998; Toes *et al.*, 1999). Estas células são ativadas em órgãos linfóides secundários pelas células dendríticas (Zinkernagel *et al.*, 1997). A interação entre a célula dendrítica e o linfócito T CD4⁺ é importante no processo de ativação do linfócito CD8⁺ (Ridge *et*

al., 1998) e portanto, para eliminação de tumores relacionados a vírus, como demonstrado em modelos animais (Ossendorp *et al.*, 1998). Os linfócitos T CD4⁺ regulam a resposta imune através da secreção de citocinas e ativação de outras células imunocompetentes. Dados experimentais demonstram que a secreção preferencial de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- β) está associada com uma resposta mais efetiva contra o HPV e lesões associadas ao vírus (Tsukui *et al.*, 1996; Grassegger *et al.*, 1997; Clerici *et al.*, 1997; Tartour *et al.*, 1998).

A relação entre persistência da infecção por HPV e respostas linfoproliferativas de células T CD4⁺ não está esclarecida. Maiores índices de proliferação de linfócitos T CD4⁺, em resposta a E7 de HPV 16, foram observadas tanto em pacientes com persistência da infecção por HPV (De Gruijl *et al.*, 1998), como nas que eliminaram a infecção (Kadish *et al.*, 1997). Por outro lado, a presença de resposta de hipersensibilidade tardia contra E7 de HPV16 apresenta forte correlação com a regressão de lesões neoplásicas intra-epiteliais causadas pelo vírus (Höpfl *et al.*, 2001). Células T CD4⁺ de memória contra L1 (Shepherd *et al.*, 1996), E7 (van der Burg *et al.*, 2001) e E2 (de Jong *et al.*, 2002) de HPV16 são freqüentemente detectadas em indivíduos saudáveis. Apesar do potencial antigênico de várias proteínas de HPV, e da detecção de células citotóxicas CD8⁺ específicas a estes antígenos, tanto em sangue periférico de pacientes com lesões de alto grau (Nimako *et al.*, 1997), como infiltrando tecidos tumorais associados ao HPV (Evans *et al.*, 1997), a resposta imune não parece efetiva na eliminação do vírus e regressão das lesões em algumas pacientes. Inúmeros fatores, sejam genéticos ou ambientais, devem participar do controle da resposta imune e história natural das infecções por HPV. O polimorfismo de genes HLA de classe I e II, que tem um importante papel no

controle da resposta imunológica, vêm sendo investigados como fator de risco às infecções por HPV e desenvolvimento de doença relacionada a estes vírus.

1.4. O complexo Principal de Histocompatibilidade e Sistema HLA

Os genes HLA são fundamentais no controle da resposta imune (Benacerraf, 1981). Estes genes apresentam um alto grau de polimorfismo, e seus produtos alélicos estão envolvidos na apresentação de peptídeos antigênicos às células T. Os genes HLA são divididos em genes de classe I (HLA-A, -B e -C) e de classe II (HLA-DPA1 e DPB1, HLA-DQA1 e DQB1, HLA-DRA e DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5) (Krensky, 1997). Estes genes estão localizados no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localizado em 6p21.3 (figura 2) (Moss e Khana, 1999).

Os genes HLA-A, B e C codificam as moléculas de classe I, que são expressas na superfície de todas as células nucleadas. Sua função mais conhecida é a apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) (Dembic *et al.*, 1986). Os genes HLA-DR, DQ e DP codificam as moléculas HLA de classe II, expressas constitutivamente em células apresentadoras de antígenos, como linfócitos B, células dendríticas (células de Langerhans, células dendríticas foliculares) e macrófagos. Estas moléculas apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) (Unanue e Allen, 1987).

As moléculas HLA de classe I e II são estruturalmente semelhantes. Ambas são constituídas por uma cadeia polipeptídica α e uma β (Figura 3a). Nas moléculas de classe I, a cadeia α é codificada pelos genes de classe I (HLA-A, -B ou -C) e a cadeia β pelo gene da β_2 -microglobulina (localizado no cromossomo 15). No caso das moléculas de classe II, ambas as cadeias α e β são codificadas por genes HLA de classe II. Como exemplo, o gene HLA-DRA codifica para a cadeia α e o gene HLA-DRB para a cadeia β da molécula HLA-DR.

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

Uma característica estrutural comum às moléculas de classe I e II é a formação de uma fenda na porção superior das moléculas, que constitui o sítio de ligação do peptídeo antigênico a ser apresentado aos linfócitos T (Bjorkman *et al.*, 1987, Brown *et al.*, 1993) (figura 3a). Na região da fenda de ligação do peptídeo estão localizados os sítios polimórficos das moléculas HLA (figura 3b), especificamente em regiões denominadas *pockets*. A análise estrutural da molécula HLA-DR revelou que os resíduos que formam os *pockets* interagem com a cadeia lateral dos resíduos presentes no peptídeo (Stern *et al.*, 1994), selecionando os determinantes antigênicos apresentados por determinada molécula HLA (figura 3c). Como a composição dos *pockets* varia conforme o alelo que codifica a molécula, encontra-se uma grande diversidade de seleção e apresentação antigênica entre indivíduos. De particular importância é a região que forma o *pocket* 1 (P1) da molécula HLA-DR. O P1 apresenta um ambiente hidrofóbico, permitindo somente a ligação de aminoácidos alifáticos ou com cadeia lateral aromática. Este é o *pocket* mais restritivo da molécula HLA (figura 4) (Sturniolo *et al.*, 1999).

O P1 é constituído de resíduos monomórficos, exceto por um dimorfismo da posição 86 da cadeia β (figura 3b), que pode apresentar uma glicina ou valina nesta posição. Como a cadeia lateral do aminoácido valina é maior que a glicina, moléculas HLA que possuem valina não ligam peptídeos com aminoácidos aromáticos na posição 1, a qual interage com P1 (Davenport *et al.*, 1995) (figura 4). O dimorfismo da posição 86 da cadeia β de HLA-DR tem sido implicado no risco a diversas doenças infecciosas, com destaque para hepatite. Foi observado que a presença de valina na posição 86 em alelos de DRB1*13 e DRB1*15 está associada com a resposta ao antígeno HbsAg, em oposição à presença de glicina nesta mesma posição (Lango-Warensjo *et al.*, 1998).

Figura 3: Estrutura das moléculas HLA de classe II.

(A) Representação esquemática de moléculas HLA de classes I e II. As pontes dissulfeto estão indicadas (S-S). Na molécula HLA de classe I, a fenda de ligação do peptídeo é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$; e a região semelhante à imunoglobulina é constituída pelo domínio $\alpha 3$ da molécula HLA e pela $\beta 2$ -microglobulina. O sítio de ligação da molécula CD8 está localizado no domínio $\alpha 3$. Na molécula de classe II, a fenda de ligação do peptídeo é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$, e a região semelhante à imunoglobulina é formada pelos domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$, sendo neste último o sítio de ligação da molécula CD4. (B) Representação da fenda de ligação do peptídeo da molécula HLA-DR, os resíduos polimórficos estão destacados em vermelho. (C) Visão superior da fenda de ligação do peptídeo da molécula HLA-DQ, apresentando um peptídeo ligado. P1 ilustra a região do *pocket* 1. Outros *pockets* importantes estão representados por P4, P6 e P9.

As moléculas HLA de classe II apresentam antígenos extracelulares às células T CD4⁺. As proteínas internalizadas são degradadas em endossomos. Estas estruturas celulares possuem um pH ácido, além de enzimas proteolíticas, principalmente catepsinas. Os endossomos contendo os peptídeos sofrem fusão com vesículas exocíticas contendo as moléculas HLA, e os complexos HLA-peptídeo formados são expressos na membrana celular, podendo ser reconhecidos pelo linfócito T CD4⁺ (Villadangos e Ploegh, 2000).

1.5. Genes HLA e Suscetibilidade Genética ao CCU

Dados clínicos e experimentais indicam que fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro desempenham um importante papel na evolução da infecção por HPV e doenças associadas ao vírus. Estudos recentes demonstraram a presença de risco familiar para o CCU, sugerindo um componente hereditário para esta doença (Hemminki *et al.*, 1999). Inúmeros estudos caso-controle investigaram o efeito do polimorfismo de genes HLA no risco de desenvolvimento de CCU, em diferentes populações. Apesar de resultados controversos terem sido observados, algumas associações, especialmente aquelas descrevendo haplótipos protetores, foram consistentes em vários estudos (Maciag e Villa, 1999). Associações positivas com o CCU, e suas lesões precursoras, são freqüentemente descritas com DQB1*03, DQB1*0602, DRB1*1501, DRB1*04 e DRB1*07. Por outro lado, os alelos DRB1*13, DRB1*01 e DQB1*05 encontram-se negativamente associados ao CCU (Wank e Thomssen, 1991, Apple *et al.*, 1994, Apple *et al.*, 1995, Sanjeevi *et al.*, 1996, Sastre-Garau *et al.*, 1996, Hildesheim *et al.*, 1998, Maciag *et al.*, 2000). No entanto, associação negativa entre o CCU e o haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 (Hildesheim

et al., 1998) e haplótipos contendo DQB1*0301 (Apple *et al.*, 1995) também foram descritas.

Na população brasileira, um estudo caso-controle mostrou um aumento no risco de CCU e prevalência de positividade para HPV associado com alelos de DRB1*15. Alelos de DRB1*13, principalmente DRB1*1302, mostraram um moderado efeito protetor contra o CCU. Porém a associação negativa mais forte foi verificada com os alelos DRB1*0101 e DQB1*05 (Maciag *et al.*, 2000). Este estudo caso-controle analisou amostras provenientes da cidade de João Pessoa, no Nordeste Brasileiro.

As associações verificadas entre o polimorfismo de genes HLA de classe II e risco de CCU são geralmente fracas, em muitos casos inconsistentes. Porém, a enorme variabilidade e número de genes presentes no MHC, além de inúmeros fatores envolvidos no desencadeamento da resposta imune, devem em parte ser responsáveis pela dificuldade na detecção e confirmação destas associações. No entanto, biologicamente é bastante plausível que polimorfismos em genes HLA tenham um papel no risco de doenças causadas pelo HPV. A infecção por HPV não induz destruição tecidual e resposta inflamatória intensa. Portanto, uma resposta imune efetiva para eliminação deste vírus deve contar com uma participação efetiva de linfócitos T CD4⁺ (Toes *et al.*, 1999), e conseqüentemente da apresentação antigênica via HLA de classe II.

Resultados interessantes mostrando o efeito do polimorfismo do MHC foram observados em modelos animais, onde é possível controlar a variabilidade genética. Experimentos em camundongos demonstram que linhagens com distintos haplótipos H-2 (correspondente ao HLA em humanos) diferem em sua resposta linfoproliferativa a epítomos de E7 (Shepherd *et al.*, 1992). Em coelhos observa-se uma forte

associação entre a regressão e transformação maligna de verrugas cutâneas, induzidas por *cottontail rabbit* papilomavírus (CRPV), com alelos dos genes DR α e DQ α (Han *et al.*, 1992). Verrugas causadas por uma variante CRPVa regredem em coelhos homozigotos para um determinado haplótipo MHC. Porém, quando causadas pela variante CRPVb, as verrugas tendem a persistir e evoluir para carcinoma. Em coelhos homozigotos para outro haplótipo MHC, verrugas causadas por ambas as variantes persistem e evoluem para carcinoma (Salmon *et al.*, 2000).

Podemos supor, com base em resultados de estudos de associação e modelos experimentais em animais, que os complexos antigênicos, envolvendo as diversas moléculas HLA e epítomos distintos do HPV, apresentam diferentes comportamentos na regulação da resposta imune contra o vírus. Assim, é plausível que a história natural das infecções por HPV, e das lesões associadas ao vírus, sejam influenciadas pelo polimorfismo presente em genes HLA. No entanto, estudos caso-controle são baseados em medidas únicas de exposição ao HPV, não sendo possível a avaliação da história natural do vírus e da doença, e sua relação com polimorfismo de HLA, o que exige uma avaliação em diversas ocasiões da infecção viral e das lesões precursoras.

Um estudo de coorte vem sendo desenvolvido em São Paulo desde 1993, em uma colaboração entre o Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer (coordenadora: Dra. Luisa L. Villa), filial de São Paulo, e a Universidade McGill (Coordenador: Dr. Eduardo Franco), em Montreal, Canadá. Neste estudo são realizadas medidas repetidas de exposição a variáveis de risco, como infecção por HPV, e da presença de lesões neoplásicas do colo uterino. Assim, é possível analisar o efeito de algum fator de risco, por exemplo o polimorfismo de genes HLA,

em vários pontos da história natural da infecção por HPV e lesões neoplásicas do colo uterino, como mostrado no esquema a seguir:

Com o intuito de estudar o efeito do polimorfismo dos genes HLA-DRB1 e DQB1 sobre o risco de positividade, transiência e persistência da infecção por HPV, realizamos a tipificação de alta resolução para estes genes em uma subamostra do estudo de coorte Ludwig-McGill. Também avaliamos o risco de desenvolvimento de lesões precursoras (SIL) do CCU associado ao polimorfismo de HLA-DRB1 e – DQB1. Além disso, investigamos a distribuição de grupos alélicos de DRB1 em uma amostra de pacientes com CCU, também provenientes da cidade de São Paulo, permitindo uma investigação mais detalhada do efeito destes polimorfismos nas várias fases da história natural do CCU. Em outra parte do estudo, avaliamos as respostas linfoproliferativas de pacientes com CCU contra peptídeos de E6 e E7 de HPV16, visando reconhecer os epítomos presentes nestas proteínas.

2. Polimorfismos dos genes HLA DRB1 e DQB1 e a história natural das infecções por papilomavírus humano e neoplasia intra-epitelial cervical

2.1. Polimorfismos dos genes HLA DRB1 e DQB1 e a história natural das infecções por papilomavírus humano

Artigo publicado no The Journal of Infectious Diseases 186(2): 164-72, 2002

Nesta seção são apresentados os dados referentes à análise de risco de infecção por HPV, oncogênicos, não-oncogênicos e HPV16, além de infecção transiente e persistente. Uma descrição breve do estudo de coorte Ludwig-McGill, além de um maior detalhamento da metodologia de tipificação de HLA é descrita em Materiais e Métodos a seguir. Os resultados obtidos nesta análise estão descritos na forma de artigo, como publicado (Maciag *et al.*, 2002).

2.1.1. Materiais e Métodos

2.1.1.1. Amostra: Estudo de coorte Ludwig-McGill

Em 1993, foi iniciado um estudo prospectivo sobre a história natural da infecção por HPV e da neoplasia cervical, 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). O estudo está sendo desenvolvido em São Paulo, com uma população de baixa renda. Estão sendo acompanhadas 2528 mulheres, por um período de pelo menos 5 anos, com as análises finais previstas para o ano de 2003. Os retornos das pacientes são quadrimestrais no primeiro ano de seguimento, e semestrais a partir do segundo ano (Franco *et al.*, 1999).

Em cada visita são preenchidos questionários epidemiológicos e coletados esfregaços cervicais para citologia e detecção de DNA de HPV. As informações contidas nos questionários abrangem todas as classes de fatores de risco conhecidos para a infecção por HPV e neoplasia cervical, incluindo variáveis sócio-

demográficas, vida reprodutiva, hábitos sexuais, fumo e dieta. A detecção e caracterização do genótipo viral presente no espécime é realizada através de PCR-SSO (Ting e Manos, 1990), complementadas por análise de RFLP (Bernard *et al.*, 1994). Caso a detecção de DNA de HPV seja positiva, avalia-se a infecção como sendo persistente (duas ou mais amostras positivas para o mesmo tipo de HPV ao longo do primeiro ano) ou transiente (com um único resultado positivo ao longo do seguimento). A definição precisa de persistência está sendo verificada através de seqüenciamento de regiões do genoma viral, que definem variantes dentro de um mesmo genótipo de HPV. Neste estudo também está sendo estimada a carga viral em cada espécime positivo para DNA de HPV. Em cada visita, também são coletadas amostras de sangue das pacientes para realização de análises sorológicas, incluindo a detecção de anticorpos IgG e IgM contra a proteína L1 do HPV.

2.1.1.2. Tipificação dos genes HLA-DRB1 e DQB1

A tipificação dos genes HLA-DRB1 e DQB1 foi realizada em 613 e 611 amostras, respectivamente, de 665 previamente selecionadas. Algumas amostras não foram tipadas ou por falha de amplificação para HLA ou falta de DNA. A metodologia para tipificação de alta resolução consistiu na amplificação do segundo exon polimórfico destes genes, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes HLA-DRB1 e DQB1 são os recomendados pelo 12º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade (12º IHWC) (Fernandez-Viña e Bignon, 1997). Foram utilizados de 1 a 5µl da solução de DNA de cada amostra por 30 µl de reação de PCR. O

controle para verificação de contaminação na reação consistia de uma amostra com todos os reagentes, exceto o DNA.

As ciclagens para DQB1 foram efetuadas no termociclador TC341 (Amersham-Pharmacia), num total de 35 ciclos e volume final de 30µl por amostra. As temperaturas e tempos foram: a) 94°C por 30 segundos; b) 55°C por 30 segundos e c) 72°C por 30 segundos. Um passo inicial de 2 minutos a 94°C e um final de 72°C por 10 minutos eram acrescentados à ciclagem.

Devido à complexa organização genômica dos genes HLA-DRB e ao elevado número de alelos no *locus* DRB1, a tipificação deste gene é realizada em 2 etapas. Inicialmente, faz-se uma amplificação e tipificação genérica. Nesta fase, utilizam-se iniciadores que amplificam o segundo exon dos diversos genes HLA-DRB, incluindo DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, além de pseudogenes como DRB6. Este produto genérico permite, com o uso de sondas específicas, realizar uma tipificação de baixa resolução. Deste modo, as amostras são classificadas em grupos alélicos. Os grupos alélicos de DRB1, identificados por este método são: DR1 (inclui os alelos DRB1*01); DR2 (inclui os alelos DRB1*15 e DRB1*16); DR4 (inclui os alelos DRB1*04 e DRB1*1410); DR8 (inclui os alelos DRB1*08); DR7 (DRB1*0701); DR9 (DRB1*09012); DR10 (DRB1*1001) e DR52 (inclui os alelos DRB1*03, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13 e DRB1*14). Posteriormente, as amostras atribuídas a esses grupos são amplificadas isoladamente, utilizando-se iniciadores específicos para cada um deles.

Na amplificação genérica de HLA-DRB foram utilizados simultaneamente 2 iniciadores na região 5' (2DRBAMP-A₁ e -A₂), em virtude de diferenças existentes entre as seqüências alélicas nesta posição. O iniciador na região 3' (2DRBAMP-B) foi utilizado para as amplificações genérica e específicas. As temperaturas e tempos

foram: a) 94°C por 30 segundos; b) 55°C para DRB genérico, 58°C para DR52, 60°C para DR1, DR2 e DR4, por 30 segundos e c) 72°C por 30 segundos. Um passo inicial de 2 minutos a 94°C e um final de 72°C por 10 minutos foram acrescentados à ciclagem. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador TC341 (Amersham-Pharmacia), em um total de 35 ciclos e volume final de 30µl. A eficácia da amplificação dos genes em cada amostra foi analisada através da corrida em gel de agarose a 1,5%, coloração com brometo de etídeo (0,1µg/ml) e visualização sob luz UV.

Aproximadamente 1,5µl de cada produto de amplificação era aplicado em membranas de náilon carregadas positivamente (Hybond N⁺, Amersham, Buckinghamshire, UK), de acordo com o gene a ser analisado. Após a aplicação manual, as membranas ("Dot-Blots") eram imersas em solução de NaOH 0,4N durante 5 minutos, desnaturando-se quimicamente os produtos de amplificação, seguido de neutralização em solução de SSPE 3x [20x SSPE (pH 7.4): 3,6M NaCl, 200mM NaH₂PO₄.H₂O, 20mM EDTA], por 1 minuto. Após secagem ao ar livre, as membranas foram fixadas com radiação UV (UV Crosslinker, FisherBiotech).

Para a reação de hibridização, as membranas eram inicialmente bloqueadas durante 30 minutos em 10ml de solução SSPE 0,1x - SDS 0,5%, e em seguida pré-hibridizadas durante 30 minutos em 10ml de solução SSPE 2x - SDS 0,1% ou TMACl [tetramethylammonium chloride 3M, 50mM Tris (pH 8.0), 0.1% SDS, 2mM EDTA (pH 8.0)]. Um total de 20 pmoles de cada oligonucleotídeo era adicionado à solução de pré-hibridização e incubadas por 3 a 16 horas. Após a hibridização, as membranas eram lavadas 2 vezes em 10ml de solução de pré-hibridização durante 20 a 25 minutos. Estas etapas eram todas realizadas em fornos de hibridização tipo *rotisserie*, em temperaturas variáveis ou fixas, dependendo se a solução utilizada na

hibridização era SSPE 2x - SDS 0,1% ou TMACl (hibridização à 54°C e lavagem à 59°C), respectivamente. A temperatura de hibridização adequada para cada sonda foi determinada como sendo 5 a 10°C abaixo da T_m da sonda.

As membranas eram posteriormente incubadas juntas em 500ml de SSPE 2x - SDS 0,1% contendo 8μl do conjugado *horseradish peroxidase-streptavidin* (HRP-SA, 1mg/ml), durante 30 minutos e temperatura ambiente, e lavadas 2 vezes em 500ml de SSPE 2x - SDS 0,1%, durante 10 minutos. Para detecção das hibridizações utilizou-se um sistema de quimioluminescência (Kit ECL – Direct nucleic acid labelling and detection system - Amersham Life Science) e impressão de filmes de raio-X Kodak X-Omat K XK-1, com exposição inicial de 5-10 minutos e uma segunda exposição variando de 30 a 60 minutos.

Um total de 36 sondas são utilizadas para discriminar os alelos em DQB1. Na tipificação genérica de DRB1, 30 sondas são recomendadas. Nas tipificações específicas para cada grupo, 9 sondas são utilizadas para DR1, 19 para DR2, 17 para DR4 e 52 para DR8/DR52. DR7, DR9 e DR10 são identificados na tipificação genérica de DRB1.

2.1.1.3. Análise estatística

A magnitude da associação entre os alelos e haplótipos dos genes HLA-DRB1 e DQB1 com a infecção por HPV foi estimada através da razão de chance [“odds ratio” (OR)] e seu respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%). As OR brutas e ajustadas foram obtidas através de regressão logística incondicional, utilizando-se o programa de estatística SPSS® versão 10.0 (SPSS, Chicago, IL). A função logística é representada como:

$$f(z) = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

onde $f(z)$ varia de 0 a 1 (função de probabilidade) quando z varia de $-\infty$ a $+\infty$, sendo z dado

$$z = \alpha + \sum \beta_i X_i$$

por:

onde α representa a constante e β os parâmetros estimados para cada variável X introduzida no modelo.

A regressão logística permite que potenciais fatores de confusão (“confounders”) sejam devidamente controlados na análise dos dados. Inicialmente foram calculadas as OR brutas e seus respectivos IC95%. O critério para definir variáveis de confusão foi baseado em alterações das estimativas pontuais (OR) brutas previamente obtidas. Foram incluídas nesta análise como fatores de confusão as variáveis idade e grupo étnico. A análise ajustada para estas variáveis visa minimizar potenciais vieses introduzidos por estas variáveis nas estimativas de risco, ou seja, evitar que o risco atribuído à variável de exposição não seja efeito de confusão de outra variável. O controle para a variável grupo étnico é importante visto que a frequência de determinados alelos e haplótipos HLA diferem entre as diversas etnias. Por outro lado, ajustes para a variável idade são importantes porque a probabilidade de infecção por HPV varia conforme a faixa etária.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO

2.2. Polimorfismos dos genes HLA DRB1 e DQB1 e risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais

Nesta seção são apresentados os dados referentes à análise de risco de desenvolvimento de lesões escamosas intraepiteliais cervicais (SIL) associado ao polimorfismo de HLA-DRB1 e –DQB1, em amostras da coorte Ludwig-McGill. As SIL são consideradas lesões precursoras do carcinoma invasivo, e também estão relacionadas com a infecção por HPV. As SIL são classificadas em lesões de baixo grau (LSIL) ou alto grau (HSIL), de acordo com o sistema de Bethesda (Solomon, 1989). As lesões de baixo grau abrangem amostras com alterações celulares sugestivas de infecção por HPV e displasias leves. As lesões de alto grau abrangem as displasias moderada e severa, além do carcinoma *in situ* (Solomon, 1988). As LSIL regredem espontaneamente com maior frequência, e o risco de progressão ao CCU é menor. A situação é inversa em relação às HSIL (Morrison, 1994). Entretanto, ainda não há informações suficientes que permitam prever quais lesões tendem a regredir e quais a progredir. Portanto, a análise do polimorfismo de genes HLA em pacientes com SIL é importante para investigarmos se estes polimorfismos poderiam auxiliar na definição de quais lesões estão sob risco de evoluir ao CCU. Além disto, podemos investigar se o mecanismo de associação entre polimorfismo de HLA e SIL pode ser explicado pela infecção por HPV.

2.2.1. Materiais e Métodos

2.2.1.1. Amostras

As amostras utilizadas nesta análise são provenientes do estudo de coorte Ludwig-McGill (Franco *et al.*, 1999) e analisadas na seção 2.1.1 (Maciag *et al.*, 2002). A cada visita da paciente é coletada uma amostra cervical e preparado um esfregaço em lâmina. Os esfregaços são analisados no laboratório de citopatologia do Instituto Ludwig e posteriormente enviados para uma nova leitura no Laboratório de citopatologia da Universidade McGill, em Montreal, Canadá, sob supervisão do Dr. Alex Ferenczy (Franco *et al.*, 1999). As leituras são independentes, realizadas de modo cego em amostras codificadas. A classificação utilizada para o diagnóstico baseou-se no sistema de Bethesda (Solomon, 1989).

2.2.1.2. Análise estatística

Os métodos utilizados nesta análise foram previamente descritos (seção 2.1.1.3; Maciag *et al.*, 2002). As OR brutas e ajustadas foram obtidas através de regressão logística incondicional. As análises para avaliação de risco de desenvolvimento de qualquer SIL ou HSIL foram ajustadas para idade e grupo étnico. Na análise de risco de desenvolvimento de SIL, foi incluído um modelo multivariado adicional considerando-se o efeito da variável que define o grau de persistência da infecção por HPV para cada paciente (negativo, infecção transiente e infecção persistente). Também foi realizada uma análise estratificada pelo grau de persistência da infecção por HPV, mantendo-se o ajuste para idade e etnia. Os resultados de citologia incluídos nestas análises compreendem os dados obtidos

durante os 2 primeiros anos de seguimento das pacientes, enquanto os resultados sobre infecção por HPV são restritos ao primeiro ano de seguimento. Para análise do risco de desenvolvimento de qualquer SIL ou HSIL (prevalência de SIL e HSIL), foram considerados casos qualquer mulher que tenha tido ao menos 1 diagnóstico citológico de SIL. Para codificar a variável que define persistência de SIL foram considerados casos as mulheres que tivessem no mínimo 2 resultados positivos consecutivos para SIL.

2.2.2. Resultados e Discussão

Utilizamos dois modelos para análise do risco de desenvolvimento de SIL associado ao polimorfismo de DRB1 e DQB1. No primeiro modelo ajustamos os dados para idade e etnia, visando controlar qualquer efeito de confusão causado por estas variáveis. A frequência de alguns alelos HLA pode variar dependendo do grupo étnico analisado, sendo importante controlar para etnia. Neste estudo não temos uma definição precisa de origem étnica, cuja informação está restrita a cor da pele das mulheres participantes da coorte. Apesar desta definição pouco precisa sobre origem étnica, verificamos que a distribuição das frequências alélicas variou entre mulheres brancas e não-brancas, conforme o esperado para a população brasileira (Moraes *et al.*, 1993). Além disto, não observamos um efeito de confusão significativo em nossos resultados que pudesse ser atribuído a etnia, mesmo para alelos que são característicos de determinado grupo étnico. Em outro modelo, acrescentamos a variável que define se a paciente era negativa para HPV, ou caso positiva para HPV, se a infecção era transiente ou persistente. O objetivo desta análise é verificar se o risco atribuído ao HLA pode ser explicado pela dinâmica das infecções por HPV que determinaram o desenvolvimento de SIL. Um desdobramento deste modelo foi a análise estratificada conforme a persistência, transiência ou ausência de infecção por HPV. A análise estratificada permite uma visualização mais adequada da distribuição dos alelos e sua relação com desenvolvimento de lesões, conforme a infecção por HPV.

Os alelos DQB1*0201 e DRB1*0301, apesar de terem mostrado uma associação negativa com a prevalência da infecção por HPV (tabelas 1 e 2), não

apresentaram nenhum efeito protetor contra o desenvolvimento de SIL (tabelas 7 e 8). Ao contrário, portadores do alelo DRB1*0301 apresentaram um risco aumentado de desenvolvimento de SIL (OR=2,01, CI: 1,0-4,0) e HSIL (OR=3,92, CI: 1,3-11,4), quando ajustado para infecção por HPV. Por outro lado, não observamos um risco significativo associado a este alelo sem considerar a infecção por HPV, provavelmente devido ao efeito protetor deste alelo contra a infecção por HPV nesta coorte. Podemos concluir que o risco aumentado de SIL e HSIL associado a DRB1*0301 é independente da persistência da infecção viral. A análise estratificada demonstra que o maior risco de desenvolvimento de SIL, associado a DRB1*0301, foi observado no grupo infectado transientemente por HPV (OR=2,89, CI: 0,8-10,2) (tabela 10), e não no grupo com infecções persistentes.

O efeito protetor de DRB1*0301-DQB1*0201 contra infecção por HPV, descrito na seção 2.1, foi observado tanto para HPV oncogênicos como não-oncogênicos. Isto sugere que indivíduos portadores deste haplótipo teriam uma maior proteção contra a infecção viral através de um mecanismo genérico, como uma resposta inata mais eficaz. Por outro lado, esta proteção não teria mais efeito a partir de um determinado momento, e não alteraria o curso natural da infecção, a não ser que uma resposta específica o fizesse.

O efeito de outros genes, em desequilíbrio de ligação com DR3, poderia em parte explicar estes resultados, modificando o risco atribuído a DR3. Por exemplo, um polimorfismo no promotor do gene TNF- α , o alelo 307^A, o qual parece estar associado com maior secreção de TNF- α , está em desequilíbrio de ligação com DR3 (Wilson *et al.*, 1993). O polimorfismo na posição 307 do promotor de TNF- α tem sido associado com risco para diversas doenças, inclusive infecção por *Chlamydia trachomatis* (Conway *et al.*, 1997). Variações encontradas em alguns sítios do

promotor do gene TNF- α parecem alterar a expressão do gene e conseqüentemente os níveis secretados desta citocina (Allen, 1999). Interações entre polimorfismos de microsátélites no gene TNF- α e de genes HLA de classe II no risco de SIL já foi demonstrado na população sueca (Ghaderi *et al.*, 2000), que apresenta uma associação positiva entre DRB1*15-DQB1*0602 e risco de CCU (Sanjeevi *et al.*, 1996). Como TNF- α está envolvido em processos inflamatórios, alterações na expressão de TNF- α poderia interferir na resposta inata e na resposta contra o HPV. Além disto, poderia induzir uma inflamação crônica mais intensa, acompanhada de atipias celulares no colo uterino, na presença de HPV ou outro agente infeccioso coadjuvante. Outros genes, como HLA de classe I, também poderiam ser importantes nestes processos.

Vários estudos descrevem uma associação positiva entre DQ3 e CCU (Wank e Thomssen, 1991, Helland *et al.*, 1992, Lin *et al.*, 2001). Neste estudo foi observado um efeito protetor de DQ3 contra o desenvolvimento de HSIL (OR=0,36, CI: 0,1-0,9) (tabela 7), ajustado para infecção por HPV. Este efeito pode ser principalmente atribuído ao alelo DQB1*0301 (tabela 7). Em um estudo caso-controle previamente conduzido em uma população do Nordeste brasileiro, não observamos nenhuma associação entre DQ3 e CCU ou prevalência de infecção por HPV (Maciag *et al.*, 2000). O alelo DQB1*0302, ao contrário de DQB1*0301, é mais freqüente em pacientes com SIL que nos controles normais, porém não em pacientes com HSIL (tabela 7). O alelo DQB1*0302 está em desequilíbrio de ligação com DRB1*04, que está associado com risco aumentado de SIL (OR=1,74, CI:1,0-3,0), perdendo significância após ajuste para infecção por HPV (tabela 8). Na análise estratificada observamos que o risco associado a estes alelos é restrito aos grupos negativos para HPV e com infecções transitórias (tabelas 9 e 10).

O haplótipo DRB1*04-DQB1*0302 não apresentou nenhuma associação com prevalência ou persistência da infecção por HPV, apesar de uma frequência um pouco aumentada no grupo com infecções persistentes de longa duração (tabela 6). O único alelo de DR4 que mostrou associação positiva com SIL foi DRB1*0404 (OR=4,20, CI: 1,6-10,8), cuja associação ainda foi significativa após ajustada para infecção por HPV (OR=3,12, CI: 1,0-9,5) (tabela 8). Um risco aumentado de infecção persistente foi observado para portadores do alelo DRB1*0404 (tabela 5), o que se reflete na diminuição da estimativa de risco de SIL após o ajuste para infecção por HPV. A maioria das SIL (6/8) em pacientes portadoras de DRB1*0404 foi observada em mulheres com infecções persistentes por HPV. Os alelos DRB1*0411 e DRB1*0401 foram encontrados em uma maior proporção de pacientes com SIL e SIL persistente, respectivamente, quando comparado a mulheres sadias (tabela 8). A análise estratificada mostra que a associação com DRB1*0411 foi mais forte no grupo com infecção transitória por HPV (OR=8,02, CI: 1,0-67,5), enquanto com DRB1*0401 foi no grupo negativo para HPV (OR=13,46, CI: 1,2-156,3) (tabela 10). No entanto, todas estas observações baseiam-se em um número amostral pequeno, e conseqüentemente produzem estimativas imprecisas.

Inúmeros estudos descrevem DR4, ou alelos de DQ em desequilíbrio de ligação com DR4, como fator de risco para o desenvolvimento de CCU (Apple *et al.*, 1994, Odunsi *et al.*, 1996; Ferrera *et al.*, 1999), sendo que as associações são restritas a alguns alelos de DR4, como DRB1*0401, *0403, *0405 e *0407. Os dados de associação entre DR4 e infecção por HPV sugeriram uma interação entre DRB1 e DQB1 (ver seção 2.1). A análise dos diferentes haplótipos de DR4 e risco de SIL revelou que o haplótipo DR4-DQB1*0302 é um pouco mais freqüente em mulheres com SIL (OR=1,69, CI: 1,0-3,0), e HSIL (OR=1,35, CI: 0,5-3,7), quando comparado

ao grupo de mulheres sem SIL. Devido ao pequeno número amostral, as estimativas foram imprecisas quando consideramos o haplótipo DR4-DQB1*0301, e nenhuma associação significativa foi observada.

O alelo DQB1*0601, o qual está associado com risco aumentado de persistência de infecção por HPV (tabela 4), mostrou-se associado com maior risco de desenvolvimento de HSIL (OR=16,8, CI: 2,1-133,3) e persistência das lesões (OR=18,2, CI: 2,4-139,4) (tabela 7). Este risco pode ser explicado pela associação deste alelo com a persistência da infecção por HPV. Em um estudo anterior, detectamos a presença do alelo DQB1*0601 apenas entre pacientes com CCU, e não entre os controles, o que não permitiu estimar a contribuição deste alelo no risco de CCU (Maciag *et al.*, 2000). Não temos informação suficiente em outros estudos que pudessem indicar uma associação com DQB1*0601, devido a baixa frequência deste alelo em caucasóides. Em um estudo caso-controle na população espanhola, Montoya *et al.* (1998) não encontraram controles portadores de DQB1*0601, apesar de 6% dos pacientes com carcinoma *in situ* e invasivo portarem este alelo. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Outros estudos, realizados em populações orientais com frequência alta de DQB1*0601, podem ser úteis na avaliação deste alelo como fator de risco para SIL e CCU.

O efeito protetor de DR1 observado contra infecção persistente de longa duração (tabela 5) e CCU (Maciag *et al.*, 2000), não foi significativo para o desenvolvimento de SIL (OR=0,85, CI: 0,5-1,5) (tabela 8). No entanto, o alelo DRB1*0101 mostrou tendências opostas às observadas para o alelo DRB1*0102 em pacientes com SIL, apesar de ambos os alelos terem sido menos freqüentes em pacientes com HSIL. Porém, estas diferenças são sutis e não foram significativas, merecendo cautela na sua interpretação. As cadeias DR β codificada pelos alelos

DRB1*0101 e *0102 diferem apenas na posição 86 da cadeia DR β , sendo que DRB1*0101 codifica para glicina e DRB1*0102 para valina nesta posição. Além disto, ambos os alelos estão em desequilíbrio de ligação com DQB1*0501. A posição 86 da cadeia DR β será analisada de modo independente na seção 3 deste trabalho.

Uma associação positiva entre DRB1*12 e SIL (OR=2,01, CI: 1,0-7,1) foi verificada, sendo mais forte após ajuste para infecção por HPV (OR=3,39, CI: 1,1-10,6) (tabela 8). Na análise estratificada, a associação com DRB1*12 foi significativa apenas no grupo com infecção transitória (OR=6,91, CI: 1,4-34,8). Não há relatos prévios demonstrando associações entre DR12 e SIL ou CCU. Como discutido anteriormente, associações com SIL independentes da infecção por HPV e restritas ao grupo com infecção transiente são de difícil interpretação. No entanto, o fato de encontrarmos associações específicas para este grupo pode indicar que o desenvolvimento de SIL nestas pacientes apresenta mecanismos particulares, em parte diferentes daqueles associados com infecções persistentes.

Não foi observada associação entre DRB1*15 e SIL, apesar da descrição de DR15 ser um fator de risco ao CCU em uma população do Nordeste brasileiro (Maciag *et al.*, 2000), em norte-americanos de origem latina e suecos (Apple *et al.*, 1994, Sanjeevi *et al.*, 1996). Vários estudos também não detectaram associações positivas com DR15, o que pode indicar que certas associações são específicas para determinada população. Por outro lado, DRB1*1601, que foi significativamente mais freqüente em mulheres infectadas por HPV não-oncogênicos e com infecção persistente (tabelas 2 e 5), não está associado com um risco aumentado de SIL (tabela 8). Entre as 6 pacientes que são DRB1*1601 e com infecção persistente, nenhuma teve diagnóstico de SIL, talvez porque a maioria das mulheres portadoras

de DRB1*1601 apresenta infecção por HPV não-oncogênicos. Não há relatos prévios ou qualquer indicação de que DRB1*1601 fosse um fator de risco ao desenvolvimento de SIL ou CCU.

Não foi observada neste estudo uma boa correlação entre o risco de infecção persistente por HPV e o risco de SIL ou HSIL associado a determinado alelo HLA. Para avaliar quais associações entre HLA e SIL eram dependentes ou independentes da infecção por HPV, analisamos os riscos através do modelo que inclui HPV como uma covariável. Os resultados não mostraram em sua maioria um desvio das estimativas de risco em direção à unidade; ou seja, ausência de efeito após considerar a infecção por HPV e seu grau de persistência. Isto seria esperado caso o risco de doença atribuído ao HLA fosse devido ao risco observado com prevalência e persistência da infecção por HPV. De fato, a maior parte das associações significativas com lesões foi verificada nos grupos negativos para HPV e com infecções transitórias. Estes 2 grupos possuem menor tamanho amostral, e as estimativas obtidas são proporcionalmente menos precisas, exigindo maior precaução na interpretação dos resultados. O número de pacientes com SIL é ainda muito pequeno para que se possa detectar a maioria destas associações de modo confiável, sendo isto uma limitação importante neste estudo. As diferentes possibilidades na história natural destas lesões também limitam nossa análise. Grande parte das lesões pode regredir espontaneamente e não progredir ao CCU, seja devido à eliminação da infecção por HPV, ou por terem outra origem etiológica, principalmente em lesões de baixo grau.

Pode-se esperar que SIL associadas com verdadeiras infecções transientes por HPV também tenham um caráter transiente e portanto, a grande maioria apresente regressão espontânea, não evoluindo para carcinoma invasivo. Por outro

lado, SIL associadas com infecções transientes por HPV poderiam ter um mecanismo patológico distinto das lesões associadas com infecções persistentes. Também não podemos excluir a possibilidade de erro classificatório nas infecções transientes por HPV, onde algumas poderiam ser verdadeiras infecções persistentes, mas não detectadas. Outra possibilidade é que as pacientes tenha tido uma infecção transiente durante o primeiro ano de seguimento, e adquirido uma nova infecção persistente durante o segundo ano, e esta esteja associada com o desenvolvimento de lesão. Entretanto, existe uma ótima correlação nesta coorte entre a infecção por HPV detectada no primeiro ano de seguimento e o desenvolvimento posterior de SIL, sendo máxima em um intervalo de 4 meses e diminuindo gradualmente até 48 meses (Schlecht *et al.*, 2000).

Para analisar estas possibilidades, um tamanho amostral maior e um período mais longo de seguimento se fazem necessários. Tipificações de HLA-DRB1 e DQB1 estão em andamento em mais 650 amostras da coorte, cujos resultados devem esclarecer quais associações são realmente importantes, além de aumentar a precisão do estudo. Também uma melhor definição das infecções por HPV dentro de um período mais longo de seguimento deve fornecer definições mais precisas de transiência e persistência.

Em conclusão, observamos que DRB1*0301, apesar do efeito protetor contra infecção por HPV, é um fator de risco ao desenvolvimento de SIL, independente da infecção por HPV, assim como DR12. Um risco aumentado de SIL e HSIL foi observado para DR4 e DQB1*0601, respectivamente. E uma associação negativa entre o alelo DQB1*0301 e HSIL foi verificada. Não detectamos nenhuma associação, negativa ou positiva, entre SIL ou HSIL e DR1, DR13 ou DR15.

Tabela 7. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência e persistência de qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) e prevalência de lesões de alto grau (HSIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DQB1.

DQB1 alleles	Normal n=487	SIL		SIL persistente		HSIL				
		n=94	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b	n=26	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b	n=29	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b
*0201	189	36	0,94 (0,6-1,5)	1,31 (0,8-2,2)	9	0,82 (0,4-1,9)	1,48 (0,6-3,8)	12	0,95 (0,4-2,1)	1,48 (0,6-3,4)
*03	233	45	1,01 (0,6-1,6)	0,90 (0,5-1,5)	9	0,59 (0,3-1,4)	0,45 (0,2-1,1)	10	0,48 (0,2-1,1)	0,36 (0,1-0,9)
*0301	162	27	0,84 (0,5-1,4)	0,85 (0,5-1,5)	5	0,49 (0,2-1,3)	0,46 (0,2-1,4)	5	0,42 (0,2-1,1)	0,37 (0,1-1,1)
*0302	68	20	1,63 (0,9-2,9)	1,59 (0,8-3,1)	4	1,13 (0,4-3,4)	0,93 (0,3-3,2)	5	0,90 (0,3-2,7)	0,78 (0,2-2,6)
*0402	80	11	0,67 (0,3-1,3)	0,57 (0,3-1,2)	8	2,21 (0,9-5,3)	2,12 (0,8-5,8)	5	1,13 (0,4-3,1)	1,05 (0,4-3,1)
*05	172	28	0,78 (0,5-1,3)	0,74 (0,4-1,3)	10	1,18 (0,5-2,7)	1,02 (0,4-2,5)	10	0,97 (0,4-2,1)	0,94 (0,4-2,2)
*06	194	42	1,22 (0,8-1,9)	1,08 (0,7-1,8)	9	0,78 (0,3-1,8)	0,68 (0,3-1,7)	13	1,23 (0,6-2,6)	1,08 (0,5-2,5)
*0601	2	2	5,11 (0,7-37,1)	2,33 (0,2-23,2)	2	18,2 (2,4-139,4)	7,25 (0,6-84,1)	2	16,8 (2,1-133,3)	8,95 (0,8-102,1)

^a Ajustado para idade e etnia;

^b Ajustado para idade, etnia e infecção por HPV (negativo, transitante e persistente).

Tabela 8. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência e persistência de qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) e prevalência de lesões de alto grau (HSIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DRB1.

DRB1 alleles	Normal	SIL				SIL persistente				HSIL			
	n=490	n=92	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b	n=27	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b	n=29	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b			
*01	104	17	0,85 (0,5-1,5)	0,90 (0,5-1,7)	6	1,13 (0,4-2,9)	1,18 (0,4-3,3)	5	0,81 (0,3-2,2)	0,86 (0,3-2,5)			
*0101	48	5	0,53 (0,2-1,4)	0,57 (0,2-1,6)	3	1,26 (0,4-4,4)	1,31 (0,3-5,3)	2	0,70 (0,2-3,1)	0,74 (0,2-3,5)			
*0102	46	10	1,17 (0,6-2,4)	1,32 (0,6-3,0)	2	0,76 (0,2-3,3)	0,86 (0,2-4,3)	2	0,76 (0,2-3,3)	0,87 (0,2-4,2)			
*03	114	18	0,80 (0,5-1,4)	1,13 (0,6-2,1)	6	0,94 (0,4-2,4)	1,61 (0,6-4,7)	8	1,38 (0,6-3,2)	2,17 (0,8-5,6)			
*0301	80	16	1,09 (0,6-2,0)	2,01 (1,0-4,0)	5	1,17 (0,4-3,2)	3,27 (0,9-11,4)	7	1,72 (0,7-4,2)	3,92 (1,3-11,4)			
*04	82	24	1,74 (1,0-3,0)	1,53 (0,8-2,8)	5	1,13 (0,4-3,1)	0,91 (0,3-2,8)	7	1,32 (0,5-3,4)	1,09 (0,4-3,0)			
*0401	10	3	1,73 (0,5-6,5)	1,14 (0,3-4,9)	2	4,16 (0,8-20,4)	2,36 (0,4-14,9)	0	nd	nd			
*0404	11	8	4,20 (1,6-10,8)	3,12 (1,0-9,5)	2	3,37 (0,7-16,2)	2,09 (0,3-12,7)	2	3,34 (0,7-16,1)	2,04 (0,3-11,9)			
*0411	13	5	2,22 (0,8-6,4)	3,00 (0,9-10,4)	1	1,57 (0,2-12,7)	2,76 (0,3-30,0)	1	1,48 (0,2-11,9)	2,05 (0,2-20,1)			
*07	115	20	0,86 (0,5-1,5)	0,87 (0,5-1,6)	5	0,74 (0,3-2,0)	0,94 (0,3-2,8)	7	0,92 (0,4-2,3)	1,09 (0,4-2,9)			
*08	70	13	1,04 (0,5-2,0)	0,89 (0,4-1,8)	6	1,76 (0,7-4,6)	1,43 (0,5-4,1)	4	1,02 (0,3-3,1)	0,84 (0,3-2,7)			
*0801	17	4	1,36 (0,4-4,2)	1,53 (0,4-5,6)	2	2,37 (0,5-11,2)	2,05 (0,3-12,2)	2	2,44 (0,5-11,6)	2,33 (0,4-13,1)			
*0807	14	3	1,20 (0,3-4,3)	0,75 (0,2-2,9)	2	2,55 (0,5-12,0)	1,79 (0,3-10,2)	2	2,68 (0,6-12,7)	1,83 (0,3-9,8)			
*09	21	3	0,76 (0,2-2,6)	0,67 (0,2-2,6)	0	nd	nd	0	nd	nd			
*10	16	3	1,05 (0,3-3,7)	0,88 (0,2-3,6)	0	nd	nd	0	nd	nd			
*11	111	21	1,02 (0,6-1,7)	1,15 (0,6-2,1)	4	0,59 (0,2-1,7)	0,58 (0,2-1,9)	3	0,39 (0,1-1,3)	0,39 (0,1-1,4)			
*1103	4	3	4,31 (0,9-19,9)	5,51 (0,9-32,9)	1	4,81 (0,5-46,4)	9,82 (0,6-149)	1	5,12 (0,5-50,9)	7,49 (0,6-91,8)			
*12	13	6	2,61 (1,0-7,1)	3,39 (1,1-10,6)	2	2,85 (0,6-13,4)	5,94 (0,8-46,9)	2	2,68 (0,6-12,7)	4,90 (0,8-30,0)			
*13	121	21	0,90 (0,5-1,5)	1,01 (0,6-1,8)	5	0,71 (0,3-1,9)	0,99 (0,3-3,0)	5	0,69 (0,3-1,9)	0,76 (0,3-2,2)			

Tabela 8. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência e persistência de qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) e prevalência de lesões de alto grau (HSIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DRB1.

DRB1 alleles	Normal		SIL		SIL persistente				HSIL	
	n=490	n=92	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b	n=27	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b	n=29	OR (IC 95%) ^a	OR (IC 95%) ^b
*14	24	5	1,15 (0,4-3,1)	0,92 (0,3-2,8)	3	2,37 (0,7-8,5)	1,53 (0,3-6,8)	2	1,51 (0,3-6,8)	1,14 (0,2-6,0)
*1401	16	4	1,40 (0,5-4,3)	1,04 (0,3-3,7)	3	3,51 (0,9-13,0)	2,37 (0,5-11,8)	2	2,14 (0,5-9,9)	1,66 (0,3-9,4)
*15	95	18	1,02 (0,6-1,8)	0,93 (0,5-1,7)	4	0,71 (0,2-2,1)	0,69 (0,2-2,2)	9	1,92 (0,8-4,4)	2,03 (0,8-5,0)
*16	35	3	0,45 (0,1-1,5)	0,32 (0,1-1,1)	2	1,02 (0,2-4,5)	0,73 (0,1-3,7)	2	1,04 (0,2-4,6)	0,77 (0,2-3,8)
*1601	12	1	0,47 (0,1-3,6)	0,21 (0,0-1,7)	1	1,52 (0,2-12,3)	0,55 (0,1-5,1)	1	1,53 (0,2-12,5)	0,64 (0,1-5,7)

^a Ajustado para idade e etnia;

^b Ajustado para idade, etnia e infecção por HPV (negativo, transitante e persistente).

Tabela 9. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DQB1, e estratificada pelo comportamento da infecção por HPV.

alleles	Lesão Intraepitelial Escamosa					
	HPV negativo		Infecção transitente		Infecção persistente	
	Normal/SIL n=300 / 9	OR (IC 95%) ^a	Normal/SIL n=112 / 26	OR (IC 95%) ^a	Normal/SIL n=75 / 59	OR (IC 95%) ^a
*0201	133 / 3	0,58 (0,1-2,4)	35 / 10	1,22 (0,5-3,1)	21 / 23	1,70 (0,8-3,6)
*03	143 / 5	1,61 (0,4-6,3)	48 / 12	1,02 (0,4-2,5)	42 / 28	0,78 (0,4-1,6)
*0301	99 / 3	1,06 (0,3-4,4)	38 / 8	0,84 (0,3-2,2)	25 / 16	0,81 (0,4-1,7)
*0302	46 / 2	2,00 (0,4-10,4)	8 / 6	3,32 (0,9-11,6)	14 / 12	1,11 (0,5-2,7)
*0402	45 / 1	0,76 (0,1-6,3)	22 / 1	0,18 (0,0-1,4)	13 / 9	0,81 (0,3-2,1)
*05	107 / 1	0,20 (0,0-1,7)	36 / 9	1,69 (0,6-4,5)	29 / 18	0,67 (0,3-1,4)
*06	110 / 5	2,16 (0,6-8,3)	52 / 10	0,72 (0,3-1,8)	32 / 27	1,12 (0,6-2,3)
*0601	1 / 0	nd	0 / 0	nd	1 / 2	3,07 (0,3-36,1)

^a Ajustado para idade e etnia;

Tabela 10. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DRB1, e estratificada pelo comportamento da infecção por HPV.

alleles	Lesão Intraepitelial Escamosa					
	HPV negativo		Infecção transitente		Infecção persistente	
	Normal/SIL n=299 / 11	OR (95% CI)	Normal/SIL n=113 / 24	OR (95% CI)	Normal/SIL n=78 / 57	OR (95% CI)
*01	68 / 1	0,31 (0,0-2,5)	20 / 5	1,73 (0,5-5,6)	16 / 11	0,95 (0,4-2,3)
*0101	30 / 1	0,91 (0,1-7,6)	11 / 1	0,46 (0,1-3,8)	7 / 3	0,50 (0,1-2,1)
*0102	34 / 0	nd	4 / 4	10,78 (2,0-58,5)	8 / 6	1,14 (0,4-3,6)
*03	83 / 3	0,83 (0,2-3,3)	17 / 5	1,41 (0,5-4,4)	14 / 10	0,98 (0,4-2,5)
*0301	64 / 3	1,22 (0,3-4,9)	9 / 5	2,89 (0,8-10,2)	7 / 8	1,87 (0,6-5,7)
*04	49 / 3	2,43 (0,6-10,0)	16 / 7	2,17 (0,7-6,5)	17 / 14	1,15 (0,5-2,6)
*0401	4 / 1	13,46 (1,2-156,3)	3 / 0	nd	3 / 2	0,83 (0,1-5,3)
*0404	6 / 1	5,61 (0,6-52,6)	2 / 1	2,53 (0,2-30,8)	3 / 6	2,87 (0,7-12,3)
*0411	9 / 1	3,38 (0,4-30,2)	2 / 2	8,02 (1,0-67,5)	2 / 2	1,62 (0,2-12,7)
*07	72 / 2	0,74 (0,2-3,6)	27 / 3	0,29 (0,1-1,3)	16 / 15	1,43 (0,6-3,2)
*08	38 / 3	3,05 (0,7-12,7)	19 / 2	0,45 (0,1-2,1)	13 / 8	0,80 (0,3-2,1)
*0801	11 / 2	7,58 (1,3-44,4)	2 / 1	2,20 (0,2-27,5)	4 / 1	0,3 (0,0-2,9)
*0807	6 / 0	nd	5 / 0	nd	3 / 3	1,41 (0,3-7,5)
*09	13 / 0	nd	4 / 1	2,28 (0,2-25,5)	4 / 2	0,58 (0,1-3,4)
*10	11 / 0	nd	2 / 0	nd	3 / 3	1,51 (0,3-8,0)
*11	68 / 4	1,94 (0,5-6,9)	26 / 7	1,46 (0,5-4,0)	17 / 10	0,77 (0,3-1,9)
*1103	2 / 1	20,80 (1,5-281,2)	2 / 0	nd	0 / 2	nd

Tabela 10. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para prevalência qualquer lesão intraepitelial cervical (SIL) durante o primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com os alelos de HLA-DRB1, e estratificada pelo comportamento da infecção por HPV.

alleles	Lesão Intraepitelial Escamosa					
	HPV negativo		Infecção transitente		Infecção persistente	
	Normal/SIL n=299 / 11	OR (95% CI)	Normal/SIL n=113 / 24	OR (95% CI)	Normal/SIL n=78 / 57	OR (95% CI)
*12	8 / 0	nd	4 / 4	6,91 (1,4-34,8)	1 / 2	2,17 (0,2-25,6)
*13	70 / 3	1,13 (0,3-4,5)	38 / 4	0,41 (0,1-1,3)	13 / 14	1,88 (0,8-4,5)
*14	15 / 0	nd	4 / 1	1,25 (0,1-12,6)	5 / 4	1,02 (0,3-4,1)
*1401	10 / 0	nd	3 / 0	nd	3 / 4	1,69 (0,3-8,3)
*15	55 / 2	0,96 (0,2-4,6)	23 / 5	1,02 (0,3-3,2)	17 / 11	0,88 (0,4-2,1)
*16	19 / 0	nd	7 / 1	0,77 (0,1-6,9)	9 / 2	0,3 (0,1-1,3)
*1601	4 / 0	nd	2 / 1	3,25 (0,2-44,5)	6 / 0	nd

^a Ajustado para idade e etnia;

2.3. Polimorfismos dos genes HLA DRB1 e DQB1 e risco de desenvolvimento de carcinoma invasivo de colo uterino

Em continuidade com as análises das seções anteriores, analisamos aqui a distribuição dos grupos alélicos de DRB1 em pacientes com CCU, provenientes da mesma cidade que as mulheres participantes do estudo de coorte Ludwig-McGill. A análise de amostras com CCU é interessante para observarmos quais as associações com infecção por HPV e SIL que podem refletir no risco de CCU. O carcinoma invasivo é o estágio mais avançado na história natural da doença associada ao HPV. Entre as inúmeras mulheres infectadas por HPV, apenas uma ínfima parte evoluirá para o CCU. Neste sentido, é relevante a investigação de possíveis fatores genéticos que influenciem a evolução para esta doença. Apesar de muitos estudos terem abordado este assunto, nenhum teve a possibilidade de relacionar os resultados obtidos em diferentes fases da doença, em uma população de características semelhantes.

2.3.1. Materiais e Métodos

2.3.1.1. Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo IBCC (Instituto Brasileiro de Controle do Câncer) com a colaboração dos cirurgiões Dr. Ronaldo Costa, Dr. Francisco Coelho e suas respectivas equipes. Todas as pacientes participantes do estudo assinaram um termo de consentimento pós-informado,

aprovado pelos comitês de ética do IBCC e Hospital A. C. Camargo. Os critérios de inclusão de pacientes neste estudo foram:

- Pacientes com carcinoma invasivo do colo uterino, preferencialmente em estadiamento clínico Ib1 ou Ib2;
- Pacientes submetidas à cirurgia de Wertheim-Meigs ou histerectomia radical;
- Pacientes sem quimioterapia ou radioterapia prévia;
- Pacientes que não tenham recebido transfusão sangüínea nos 3 meses que antecedem a cirurgia.

Foram excluídas do estudo pacientes com tratamentos oncológicos prévios (quimioterapia, radioterapia, cirurgia), presença de doenças inflamatórias ou autoimunes, utilização de medicamentos imunomoduladores e pacientes com estado geral comprometido.

As amostras de tecido tumoral foram coletadas imediatamente após a retirada da peça cirúrgica. Um fragmento cuneiforme de aproximadamente 0,5x1,0x1,0cm era retirado preferencialmente na posição de 12 horas, ou seja, na porção anterior do colo. Na impossibilidade da retirada de um fragmento desta região, escolhíamos um local onde o tecido tumoral apresentasse um aspecto de melhor viabilidade, sem necrose, áreas hemorrágicas ou fibrose extensa. O fragmento retirado correspondia a aproximadamente 10% a 30% do tamanho total do tumor. O restante da peça cirúrgica era enviado para análise anátomo-patológica. Após a obtenção do fragmento, este era colocado em 10 ml de meio RPMI 1640 suplementado com gentamicina (10µg/ml), anfotericina B (25 µg/ml) e penicilina G (100U/ml) e transportado em gelo, onde permanecia até o processamento (Yannelli *et al.*, 1996). Fragmentos de tecido tumoral obtido de algumas pacientes também foram coletados

em nitrogênio líquido e estão conservados a -80°C . As amostras tumorais foram identificadas neste estudo pela letra T seguida de um número de identificação (Ex.: amostra T1).

2.3.1.2. Tipificação do HPV

2.3.1.2.1. Extração de DNA do tecido tumoral

Alguns fragmentos de tecido tumoral de cada paciente foram submetidos à digestão com proteinase K [50 $\mu\text{g/ml}$ em tampão de lise (0,01M Tris-HCl, 5mM EDTA, 0,5% SDS)] por um período de 12h em banho-maria à 55°C . Posteriormente, o DNA era extraído usando-se uma coluna de cromatografia (GFXTM Genomic, Blood DNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc., EUA).

2.3.1.2.2. Tipificação de HPV por hibridização reversa

A metodologia da hibridização reversa consiste na amplificação do gene L1 utilizando-se iniciadores MY09/11 (Ting e Manos, 1990) biotinilados. O produto era desnaturado e submetido à hibridização em uma membrana que contém seqüências de 27 diferentes tipos de HPV. Para revelação, foi usada a enzima HRP (horseradish peroxidase), conjugada à estreptavidina, seguida de adição do substrato TMB (tetrametilbenzidina) (Gravitt *et al.*, 1998).

2.3.1.3. Tipagem do gene HLA-DRB1

A tipificação de HLA-DRB1 nas amostras das pacientes com CCU foi realizada a partir do DNA extraído do tecido tumoral. O método para tipificação de HLA foi PCR-SSO, como descrito na seção 2.1.1.2. Apenas o resultado genérico da tipificação para HLA-DRB1 foi obtido nestas amostras até o momento, o que permite uma discriminação de baixa resolução semelhante à obtida por métodos sorológicos. A tipificação realizada não permitiu a discriminação entre DR8 e DR12 de modo satisfatório, exceto para algumas amostras. Para evitar erro classificatório, as amostras com esta tipificação foram agrupadas como DR8/DR12.

2.3.1.4. Análise estatística

A magnitude das associações entre o CCU e polimorfismo de HLA-DRB1 foi estimada através da OR e IC95%. Os dados nesta análise correspondem à análise univariada, sem ajustes adicionais por outras variáveis. Como grupo controle foram utilizadas amostras tipadas para HLA provenientes de mulheres da coorte Ludwig-McGill (ver seção 2.1.1.1), que apresentaram citologias normais durante os 2 primeiros anos de seguimento, independente de infecção por HPV.

2.3.2. Resultados e Discussão

Um total de 68 amostras provenientes de pacientes com CCU foi obtido no IBCC. A média de idade das pacientes foi de 46,6 anos e significativamente maior que a do grupo controle (32,0 anos; $p < 0,001$, teste t). O HPV16 foi o tipo mais freqüente (60,3%, incluindo as infecções múltiplas), seguido por HPV18 (7,4%). Em 13 amostras (19,1%) não foi detectado DNA de HPV e em 4 amostras (5,9%) não foi possível identificar o tipo (tabela 11). A maioria dos tumores teve diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso (92,6%), e o restante de adenocarcinoma. A positividade para DNA de HPV nesta série de tumores (80,9%) está abaixo do detectado em outros estudos. O aumento da sensibilidade dos métodos de detecção de DNA de HPV, especialmente após o uso de PCR, mostrou que em mais de 90% dos tumores do colo uterino é possível detectar o vírus (Bosch *et al.*, 1995). Uma questão é se realmente existem tumores do colo uterino verdadeiramente negativos para HPV, ou se houve falha na detecção do DNA viral. Walboomers *et al.* (1999), utilizando diferentes conjuntos de iniciadores que amplificam fragmentos menores do DNA de HPV, e usando o gene E7 do vírus como alvo, conseguiram uma positividade para HPV em 99,7% das amostras tumorais. Um resultado interessante foi a alta prevalência de HPV18 entre os casos previamente negativos. A integração do DNA viral no genoma do hospedeiro e alterações no gene L1 foram apontadas como causas de alguns resultados falso-negativos. Outros fatores como necrose extensa da amostra, queratinização excessiva e ausência de células tumorais também contribuem na obtenção de falso-negativos (Walboomers *et al.*, 1999).

Tabela 11. Relação e informações gerais das amostras de CCU coletadas no IBCC.

Amostra	Idade	Diagnóstico	Estadiamento clínico	Tipo de HPV	HLA-DRB1 (Tipificação genérica)
T1		CEC ^a		nd ^b	DR8/12-DR11
T2	70	CEC	Ib1	53	DR3-DR4
T3	47	CEC	Ib2	16	DR4-DR11
T4	32	CEC	Ib2	16/18	DR7-DR15
T5	35	CEC	IIa	16/18	DR4-DR4
T6	45	CEC	IIa	16	DR10-DR16
T7	45	CEC	Ib2	16	DR7-DR15
T8	49	CEC	Ib1	16/53	DR4-DR13
T9	55	Adeno ^c	Ib2	nd	DR4-DR13
T10	35	CEC	Ib1	16	DR4-DR4
T11	42	CEC	Ib1	16	DR1-DR11
T12	34	CEC	IIa	16	DR4-DR7
T13	55	CEC	Ib1	6	DR8/12-DR11
T14	53	CEC	Ib1	16/73/84	DR1-DR1
T15	34	CEC	Ib2	16	DR1-DR4
T16	43	CEC	Ib2	16	DR4-DR13
T17	50	CEC	Ib2	16	DR11-DR13
T18	47	CEC	Ib1	16	DR1-DR7
T19	39	CEC	IIa	18	DR7-DR15
T20	45	CEC	Ib2	16	DR14-DR16
T21	56	CEC	Ib2	16	
T22	37	CEC	Ib2	16	DR7-DR8/12
T23	38	CEC	Ib1	nd	DR8/12-DR13
T24	69	CEC	Ib1	33	DR4-DR4
T25	32	CEC	Ib1	16	DR11-DR15
T26	57	CEC	Ib1	16	DR8/12-DR13
T27	49	CEC	Ib2	16	DR7-DR7
T28	51	CEC	Ignorado	26	DR11-DR13
T29	42	CEC	Ib1	16	DR1-DR13
T30	35	CEC	Ib2	16	
T31	44	CEC	Ib1	nd	DR8/12-DR7
T32	50	Adeno	Ib2	18	DR4-DR8/DR12
T33	45	CEC	Ib1	16	DR1-DR14
T34	68	CEC	IIa	16	DR9-DR15
T35	50	Adeno	Ib1	16	DR4-DR13
T36	35	CEC	Ib2	+ ^d	DR13-DR13
T37	35	CEC	Ignorado	16	DR7-DR15
T38	45	CEC	Ib2	nd	DR7-DR7
T39	37	CEC	Ib1	nd	DR4-DR7
T40	45	CEC	Ib1	nd	DR8/12-DR15
T41	48	CEC	Ib2	16	DR1-DR3
T42	56	CEC	Ib1	16	DR1-DR15
T43	49	CEC	Ib1	16	DR1-DR8/12
T44	38	CEC	Ib1	16/83	DR3-DR7
T45	32	CEC	Ib2	nd	DR4-DR15
T46	40	CEC	Ib2	nd	DR1-DR13
T47	50	CEC	Ib1	33	DR4-DR13

Tabela 11. Relação e informações gerais das amostras de CCU coletadas no IBCC.

Amostra	Idade	Diagnóstico	Estadiamento clínico	Tipo de HPV	HLA-DRB1 (Tipificação genérica)
T48	52	Adeno	Ib1	nd	DR8/12-DR15
T49	63	CEC	Ib2	+	DR4-DR16
T50	49	CEC	Ib1	16	DR3-DR11
T51	57	CEC	Ib1	18	DR8/12-DR8/12
T52	33	CEC	Ib1	16	DR9-DR11
T53	49	CEC	Ignorado	16	DR4-DR7
T54	36	Adeno	Ib1	16	DR15-DR15
T56	64	CEC	Ib1	45	DR8/12-DR11
T57	37	CEC	Ila	16	DR7-DR11
T58	37	CEC	Ib2	16	DR1-DR13
T59	55	CEC	Ila	16	DR8/12-DR52
T60	53	CEC	Ib1	31	DR10-DR13
T61	57	CEC	Ib1	nd	DR52-DR52
T62	56	CEC	Ib1	+	DR4-DR8/12
T63	57	CEC	Ib1	nd	DR1-DR8/12
T64	35	CEC	Ib2	16	DR7-DR11
T65	34	CEC	Ib1	+	DR4-DR8/12
T66		CEC		16	DR1-DR4
T67	42	CEC	Ib2	nd	DR8/12-DR9
T68	57	CEC	Ib1	16	DR4-DR13
T69	61	CEC	Ib2	16	DR7-DR7

^a Carcinoma epidermóide do colo uterino;

^b Não detectado;

^c Adenocarcinoma de colo uterino;

^d Detectado DNA de HPV na amplificação genérica, porém não foi identificado nenhum tipo específico dentre os testados.

A distribuição dos grupos de DRB1 nos casos e controles está apresentada na tabela 12. Uma associação negativa entre DR3 e desenvolvimento de CCU (OR=0,21, CI: 0,1-0,6) foi observada. Esta associação manteve-se constante quando foram analisados apenas casos positivos para HPV16, positivos para outros HPV e HPV negativos. Interessante que DRB1*0301, o alelo mais freqüente de DR3, apresentou um efeito protetor contra infecção por HPV em mulheres da coorte Ludwig-McGill, como descrito na seção 2.1, mas não contra persistência de infecção ou desenvolvimento de SIL. Ao contrário, a análise de risco de lesão mostrou que DRB1*0301 estava associado a um maior risco para desenvolvimento de SIL, independente do HPV (tabela 8). Uma proteção contra infecção por HPV poderia

explicar o efeito protetor de DR3 observado em pacientes com CCU. Entretanto, se as pacientes portadoras de DR3 que adquiriram a infecção por HPV tivessem um maior risco de desenvolver lesão, o efeito protetor contra o CCU seria atenuado. Considerando apenas as mulheres da coorte Ludwig-McGill que são positivas para HPV, verificamos que as portadoras de DR3 tinham um risco maior de desenvolver SIL (OR=2,14, CI: 1,0-4,7). A estratificação mostrou que o risco é maior entre mulheres com infecção transiente (OR=2,89, CI: 0,8-10,2), do que com infecção persistente (OR=1,87, CI: 0,6-5,7). Como discutido anteriormente, isto pode refletir que a grande maioria destas SIL não evoluirá para CCU. Uma definição mais precisa de persistência, baseada em seguimento mais longo, será útil para definirmos o papel de DRB1*0301 como fator de proteção ao desenvolvimento de CCU na população da cidade de São Paulo.

Não há estudos prévios descrevendo uma associação negativa entre DR3 e CCU. Por outro lado, em um estudo caso-controle, realizado na Suécia, observou-se uma associação positiva (OR=3,8) entre DRB1*0301-DQB1*0201 e CCU positivo para HPV18 (Allen *et al.*, 1996). Os autores, porém, obtiveram 10,6% de positividade para DR3 entre os controles, cuja origem e seleção não é descrita, e 31% entre os casos positivos para HPV18. Em outro estudo sueco, que não encontrou associação com DR3, a frequência de DR3 nos controles e casos com CCU foi de 30% e 34%, respectivamente (Sanjeevi *et al.*, 1996). Uma seleção inadequada de controles pode levar a associações espúrias ou a não detecção das associações verdadeiras, o que deve ser um problema bastante comum em estudos de associação com HLA. Talvez o modo mais eficiente para minimizar este problema seja a repetição do estudo em uma amostra independente, além da consistência das associações verificadas entre diferentes estudos realizados em populações distintas.

DR4 mostrou-se um fator de risco para CCU (OR=2,32, CI: 1,3-4,1) nesta população de pacientes em São Paulo (tabela 12). Porém este risco foi bem inferior para casos de CCU positivos para HPV16 (OR=1,95, CI: 0,9-4,0), do que para casos com outros HPV (OR=4,98, CI: 1,8-14,0). Estudos anteriores também encontraram associações positivas entre alelos de DR4, como DRB1*0401, *0403, *0405 e *0407 com o CCU (Apple *et al.*, 1994, Odunsi *et al.*, 1996). Em nosso estudo observamos uma maior frequência de DRB1*0401 e DRB1*0404 entre pacientes com SIL e lesão persistente (tabela 8). Além disto, um maior risco de positividade para HPV foi observado entre portadoras de DR4, apesar da maioria destas infecções ter sido transitória (tabela 2).

Portadores de DR8 ou DR12 também apresentaram um risco aumentado de desenvolver CCU (OR=1,73, CI: 1,0-3,1). Considerando apenas casos positivos para outros HPV, excluído HPV16, e casos negativos para HPV, a OR aumentou de 1,73 para 3,73 (CI: 1,3-10,6) e 6,97 (CI: 2,3-21,3), respectivamente. No entanto, é provável que a maioria dos 13 casos de CCU negativos para HPV sejam falso-negativos. Outras alternativas para detecção de HPV devem ser usadas nestes casos para podermos avaliar de modo mais preciso esta associação entre CCU e DR8/12. Esta associação é consistente com achados de risco para lesão, onde tanto alelos de DR8 (DRB1*0801 e DRB1*0807) quanto DR12, foram encontrados em uma maior proporção de mulheres com SIL e HSIL. Beskow *et al.* (2001), após analisar múltiplos esfregaços cervicais colhidos por um período de até 27 anos, observaram que DRB1*0801 foi mais prevalente entre as mulheres que desenvolveram carcinoma *in situ* do colo uterino, podendo ser um fator de risco ao CCU. As associações com o CCU observadas neste estudo são diferentes das observadas na população de João Pessoa. Porém, são mais consistentes com as

associações verificadas com infecção por HPV e risco de SIL no estudo de coorte Ludwig-McGill. Neste caso, seria possível que, de fato, algumas associações entre HLA e infecção por HPV ou doença fossem específicas para determinadas populações. Não apenas as frequências de alelos HLA envolvidos na associação, mas também o ambiente, podem diferir de modo importante entre as populações. Em uma doença causada por um vírus sexualmente transmissível, onde diversos fatores de risco comportamentais estão envolvidos, estas diferenças podem ser mais relevantes.

É importante ressaltar que as amostras de CCU analisadas neste estudo foram coletadas em um hospital diferente daquele de onde se obteve o grupo controle, apesar de ambos estarem localizados na cidade de São Paulo e serem públicos. No entanto, é bastante provável que casos e controles sejam comparáveis quanto a frequência de HLA, origem étnica e nível sócio-econômico, com base no perfil da população que frequenta os 2 hospitais. Outra limitação nesta análise é que somente grupos de DRB1 foram considerados, quando é evidente a diferença entre alelos do mesmo grupo sobre o risco de doença. A tipificação de alta resolução destas amostras está em andamento, além de novas amostras estarem sendo periodicamente coletadas.

Em conclusão, uma associação negativa entre DR3 e CCU foi observada, independente da tipificação de HPV. Por outro lado, um risco aumentado de CCU foi verificado entre portadoras de DR4 e DR8/12, sendo mais acentuada no grupo de tumores positivos para outros tipos de HPV, que não HPV16.

Tabela 12. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% para desenvolvimento de CCU, de acordo com os grupos alélicos de HLA-DRB1.

DRB1 aleles	Normal		CCU		CCU HPV16+		CCU outros HPV		CCU HPV negativo	
	n=490	n=66	OR (IC 95%) ^a	n=39	OR (IC 95%) ^a	n=14	OR (IC 95%) ^a	n=13	OR (IC 95%) ^a	
*01	104	13	0,91 (0,5-1,7)	11	1,46 (0,7-3,0)	0	nd	2	0,67 (0,0-2,8)	
*03	114	4	0,21 (0,1-0,6)	3	0,27 (0,1-0,9)	1	0,26 (0,0-1,5)	0	nd	
*04	82	21	2,32 (1,3-4,1)	11	1,95 (0,9-4,0)	7	4,98 (1,8-14,0)	3	1,49 (0,4-5,2)	
*07	115	16	1,04 (0,6-1,9)	12	1,45 (0,7-2,9)	1	0,25 (0,0-1,5)	3	0,98 (0,3-3,4)	
*08/12	82	17	1,73 (1,0-3,1)	4	0,57 (0,2-1,6)	6	3,73 (1,3-10,6)	7	6,97 (2,3-21,3)	
*09	21	3	1,06 (0,3-3,5)	2	1,21 (0,0-4,8)	0	nd	1	1,86 (0,0-11,8)	
*10	16	2	0,93 (0,0-3,7)	1	0,78 (0,0-4,8)	1	2,28 (0,0-14,6)	0	nd	
*11	111	12	0,76 (0,4-1,5)	8	0,88 (0,4-1,9)	3	0,93 (0,3-3,2)	1	0,28 (0,0-1,7)	
*13	121	15	0,90 (0,5-1,6)	8	0,79 (0,4-1,7)	4	1,22 (0,4-3,8)	3	0,91 (0,3-3,1)	
*14	24	2	0,61 (0,0-2,4)	2	1,05 (0,0-4,2)	0	nd	0	nd	
*15	95	11	0,83 (0,4-1,6)	7	0,91 (0,4-2,1)	1	0,32 (0,0-1,9)	3	1,25 (0,4-4,3)	
*16	35	3	0,62 (0,2-2,0)	2	0,70 (0,0-2,8)	1	1,00 (0,0-6,2)	0	nd	

3. Análise do polimorfismo da posição 86 da cadeia HLA-DR β

A análise de genótipos de HLA, combinando os 2 alelos de DRB1 e os 2 de DQB1, poderia ser bastante informativa na avaliação do risco de infecção por HPV, SIL e CCU. A expressão destes alelos é codominante, sendo que o nível de expressão de DRB1 é maior que DQB1. Um possível mecanismo de suscetibilidade associada ao polimorfismo de HLA envolve a seleção de determinantes antigênicos diferentes, o que está relacionado com o polimorfismo encontrado nestes genes. Neste caso, é plausível uma combinação de efeitos entre as moléculas HLA codificadas por diferentes alelos. Entretanto, o grande número de combinações genóticas entre os genes HLA inviabiliza este tipo de análise. Uma amostragem absurdamente grande seria necessária para que se conseguisse o poder estatístico requerido. Uma possibilidade é a tentativa de agrupar as moléculas HLA segundo características moleculares comum a elas. Por exemplo, uma análise da variabilidade em DRB1 mostra que as variantes de DRB1 codificadas por diferentes alelos são como um mosaico. A maior parte da variabilidade desta molécula está restrita a regiões denominadas *pockets*, e cada *pocket* possui um padrão de variabilidade mais restrito, como discutido anteriormente (figura 4; Sturniolo *et al.*, 1999). A grande variabilidade de HLA-DRB1 origina-se da combinação destes padrões mais restritos de cada *pocket*. Assim, o agrupamento destas moléculas segundo estas características pode fornecer informações interessantes e até mesmo mais consistentes em estudos de associação. Classificações baseadas nestes agrupamentos tem sido propostas (Chelvanayagam, 1997) e utilizadas no estudo de suscetibilidade às doenças (Djoulah *et al.*, 1999). Na seção seguinte é apresentada a análise do dimorfismo Gly/Val da posição 86 da cadeia β de HLA-DRB1 em amostras da coorte Ludwig-McGill, e sua relação com risco de infecção por HPV e desenvolvimento de SIL.

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Amostras

As amostras utilizadas nesta análise são provenientes do estudo de coorte Ludwig-McGill (Franco *et al.*, 1999), e previamente descritas na seção 2.1.1. A presença de valina ou glicina na posição 86 da cadeia HLA-DR β foi inferida a partir da sequência do códon que codifica para o aminoácido nesta posição. Este polimorfismo foi caracterizado em 590 amostras através de PCR seguida de hibridização com sondas oligonucleotídicas. Neste estudo foram analisados dados referentes a detecção do HPV obtidos durante o primeiro ano de seguimento das pacientes. Neste período foram realizadas 4 visitas para cada paciente, incluindo a admissão, seguida de 1 visita a cada 4 meses. Os resultado de citologia incluem dados citológicos das pacientes obtidos durante os 2 primeiros anos de seguimento.

3.1.2. Análise estatística

De acordo com o polimorfismo da posição 86 de HLA-DR β , as amostras foram agrupadas nos seguintes genótipos: 1) homozigoto glicina (GG), consistindo na categoria de referência para as análises; 2) heterozigoto glicina-valina (GV); e 3) homozigoto valina (VV). A magnitude da associação entre os genótipos com a infecção por HPV ou SIL foi estimada através da razão de chance ["odds ratio" (OR)] e seu respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%). As OR brutas e ajustadas foram obtidas através de regressão logística incondicional, utilizando-se o programa de estatística SPSS® versão 10.0 (SPSS, Chicago, IL). As análises para avaliação

de risco de infecção por HPV foram ajustadas para idade e grupo étnico. Na análise de risco de desenvolvimento SIL, também foi incluído no modelo multivariado a variável que define o grau de persistência da infecção para cada paciente. Para testar a tendência linear entre as proporções de cada genótipo foi utilizado o teste de qui-quadrado para tendência linear. Infecção persistente e persistente de longa duração foram definidas como pelo menos 2 e 3 visitas consecutivas positivas para o mesmo tipo de HPV, respectivamente. Infecções transientes foram definidas como um único resultado positivo ao longo do seguimento.

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1. Análise do polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR e risco de infecção por HPV

A positividade acumulada para infecção por HPV foi definida, neste estudo, como pelo menos um resultado positivo para a detecção do DNA de HPV, nas sucessivas amostras coletadas da mesma paciente no primeiro ano de seguimento. Neste caso, mesmo que a paciente possuísse mais de uma amostra positiva para HPV, considerou-se apenas o primeiro evento de positividade. Os resultados obtidos podem ser verificados na figura 5 e nas tabelas 13 a 16. O genótipo VV mostrou uma associação negativa com a positividade para HPV (OR=0,55, CI: 0,3-0,9), tanto para HPV de baixo (OR=0,47, CI: 0,2-0,9) quanto de alto risco oncogênico (OR=0,59, CI: 0,3-1,0), inclusive HPV16 (OR=0,35, CI: 0,1-0,9), quando comparado a indivíduos GG. O genótipo GV apresentou sempre um valor intermediário entre GG (referência) e VV. Estes resultados indicam que a presença de valina na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR exerce um efeito protetor sobre a positividade para HPV, e que este efeito é mais acentuado em homozigotos VV do que em heterozigotos GV. Neste caso, a combinação de alelos em DRB1 está sendo analisada, e o que observamos é um efeito médio decorrente da composição do P1. Não observamos um alelo em especial que pudesse explicar os resultados obtidos com o P1.

Figura 5. Distribuição em porcentagem dos genótipos Gly/Gly (GG), Gly/Val (GV) e Val/Val (VV), correspondentes à composição do *pocket* 1 da molécula HLA-DR, em amostras negativas para detecção de HPV (Neg), positivas para qualquer HPV (HPV), HPV não-oncogênicos (Nonc), HPV oncogênicos (Onc) e HPV16.

Tabela 13. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por qualquer HPV, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Positividade para qualquer HPV								
Genótipo	HPV -		HPV +		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=281	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	87	31,0	1,0		1,0	
GV	159	51,5	144	51,2	0,76	0,5-1,1	0,78	0,5-1,2
VV	77	24,9	50	17,8	0,55	0,3-0,9	0,54	0,3-0,9

p for trend = 0,012

^a Ajustado para idade e etnia.

Tabela 14. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por HPV não-oncogênico, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Positividade somente para HPV não-oncogênicos								
Genótipo	HPV -		HPV +		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=108	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	32	29,6	1,0		1,0	
GV	159	51,5	60	55,6	0,86	0,5-1,4	0,86	0,5-1,5
VV	77	24,9	16	14,8	0,47	0,2-0,9	0,49	0,3-1,0

p for trend = 0,036

^a Ajustado para idade e etnia

Tabela 15. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por HPV oncogênico, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Positividade para HPV oncogênicos							
	HPV -		HPV +		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=173	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	55	31,8	1,0		1,0	
GV	159	51,5	84	48,6	0,70	0,5-1,1	0,72	0,5-1,1
VV	77	24,9	34	19,7	0,59	0,3-1,0	0,57	0,3-1,0

p for trend = 0,044

^a Ajustado para idade e etnia

Tabela 16. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para positividade acumulada de infecção por HPV16, no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Positividade para HPV16							
	HPV -		HPV16		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=48	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	19	39,6	1,0		1,0	
GV	159	51,5	22	45,8	0,53	0,3-1,0	0,53	0,3-1,1
VV	77	24,9	7	14,6	0,35	0,1-0,9	0,34	0,1-0,9

p for trend = 0,016

^a Ajustado para idade e etnicidade

3.2.2. Análise do polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR e risco de infecção persistente por HPV

A persistência da infecção por HPV foi definida neste estudo como a detecção do DNA de HPV do mesmo tipo em duas ou mais visitas consecutivas de cada paciente. Um critério mais rigoroso foi utilizado para definir persistência de longa duração, onde pelo menos 3 resultados positivos para o mesmo tipo de HPV eram necessários. A positividade em apenas uma visita e resultados negativos subsequentes caracterizam a infecção transiente. A distribuição dos genótipos correspondentes à posição DR86 β está mostrada na figura 6. As tabelas 17 a 21 mostram os riscos relativos de infecções por HPV transientes e persistentes, quando comparadas a amostras negativas para detecção de DNA de HPV no primeiro ano de seguimento. Um menor risco de infecções transientes (OR=0,53, CI: 0,3-1,0) ou persistentes (OR=0,56, CI: 0,3-1,0) foi observado para indivíduos com genótipo VV na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR. Este efeito foi mais pronunciado para infecções persistentes de longa duração por HPV oncogênicos, com uma redução de 4,5 vezes no risco de tais infecções (OR=0,22, CI: 0,1-0,8). A mesma tendência de efeito protetor proporcional ao número de valinas presente no genótipo foi observado para infecções transientes e persistentes, exceto para as de longa duração.

A análise multivariada incluindo idade e etnia não alterou as estimativas de risco de positividade ou persistência em relação à análise bruta. Outro modelo multivariado incluindo as covariáveis idade da primeira relação sexual e número de parceiros sexuais, fatores de risco associados à infecção por HPV, também foi analisado. Estas covariáveis também não alteraram as estimativas de riscos dos

genótipos. Isto indica que os efeitos observados para o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR não são enviesados ou relacionados com estas covariáveis.

Estes resultados indicam que a composição da região da molécula HLA-DR, que interage com o primeiro aminoácido do peptídeo antigênico de HPV, é importante na evolução da história natural da infecção por estes vírus. A importância do dimorfismo da posição 86 da cadeia tem sido demonstrada na suscetibilidade a outras doenças, como a hepatite autoimune do tipo I (Goldberg *et al.*, 2001). O dimorfismo Gly/Val da posição 86 também parece ter um papel sobre a eficiência da resposta obtida com a imunização contra hepatite B (Lango-Warensjo *et al.*, 1998). Como o P1 é bastante restritivo, um possível mecanismo para tais associações seria a seleção diferenciada de epítomos, conforme a presença de Gly ou Val na posição 86 em HLA-DR β . A cadeia lateral do aminoácido valina, que é maior que a da glicina, impede a acomodação de aminoácidos aromáticos na posição 1 (Davenport *et al.*, 1995). Portanto, os epítomos selecionados para apresentação diferem dependendo da composição de P1.

A presença de valina em P1 teve um efeito protetor sobre a infecção por HPV, sem distinção entre HPV oncogênicos e não-oncogênicos, ou entre infecções persistentes ou transientes. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com DRB1*0301, e podem indicar uma participação da composição de P1 na regulação de algum mecanismo de resposta inata. Além disto, entre os muitos potenciais epítomos de HPV, não sabemos quais são realmente importantes para a resposta imune, e cuja seleção, a partir do P1, poderia ter um efeito na resposta contra o vírus.

Figura 6. Distribuição em porcentagem dos genótipos Gly/Gly (GG), Gly/Val (GV) e Val/Val (VV), correspondentes à composição do *pocket* 1 da molécula HLA-DR, em amostras negativas para detecção de HPV (Neg), infecções transitórias (1), infecções persistentes de curta (2) e longa (3) duração e infecções persistentes de longa duração por HPV oncogênico (3+/Onc).

Tabela 17. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções transitórias no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Infecções transitórias							
	HPV -		Transiência		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=140	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	45	32,1	1,0		1,0	
GV	159	51,5	70	50,0	0,71	0,5-1,1	0,75	0,5-1,2
VV	77	24,9	25	17,9	0,53	0,3-1,0	0,54	0,3-1,0

p for trend = 0,029

^a Ajustado para idade e etnicidade

Tabela 18. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Infecções persistentes							
	HPV -		Persistência		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=141	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	42	29,8	1,0		1,0	
GV	159	51,5	74	52,5	0,81	0,5-1,3	0,80	0,5-1,3
VV	77	24,9	25	24,5	0,56	0,3-1,0	0,54	0,3-1,0

p for trend = 0,058

^a Ajustado para idade e etnicidade

Tabela 19. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Infecções persistentes de longa duração							
	HPV -		Persistência		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=56	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	14	25,0	1,0		1,0	
GV	159	51,5	35	62,5	1,15	0,6-2,3	1,19	0,6-2,4
VV	77	24,9	7	12,5	0,47	0,2-1,2	0,46	0,2-1,2

p for trend = 0,165

^a Ajustado para idade e etnicidade

Tabela 20. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes por HPV oncogênicos no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Infecções persistentes por HPV oncogênicos							
	HPV -		Persistência		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=89	%	OR	95% CI	OR	95% CI
GG (ref.)	73	23,6	32	36,0	1,0		1,0	
GV	159	51,5	44	49,4	0,63	0,4-1,1	0,64	0,4-1,1
VV	77	24,9	13	14,6	0,39	0,2-0,8	0,36	0,2-0,8

p for trend = 0,007

^a Ajustado para idade e etnicidade

Tabela 21. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para infecções persistentes por HPV oncogênicos no primeiro ano de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	Infecções persistentes de longa duração por HPV oncogênicos							
	HPV -		Persistência		Bruta		Ajustada ^a	
	n=309	%	n=37	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	73	23,6	13	35,1	1,0		1,0	
GV	159	51,5	21	56,8	0,74	0,4-1,6	0,78	0,4-1,7
VV	77	24,9	3	8,1	0,22	0,1-0,8	0,21	0,1-0,9

p for trend = 0,019

^a Ajustado para idade e etnicidade

3.2.3. Análise do polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR e risco de desenvolvimento de neoplasia cervical

A análise da incidência cumulativa de SIL na coorte em relação ao polimorfismo da posição 86 revelou uma situação diferente (figura 7 e tabelas 22 e 23), da observada com infecção por HPV. Pacientes portadoras do genótipo VV tiveram um risco levemente superior de apresentar SIL (OR=1,40; IC 95%: 0,7-2,7) e HSIL (OR=1,69; IC 95%: 0,6-5,0), comparado a indivíduos GG. No entanto, estas estimativas são menos precisas, devido ao pequeno número amostral. Outro fato interessante é que no modelo multivariado incluindo o grau de persistência da infecção por HPV, as diferenças tornam-se mais proeminentes. O risco de desenvolver SIL, independente da persistência do HPV, é pelo menos 2 vezes maior para indivíduos VV (OR=2,20, CI: 1,0-4,7), comparado a genótipos GG. Para desenvolvimento de lesões de alto grau, o risco é quase 3 vezes maior (OR=2,80, CI: 0,8-9,7). A análise estratificada (tabelas 24 e 25) mostra que pacientes VV apresentam uma maior frequência de lesões, comparada aos outros genótipos, tanto em pacientes negativas para HPV, como naquelas com infecções transientes ou persistentes. Entretanto, a maior contribuição do genótipo VV para o risco de desenvolvimento de SIL (OR=4,43, CI: 1,1-17,4) e HSIL (OR=7,60, CI: 0,7-79,0) é no grupo com infecções transientes por HPV. Nas outras categorias, observa-se uma igualdade entre os genótipos em relação ao risco de SIL. Como mencionado anteriormente, o próprio mecanismo de desenvolvimento de SIL em infecções transientes pode ter certas particularidades. Apesar de erro classificatório também ser uma possibilidade neste grupo, espera-se que caso este erro seja aleatório entre os genótipos, uma diminuição dos efeitos em direção à nulidade seja observada

(Franco *et al.*, 1999). Neste caso, estaríamos estimando os riscos em uma escala menor do que seriam na realidade.

Figura 7. Distribuição em porcentagem dos genótipos Gly/Gly (GG), Gly/Val (GV) e Val/Val (VV), correspondentes à composição do *pocket* 1 da molécula HLA-DR, em amostras normais, positivas para SIL e HSIL. (A) Incluídas todas as amostras; (B) Incluídas somente amostras transitoriamente infectadas por HPV.

Tabela 22. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de SIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	SIL acumulada nas visitas 1 a 5							
	Normal		SIL		Bruta		Ajustada ^a	
	n=473	%	n=86	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	129	27,3	19	22,1	1,0		1,0	
GV	242	51,2	46	53,5	1,29	0,7-2,3	1,72	0,9-3,3
VV	102	21,6	21	24,4	1,40	0,7-2,7	2,20	1,0-4,7

p for trend = 0,324

^a Ajustado para idade, etnicidade e grau de persistência da infecção pelo HPV

Tabela 23. Razões de chance (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de HGSIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR.

Genótipo	HGSIL acumulada nas visitas 1 a 5							
	Normal		HGSIL		Bruta		Ajustada ^a	
	n=473	%	n=26	%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
GG (ref.)	129	27,3	6	23,1	1,0		1,0	
GV	242	51,2	12	46,2	1,01	0,4-2,9	1,78	0,6-5,6
VV	102	21,6	8	30,8	1,69	0,6-5,0	2,80	0,8-9,7

p for trend = 0,341

^a Ajustado para idade, etnicidade e grau de persistência da infecção pelo HPV

Tabela 24. Razões de chances (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de SIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR, estratificada pelo status da infecção por HPV

SIL acumulada nas visitas 1 a 5

		Normal		SIL		Bruta	
Genótipo		n=290	%	n=11	%	OR	IC 95%
HPV	GG (ref.)	67	23,1	2	18,2	1,0	
Negativo	GV	150	51,7	6	54,5	1,34	0,3-6,8
	VV	73	25,2	3	27,3	1,38	0,2-8,5

		Normal		SIL		Bruta	
Genótipo		n=108	%	n=23	%	OR	IC 95%
Infecções	GG (ref.)	38	35,2	4	17,4	1,0	
Transientes	GV	55	50,9	12	52,2	2,07	0,6-6,9
	VV	15	13,9	7	30,4	4,43	1,1-17,4

		Normal		SIL		Bruta	
Genótipo		n=75	%	n=52	%	OR	IC 95%
Infecções	GG (ref.)	24	32,0	13	25,0	1,0	
Persistentes	GV	37	49,3	28	53,8	1,40	0,6-3,2
	VV	14	18,7	11	21,2	1,45	0,5-4,1

Tabela 25. Razões de chances (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para prevalência de HGSIL no primeiro e segundo anos de seguimento, de acordo com o polimorfismo na posição 86 da cadeia β da molécula HLA-DR, estratificada pelo status da infecção por HPV

HGSIL acumulada nas visitas 1 a 5							
Genótipo		Normal		HGSIL		Bruta	
		n=290	%	n=2	%	OR	IC 95%
HPV Negativo	GG (ref.)	67	23,1	0	0	nd ^a	
	GV	150	51,7	1	50,0		
	VV	73	25,2	1	50,0		
Genótipo		Normal		HGSIL		Bruta	
		n=108	%	n=8	%	OR	IC 95%
Infecções	GG (ref.)	38	35,2	1	12,5	1,0	
Transientes	GV	55	50,9	4	50,0	2,76	0,3-25,7
	VV	15	13,9	3	37,5	7,60	0,7-79,0
Genótipo		Normal		HGSIL		Bruta	
		n=75	%	n=16	%	OR	IC 95%
Infecções	GG (ref.)	24	32,0	5	31,3	1,0	
Persistentes	GV	37	49,3	7	43,8	0,91	0,3-3,2
	VV	14	18,7	4	25,0	1,37	0,3-6,0

^a Não definido devido a presença de zero.

Em resumo, os resultados mostram que mulheres com genótipo VV teriam um menor risco de se tornarem positivas para HPV e terem infecção transiente ou persistente pelo vírus. Isto sugere uma proteção contra a aquisição da infecção por HPV, mas sem influenciar de modo significativo o curso desta infecção, ao menos no tempo de seguimento deste estudo. Entretanto, após o estabelecimento da infecção em pacientes VV, estas teriam maior risco de apresentar alterações neoplásicas, que não está relacionado com a persistência da infecção por HPV. Mulheres com genótipo VV e infecção transiente por HPV apresentaram um maior risco de desenvolver SIL ou HSIL, quando comparadas com mulheres homozigotas para glicina. Resultados semelhantes já haviam sido observados nesta amostra quando analisamos os alelos e haplótipos de HLA-DRB1 e DQB1. Entre as possíveis explicações para estes resultados, sugerimos a princípio duas: a) alelos com valina seriam mais eficientes na proteção contra infecção por HPV, porém em indivíduos infectados causariam uma reação inflamatória crônica mais exacerbada, que poderia induzir mais facilmente o aparecimento de lesões cervicais; ou b) alelos com valina teriam efeito protetor sobre o HPV, porém aumentariam a suscetibilidade a outras infecções que poderiam ser coadjuvantes ao HPV no desenvolvimento de lesões neoplásicas.

Apesar de não haver consenso na literatura, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que a infecção por *Chlamydia trachomatis* é um fator de risco para infecção por HPV oncogênico (Kjaer *et al.*, 1997) e carcinoma cervical (Anttila *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2002). Infelizmente, não possuímos informação sobre infecção por *Chlamydia trachomatis* nesta coorte. Em relação à resposta inflamatória em pacientes infectadas por HPV, um estudo recente indica que a presença de infiltrado inflamatório, quantificado pela contagem de células inflamatórias em lâmina de

esfregaço cervical, aumenta o risco de desenvolvimento de HSIL, apesar de não influir no risco de infecção por HPV (Castle *et al.*, 2001). Como discutido pelos autores, outras doenças sexualmente transmissíveis e causadoras de cervicite, como *Chlamydia trachomatis*, poderiam ser responsáveis pela associação entre cervicite e HSIL. Entretanto, a resposta inflamatória na infecção por HPV é reconhecidamente fraca, e um papel da cervicite como fator de risco deve ser restrita a um determinado grupo de pacientes.

Estes resultados indicam que é importante uma análise estendida de haplótipos e genótipos MHC, incluindo genes na região de classe I e III, envolvendo um grande número de amostras. Outros fatores também devem ser investigados, como coinfeções com outros agentes sexualmente transmissíveis, como por *Chlamydia trachomatis* e vírus do herpes genital. Estudos relacionando vários aspectos da resposta imune inata na infecção por HPV, até o momento desconhecidos, devem ser muito informativos na interpretação destes resultados.

Não foi avaliado neste estudo se o dimorfismo da posição 86 da cadeia HLA-DR β teria uma participação no risco de CCU. A partir da conclusão da tipificação de alta resolução de DRB1 esta análise será realizada. Além disto, a ampliação da amostra tipada no estudo de coorte Ludwig-McGill talvez permita que a variabilidade observada nos outros *pockets* seja analisada. Assim, poderíamos investigar o risco atribuído a um *pocket* controlando para o efeito dos demais. Outra possibilidade é a inclusão nesta análise de *pockets* de DQ β , e seu efeito conjunto com DR β .

De um modo geral, todas as análises efetuadas, desde a infecção por HPV até o CCU, mostra que se o polimorfismo de HLA parece ter um papel limitado na suscetibilidade genética a estas patologias. Muitas vezes não há consistência entre os resultados quando se investiga diversas fases da história natural destas

patologias. No entanto, os resultados obtidos em modelos animais indicam que o polimorfismo destes genes são importantes no controle da resposta imune aos papilomavírus. Isto pode indicar que a variabilidade genética, de comportamento e ambiental devam ser importantes moduladores de fatores de risco para infecção por HPV e CCU. E talvez estes fatores sejam impossíveis de serem controlados de modo adequado em estudos epidemiológicos em populações humanas, ao contrário de estudos em animais. Por outro lado, o fato de observarmos algumas associações consistentes, em meio a tantos outros fatores, é indicativo da participação destes genes na história natural das infecções por HPV e do CCU. Entretanto, sem dúvida muitas associações observadas não devem ter relevância, podendo ser achados isolados e devido ao acaso. Um grande desafio é identificarmos quais associações são realmente importantes e como utilizar esta informação.

Uma compreensão dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade genética a estas doenças, relacionada ao polimorfismo em genes HLA, é bastante interessante. A análise da eficácia das vacinas contra HPV, testadas atualmente em diferentes populações, poderia utilizar tais informações. Inclusive as próprias vacinas podem ajudar a esclarecer qual a importância dos genes HLA na resposta imune contra o HPV. As vacinas, por utilizarem um processo padronizado de administração dos antígenos, em parte eliminam a variabilidade encontrada no processo natural da infecção. Sem dúvida novas abordagens são necessárias nestas investigações. Algumas delas, como a definição do papel das células T CD4 nestes processos e a identificação de epítomos de HPV restritos por moléculas HLA de classe II vem sendo investigadas por vários grupos de pesquisa.

4. Respostas linfoproliferativas contra peptídeos das proteínas E6 e E7 de HPV16

A apresentação de peptídeos antigênicos às células T CD4⁺ é realizada pelas moléculas HLA de classe II, que são constitutivamente expressas em células apresentadoras de antígenos, como linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. Como sugerido nas seções prévias deste estudo, o polimorfismo de genes HLA de classe II parece estar associado com o risco de infecção por HPV ou CCU. Apesar dos mecanismos destas associações serem desconhecidos, é provável que em parte seja explicado pela seleção de epítomos e ativação de células T CD4⁺, o que está relacionado com a variabilidade das moléculas HLA de classe II. Até o momento, poucos epítomos derivados de tumores humanos e reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ foram identificados. No caso de tumores associados ao HPV, as proteínas E6 e E7 do vírus são expressas nas células tumorais e portanto, potenciais antígenos tumorais. Assim, a detecção de linfócitos T CD4⁺ nestas pacientes, específicos para epítomos de E6 ou E7, é um primeiro passo na compreensão da regulação da resposta imune no CCU. Nesta seção estão apresentados os resultados de ensaios de respostas linfoproliferativas em pacientes com CCU e a investigação de epítomos de E6 e E7 de HPV16.

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Amostras

A origem e coleta das amostras obtidas a partir de pacientes com CCU foram descritas na seção 2.3.1.1. As amostras tumorais foram identificadas neste estudo pela letra T seguida de um número de identificação (Ex.: amostra T66). As respostas linfoproliferativas foram analisadas nas seguintes amostras de pacientes com CCU: T24, T66, T67, T68 e T69. Também foi incluído o resultado obtido a partir de uma amostra de paciente doador normal, o qual foi identificado como amostra D1.

4.1.2. Separação de células mononucleares de sangue periférico

Antes do início do ato cirúrgico eram coletados de 35 a 40ml de sangue venoso periférico das pacientes, em frasco contendo EDTA. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Coligan *et al.*, 1991). Os 35-40ml de sangue eram igualmente distribuídos em 4 tubos cônicos de 50ml. Aos 10ml de sangue em cada tubo adicionava-se 20ml de PBS, com o objetivo de reduzir a agregação de hemácias e linfócitos. Ao sangue diluído era adicionado 10ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech), o qual era lentamente colocado com pipeta por baixo do sangue, tomando-se cuidado para não desfazer a interface entre o Ficoll-Paque e o sangue. Após adição da solução de Ficoll-Paque, as amostras eram centrifugadas a 200g durante 20 minutos, a 25°C. Após a centrifugação, eram retirados de 20 a 25ml do plasma. Esta etapa visava eliminar a maior parte das plaquetas. A amostra era

submetida a nova centrifugação a 460g durante mais 20 minutos, a 25°C. Após esta etapa era coletada a camada de células mononucleares localizadas entre o Ficoll-Paque e o restante de plasma.

Após a coleta das PBMC, estas eram lavadas em PBS-EDTA 2mM (aproximadamente 20ml) e centrifugadas a 300g por 10 minutos a 4°C. Este passo era repetido mais 2 ou 3 vezes. Após as lavagens as células eram ressuspensas em 10ml de RPMI 1640, contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) e a viabilidade celular determinada através de coloração com azul de tripan. Caso as PBMC obtidas não fossem ser imediatamente cultivadas na presença de peptídeos, elas eram criopreservadas em nitrogênio líquido, em meio RPMI 1640, suplementado com 50% de Soro Humano AB⁺ e 10% de DMSO.

4.1.3. Seqüência de peptídeos

Os peptídeos sintéticos (Neosystems, França) utilizados nos ensaios de linfoproliferação estão listados na tabela 26. Todos os peptídeos foram inicialmente diluídos em DMSO, a uma concentração de 10mM, e posteriormente diluídos em água Mili-Q[®], para uma concentração final de 1mM de peptídeo. A denominação dos peptídeos foi definida como P ou V, para seqüência da proteína do protótipo ou de uma variante, respectivamente; seguida do número 16, referente ao HPV 16, e do nome da proteína viral correspondente (E6, E7 ou L1). Após a barra, os números separados por um traço indicam as posições inicial e final dos aminoácidos do peptídeo correspondentes na proteína viral. As distribuições dos peptídeos ao longo das proteínas E6 e E7 de HPV 16 estão esquematicamente representadas nas

figura 8 e 9. Os peptídeos foram agrupados em conjuntos para estimulação de linfócitos nos ensaios de linfoproliferação, conforme demonstrado na tabela 27.

Tabela 26. Seqüência dos peptídeos utilizados neste estudo e a posição dos resíduos de aminoácidos na estrutura primária da proteína.

Identificação	Denominação	Seqüência
P1	P16E7/1-20	MHGDTPTLHEYMLDLQPETT
P2	P16E7/7-26	TLHEYMLDLQPETTDLYCYE
P3	P16E7/11-32	YMLDLQPETTDLYCYEQLNDSS
V3	V16E7/11-29	YMLDLQPESTDLYCYEQLN
P4	P16E7/19-38	TTDLYCYEQLNDSSEEEDEI
V4.1	Va16E7/19-38	TTDLYCYEQFNDSSSEEEDEI
V4.2	Vb16E7/19-38	TTDLYCYEQLSDSSEEEDEI
P5	P16E7/25-44	YEQLNDSSEEEDEIDGPAGQ
P6	P16E7/31-50	SSEEEDEIDGPAGQAEPDRA
P7	P16E7/37-56	EIDGPAGQAEPDRAHYNIVT
P8	P16E7/43-62	GQAEPDRAHYNIVTFCKCD
P9	P16E7/49-68	RAHYNIVTFCKCDSTLRLC
P10	P16E7/55-74	VTFCKCDSTLRLCVQSTHV
P11	P16E7/61-80	CDSTLRLCVQSTHVDIRTLE
P12	P16E7/67-86	LCVQSTHVDIRTLEDLLMGT
V12	V16E7/67-86	LCVQSTHVDICTLEDLLMGT
P13	P16E7/73-92	HVDIRTLEDLLMGTLGIVCP
P14	P16E7/79-98	LEDLLMGTLGIVCPICSQKP
P18	P16E6/1-20	MHQKRTAMFQDPQERPRKLP
P19	P16E6/11-30	DPQERPRKLPQLCTELQTTI
P20	P16E6/20-40	PQLCTELQTTIHDIILECVYC
P21	P16E6/31-50	HDIILECVYCKQQLLRREYV
P22	P16E6/41-60	KQQLLRREYVDFAFRDLICV
P23	P16E6/51-71	DFAFRDLICIVYRDGNPYAVCD
V23	V16E6/51-71	DFAFRDLICIVYKNGNPYAVCD
P24	P16E6/61-80	YRDGNPYAVCDKCLKFYSKI
P25	P16E6/71-90	DKCLKFYSKISEYRHYCYSL
P26	P16E6/81-100	SEYRHYCYSLYGTTLEQQYN
P27	P16E6/91-110	YGTTLEQQYNKPLCDLLIRC
P28	P16E6/101-120	KPLCDLLIRCINCQKPLCPE
P29	P16E6/111-130	INCQKPLCPEEKQRHLDKKQ
V29	V16E6/111-130	INCQKPLCPEDKQRHLDKKQ
P30	P16E6/121-140	EKQRHLDKKQRFHNIRGRWT
P31	P16E6/131-150	RFHNIRGRWTGRCMSSCRSS
P32	P16E6/136-154	RGRWTGRCMSSCRSSRTRR
V32	V16E6/136-154	RGRWTGRCMCCCRSSRTRR
P33	P16E6/139-158	WTGRCMSSCRSSRTRRETQL

Figura 8. Sequência da proteína E6 de HPV16 e superposição dos peptídeos usados no estudo.

Figura 9. Sequência da proteína E7 de HPV16 e superposição dos peptídeos usados no estudo.

Tabela 27. Conjuntos de peptídeos usados nos ensaios de linfoproliferação.

Proteína	Conjunto	Peptídeos	Posição
E7	E7-1	P1, P2, P3, P4 e P5	aa 1-44
	E7-2	P6, P7, P8, P9 e P10	aa 31-74
	E7-3	P11, P12, P13 e P14	aa 61-98
	E7-4	V3, V4.1, V4.2 e V12	
L1	L1	P15, V15, P16, V16, P17 e V17	
E6	E6-1	P18, P19, P20, P21 e P22	aa 1-60
	E6-2	P23, P24, P25, P26 e P27	aa 51-110
	E6-3	P28, P29, P30, P31 e P32	aa 101-154
	E6-4	P33, V23, V29 e V32	aa 139-158

4.1.4. Ensaios in vitro de proliferação de PBMC na presença de peptídeos antigênicos de HPV16

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram cultivadas em placas de 24 cavidades por 14 dias, na concentração de $1,5$ a $2,0 \times 10^6$ PBMC/poço em 1ml de meio completo [RPMI 1640 suplementado com Soro Humano AB⁺ 5% (BioWhittaker), HEPES 10mM, L-glutamina 2mM, gentamicina, penicilina 50U/ml e estreptomicina 50µg/ml (Gibco BRL)]. Eram adicionados 15 a 25µM de cada conjunto de peptídeo na cavidade específica. Após 72 horas eram acrescentadas 20 unidades (IU)/ml de interleucina-2 (IL-2) às PBMC. Após 7 dias, as PBMC em cultivo eram restimuladas com 5×10^5 PBMC autólogas e irradiadas com 2500 rads, juntamente com 15 a 25µM de cada conjunto de peptídeo e 20 IU/ml de IL-2. Após 72 horas eram adicionadas mais 20 IU/ml de IL-2 às PBMC. Após 14 dias, as PBMC eram coletadas e extensivamente lavadas com PBS. As PBMC estimuladas com os diferentes conjuntos de peptídeos eram manipuladas separadamente. Em seguida, 3

a 5×10^4 PBMC eram utilizadas para ensaios de linfoproliferação de 3 dias em placas de 96 cavidades, em um volume de 200 μ l de meio completo. Estas células eram estimuladas com um número semelhante de PBMC autólogas, irradiadas com 2500 rads, e 15 μ M de cada peptídeo (tabela 26). Cada ensaio com um peptídeo foi realizado em duplicata. Os controles negativos consistiram de uma mistura de PBMC estimuladas com os diferentes conjuntos de peptídeos, além das PBMC irradiadas, porém na ausência de peptídeo. Nos controles negativos eram utilizadas as mesmas quantidades de células presentes nos ensaios com peptídeos. Como controles positivos de proliferação, 3 a 5×10^4 PBMC eram cultivados em duplicata na presença de 2 μ l de fitohemaglutinina (Gibco BRL). Após 54h de cultura, era acrescentado em cada cavidade 1 μ Ci de timidina tritiada [3 H], e após 18 horas as células eram colhidas com auxílio de um coletor de células (Cell Harvester, Skatron), lisadas com água e transferidas para um filtro FilterMAT (Skatron, Noruega). A taxa de proliferação era estimada através da quantidade de incorporação de timidina tritiada, medida em um cintilador como contagem de pulsos por minuto (c.p.m.) (Coligan *et al.*, 1991). Para cada cultura era calculado um índice de estimulação (SI), dado pela fórmula:

$$SI = \text{média da c.p.m. da cultura com o antígeno} / \text{média da c.p.m. da cultura sem o antígeno}$$

sendo que a proliferação era considerada positiva apenas se a média de SI fosse maior que 2. A variabilidade entre duplicatas do mesmo ensaio foi estimada através do desvio padrão.

4.2. Resultados e Discussão

A utilização de ensaios de linfoproliferação de longa duração mostrou-se mais adequado para estas amostras. Houve uma considerável diminuição na variabilidade, que inviabilizava as análises de resultados obtidos a partir de ensaios de proliferação de 7 dias, além de um aumento da sensibilidade do ensaio. Isto está de acordo com resultados descritos por outros autores (Kadish *et al.*, 1994), e reflete provavelmente o baixo número de células de memória específicas contra epítomos de HPV. Um aspecto importante dos ensaios de linfoproliferação, usando-se PBMC como células apresentadoras de antígenos, é a indução da proliferação de células de memória, mas não de linfócitos "naive" (van der Burg *et al.*, 2001).

Epítomos de HPV restritos por MHC de classe II vêm sendo efetivamente mapeados nos últimos anos. A proteína mais estudada é E7 de HPV 16, seguida de E6 e L1. O interesse no mapeamento de epítomos de E6 e E7 deve-se ao fato destas proteínas serem permanentemente expressas em tecidos tumorais oriundos de infecções por HPV (Zur Hausen, 1996). Apesar de se conhecer as principais regiões imunogênicas destas proteínas, pouco se sabe sobre a seleção de epítomos dominantes dependendo do HLA do indivíduo e qual papel isto teria na eliminação do HPV e desenvolvimento de doença. Em estratégias de vacinação, principalmente as baseadas no uso de peptídeos, este tipo de informação é bastante relevante.

A resposta linfoproliferativa contra peptídeos correspondentes a regiões da proteína E7 e E6 de HPV16 foi bastante diversificada entre as nossas amostras. A linfoproliferação observada com a amostra D1 em relação à região N-terminal de E7 apresentou uma variabilidade elevada, sendo o resultado mais consistente observado com o peptídeo p1-20 (figura 10). Este peptídeo tem uma alta afinidade

por DR3 (van der Burg *et al.*, 2001), que é uma das especificidades HLA-DR de D1 (DRB1*0301/*1101). Um provável epítopo pode ser mapeado em uma sequência através do uso do *software* TEPITOPE (Sturniolo *et al.*, 1999), que usa algoritmos para calcular a probabilidade de se encontrar um epítopo em uma sequência de aminoácidos. Apesar de haver uma boa correlação entre um epítopo predito teoricamente e a afinidade do epítopo pela molécula HLA de classe II, medida *in vitro*, nem sempre os resultados são satisfatórios. Outra restrição é que estes algoritmos são mais eficientes na predição de epítopos restritos por HLA-DR, porém não aplicáveis para HLA-DQ. Sua utilidade aqui é como uma ferramenta para auxiliar na localização de epítopos e interpretação de resultados. A análise pelo algoritmo do TEPITOPE do peptídeo p1-20 está demonstrada na figura 11.

O peptídeo compreendendo os aminoácidos 19 a 38 de E7 induziu proliferação na amostra D1 (figura 10) e T67 (figura 12), sendo que a primeira respondeu contra a sequência da proteína protótipo e a segunda contra uma sequência variante. No entanto, a variabilidade da resposta em D1 foi muito grande, não permitindo afirmar que o peptídeo p19-38 é imunogênico nesta amostra. A amostra T67, tipada como DRB1*08/DRB1*09, apresentou uma resposta somente ao peptídeo vb19-38 na região N-terminal de E7, que difere do protótipo na posição 29 (Asn → Ser). A análise deste peptídeo pelo TEPITOPE mostra que o peptídeo p19-38 contém um provável epítopo entre os resíduos 22 e 31 (LYCYEQLNDS), restrito por DR4 e DR8 (figura 13). O resíduo Asn estaria ancorado no *pocket* 7 e 8, respectivamente para DR4 e DR8. Portanto, a alteração deste resíduo poderia modificar a especificidade da resposta linfoproliferativa. Estudos anteriores demonstraram que a região N-terminal de E7 parece ser menos imunogênica que as regiões central e C-terminal (Kadish *et al.*, 1994, Luxton *et al.*, 1996; van der Burg *et al.*, 2001).

Linfoproliferação / HPV16 E7

Figura 10. Proliferação de PBMC da amostra D1 na presença de diferentes peptídeos de E7 de HPV correspondendo às seqüências protótipo (p) e variante (v) da mesma posição. Os resultados nas barras representam o SI médio $\pm$ desvio padrão.

Figura 11. Análise do peptídeo de p1-20 da proteína E7 de HPV 16 pelo software TEPITOPE.

O potencial epítipo é mostrado em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no pocket 1 mostrado em vermelho.

As respostas linfoproliferativas de D1 (figura 10) e T67 (figura 12) contra os peptídeos p25-44 e p49-68, respectivamente, demonstram a presença de epítipos na região central de E7. Luxton *et al.* (1996) verificaram que regiões compreendidas entre os resíduos 25 e 49, além dos resíduos 45 a 64, estimulavam a proliferação de células T. Do mesmo modo, Nakagawa *et al.* (1996) observaram respostas linfoproliferativas contra a região de E7 entre os resíduos 44 e 57. Ensaios *in vivo* de DTH contra peptídeos de E7 mostraram que as respostas foram preferencialmente direcionadas contra a região compreendida entre os aminoácidos 50 e 70 (Höpfl *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram obtidos por van der Burg *et al.* (2001), através de ensaios *in vitro* de linfoproliferação, onde a região de E7 entre os aminoácidos 41 e 72 foi a mais imunogênica. A figura 14 mostra a análise pelo TEPITOPE da região de E7 entre os resíduos 40 e 80.

Linfoproliferação / HPV16 E7

Figura 12. Proliferação de PBMC da amostra T67 na presença de diferentes peptídeos de E7 de HPV correspondendo às seqüências protótipo (p) e variante (v) da mesma posição. Os resultados nas barras representam o SI médio $\pm$ desvio padrão.

Figura 13. Análise do peptídeo de p19-38 da proteína E7 de HPV 16 pelo software TEPITOPE.

O potencial epítipo é mostrado em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no pocket 1 mostrado em vermelho.

Figura 14. Análise da região compreendida entre os resíduos 40 (G) e 80 (E) da proteína E7 de HPV 16 pelo software TEPITOPE.

Os potenciais epítipos são mostrados em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no pocket 1 mostrado em vermelho. O peptídeo p49-68 está sublinhado.

A região de E7 compreendida entre os resíduos 25 e 44 não apresenta nenhum potencial epítipo para as principais especificidades de HLA-DR. Isto pode ser indicativo que um potencial epítipo nesta região poderia ser restrito por HLA-DQ ou DP. van der Burg *et al.* (2001) mapearam um epítipo restrito por HLA-DQ2 próximo a esta região, entre os resíduos 35 e 50. No entanto, não observamos linfoproliferação contra o peptídeo p31-50, e sim p25-44, apesar da amostra D1 ser DRB1*03-DQB1*02.

Nenhuma amostra apresentou uma forte linfoproliferação contra peptídeos da região C-terminal de E7, apesar da presença de potenciais epítipos nesta região (figura 15). Luxton *et al.* (1996) observaram uma alta proporção de linfoproliferação, em mulheres sadias, contra um epítipo localizado entre os resíduos 70 e 84 da proteína E7 de HPV 16. Nas amostras T24, T66, T67 e T69 não detectamos resposta linfoproliferativa contra peptídeos de E7.

Figura 15. Análise da região compreendida entre os resíduos 67 (L) e 98 (P) da proteína E7 de HPV 16 pelo software TEPITOPE.

Os potenciais epítipos são mostrados em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no pocket 1 mostrado em vermelho. O peptídeo p67-86 está sublinhado.

A análise das respostas linfoproliferativas contra peptídeos de E6 de HPV16 revelou a presença de epítomos nas regiões N-terminal, central e C-terminal de E6. O peptídeo p131-150 induziu forte linfoproliferação nas amostras D1 e T66 (figuras 16 e 17, respectivamente). Na amostra D1 esta foi a única resposta observada. A amostra T66, que apresenta os alelos DRB1*01/DRB1*04, também apresentou uma linfoproliferação contra p121-140, apesar de menos intensa que a observada com p131-140. Como estes peptídeos apresentam uma superposição de 10 resíduos, é provável que apenas um epítomo esteja localizado nesta região, totalmente representado por p131-150 e parcialmente por p121-140 (figura 18). Tsukui *et al.* (1996) observaram que a região C-terminal de E6 de HPV16 era a mais imunogênica da proteína. Kadish *et al.* (1997) relataram que 40% das pacientes reconheceram um epítomo entre os resíduos 121 e 150 da proteína E6.

As amostras T67 e T69 não reconheceram p131-150 como antigênico, cujas respostas foram direcionadas contra os peptídeos p31-50, p71-90 e p81-100 (figuras 19 e 20). Há menos estudos de mapeamento de epítomos da proteína E6, o que limita a comparação de nossos resultados com outros grupos. Strang *et al.* (1990) descreveram um peptídeo de E6 (aa 42 a 57) capaz de induzir linfoproliferação em pacientes com lesão cervical. Neste estudo observamos proliferação com o peptídeo p31-50 nas amostras T67 e T69 (figuras 19 e 20), indicando a presença de um epítomo nesta região. É provável que este seja um epítomo de classe II, já que as PBMC do ensaio com a amostra T69 eram depletadas de células CD8⁺. Entretanto, as respostas contra o peptídeo p31-50 foram fracas, com SI próximo a 2. Em outro estudo, Nakagawa *et al.* (1996) relataram a presença de linfoproliferação contra a região de E6 entre os resíduos 24 e 45 em 26% de mulheres sexualmente ativas e sem doença cervical.

Linfoproliferação / HPV16 E6

Figura 16. Proliferação de PBMC da amostra D1 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV correspondendo às seqüências protótipo (p) e variante (v) da mesma posição. Os resultados nas barras representam o SI médio $\pm$ desvio padrão.

Linfoproliferação / HPV16 E6

Figura 17. Proliferação de PBMC da amostra T66 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV correspondendo às seqüências protótipo (p) e variante (v) da mesma posição. Os resultados nas barras representam o SI médio $\pm$ desvio padrão.

Figura 18. Análise do peptídeo p131-150 da proteína E6 de HPV 16 pelo software TEPITOPE.

Os potenciais epítomos são mostrados em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no pocket 1 mostrado em vermelho.

A análise da região compreendida entre os resíduos 31 (H) e 60 (V) da proteína E6 revelou a presença de potenciais epítomos entre os resíduos 31 a 50 e 42 a 57, porém com diferentes afinidades para especificidades distintas de HLA-DR (figura 21). Em relação à linfoproliferação contra o peptídeo p71-90, observado na amostra T67 (figura 19), e contra o peptídeo p81-100, observado na amostra T69 (figura 20), estas não foram freqüentemente encontradas em outros estudos. Kadish *et al.* (1997) observaram resposta contra a região de E6 compreendida entre os resíduos 61 e 100 em apenas 15% das pacientes. No entanto, esta região possui um potencial epítopo, principalmente para DR8, que é um dos alelos de T67, e DR15, conforme análise no TEPITOPE (Figura 22). No caso da amostra T69, tipada como homozigota para DRB1*07, nenhum potencial epítopo restrito por DRB1*07 foi identificado pelo TEPITOPE nas regiões que induziram linfoproliferação nesta amostra. Não foram detectadas respostas linfoproliferativas contra peptídeos de E6 de HPV16 nas amostras T24 e T68.

Linfoproliferação / HPV16 E6

Figura 19. Proliferação de PBMC da amostra T67 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV correspondendo às seqüências protótipo (p) e variante (v) da mesma posição. Os resultados nas barras representam o SI médio $\pm$ desvio padrão.

Linfoproliferação / HPV16 E6

Figura 20. Proliferação de linfócitos T CD4⁺ da amostra T69 na presença de diferentes peptídeos de E6 de HPV correspondendo às seqüências protótipo (p) e variante (v) da mesma posição. Os resultados nas barras representam o SI médio ± desvio padrão.

Figura 21. Análise da região compreendida entre os resíduos 31 (H) e 60 (V) da proteína E6 de HPV 16 pelo *software* TEPITOPE.

Os potenciais epítomos são mostrados em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no *pocket 1* mostrado em vermelho. O peptídeo p31-50 está sublinhado.

Figura 22. Análise da região compreendida entre os resíduos 71 (D) e 100 (N) da proteína E6 de HPV 16 pelo *software* TEPITOPE.

Os potenciais epítomos são mostrados em azul, sendo o primeiro resíduo de ancoragem no *pocket 1* mostrado em vermelho.

Estes resultados mostram a viabilidade da metodologia empregada na identificação de epítomos de E6 e E7 de HPV 16. Muitos dos peptídeos que induziram linfoproliferação localizam-se em regiões previamente descritas como imunogênicas. No entanto, apesar de poucas amostras analisadas, podemos observar a inexistência de um peptídeo que induza resposta em todos os indivíduos analisados. A variabilidade de resposta é esperada e pode ser interpretada com base na variabilidade existente no sistema HLA. As respostas linfoproliferativas observadas entre as 5 amostras testadas foi mais freqüente para E6 (3/5) do que E7 (1/5). Uma possibilidade é que os ensaios realizados não foram sensíveis o suficiente para detectar respostas contra E7 nestas pacientes. O baixo número de células de memória contra E7, ou mesmo a inexistência destas células, poderia explicar tais resultados. Também deve-se considerar que a amostra T24 era positiva para HPV33, e os peptídeos correspondem à seqüência de HPV16. Outros fatores, como um peptídeo de baixa qualidade, também poderia influenciar nos resultados. No entanto, todos os peptídeos tiveram o mesmo controle de qualidade na síntese e foram cuidadosamente manipulados.

Respostas imunológicas contra E7, detectadas *in vivo* como reações tipo DTH, mostraram uma forte correlação com a regressão de SIL (Höpfl, 2001). Neste caso, a ausência de respostas linfoproliferativas contra E7, em pacientes com CCU, não seria surpreendente. Porém, outros estudos detectaram respostas linfoproliferativas contra peptídeos de E7 em 0 a 60% das pacientes com CCU (Kadish *et al.*, 1994; Luxton *et al.*, 1996; Kadish *et al.*, 1997). É evidente a variação observada entre diferentes amostragens e metodologias. Além disto, estudos *in vitro* de linfoproliferação contra epítomos de HPV não conseguem estabelecer uma relação

entre a detecção de resposta, e a evolução ou prognóstico da infecção viral, SIL ou CCU.

Ao contrário de E7, 3 das 5 amostras de pacientes com CCU apresentaram respostas linfoproliferativas contra E6 de HPV16, sendo 2 delas tipadas para HPV16. O papel de linfócitos CD4⁺ de memória contra E6 é pouco conhecido. Por outro lado, a detecção de resposta citotóxica contra E6 está relacionada com a eliminação da infecção por HPV (Nakagawa *et al.*, 2000). Interessante que este efeito não foi observado com E7. Apesar de poucos dados, é possível que uma resposta adequada contra o HPV dependa de um equilíbrio entre respostas de células T CD4⁺ contra E7 e de CD8⁺ contra E6. Entretanto, devemos considerar as respostas a outras proteínas virais, cujos estudos de imunogenicidade são escassos ou mesmo inexistentes.

Outro fator que poderia ser importante na regulação da resposta imune contra o HPV e SIL seria a presença de células com atividade supressora, como linfócitos CD25⁺CD4⁺. Estas células, inicialmente caracterizadas em camundongos (Sakaguchi *et al.*, 1995) e posteriormente em humanos (Dieckmann *et al.*, 2001), apresentam uma importante atividade imunossupressora. Estas células são responsáveis pela manutenção da tolerância a autoantígenos, inibindo reações autoimunes. Por outro lado, uma resposta antitumoral é induzida em camundongos a partir da remoção de células CD25⁺CD4⁺, especialmente mediada por linfócitos CD8⁺ e células similares a NK (Shimizu *et al.*, 1999). Em pacientes com câncer de pulmão, Woo *et al.*, (2002) relatam a presença de grandes quantidades destas células nos tumores, que poderiam inibir a resposta imune e permitir a progressão do tumor. Uma observação importante é a expressão constitutiva de CTLA-4 em células CD25⁺CD4⁺ (Takahashi *et al.*, 2000). A proteína CTLA-4 é expressa em

linfócitos T ativados, e interage com CD80 ou CD86 nas APC, inibindo a resposta imune mediada por células (Thompson e Allison, 1997). Foi observado que a remoção de células CD25⁺CD4⁺, além do bloqueio de CTLA-4, apresenta um efeito sinérgico na indução de resposta imune e rejeição de tumor em camundongo (Sutmuller *et al.*, 2001). Apesar de não haver relatos do papel de células CD25⁺CD4⁺ em pacientes infectadas por HPV e que desenvolvem SIL, seria importante verificar a regulação destas células nestes casos.

O desenvolvimento de vacinas contra HPV é uma forma promissora de combater a infecção viral e diminuir a incidência do carcinoma do colo uterino. Um dos aspectos fundamentais no planejamento racional destas vacinas, sejam profiláticas ou terapêuticas, é o conhecimento da regulação da resposta imune nas infecções por HPV e no câncer. Vários fatores participam da regulação desta resposta, sejam fatores virais, do hospedeiro ou ambientais. A compreensão de alguns destes mecanismos será importante para o desenvolvimento de imunoterapias contra o HPV e das lesões neoplásicas associadas ao vírus.

5. Referências Bibliográficas

- AHDIEH, L. ; MUÑOZ, A. ; VLAHOV, D. ; TRIMBLE, C. L. ; TIMPSON, L. A. ; SHAH, K. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 151, n. 12, p. 1148-1157, 2000.
- ALLEN, M. ; KALANTARI, M. ; YLITALO, N. ; PETTERSSON, B. ; HAGMAR, B. ; SCHEIBENPFLUG, L. ; JOHANSSON, B. ; PETTERSON, U. ; GYLLENSTEN, U. 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**, v. 48, p. 32-37, 1996.
- ALLEN, R. D. Polymorphism of the human TNF- α promoter – random variation or functional diversity? **Mol. Immunol.**, v. 36, p. 1017-1027, 1999.
- ANTTILA, T. ; SAIKKU, P. ; KOSKELA, P. ; BLOIGU, A. ; DILLNER, J. ; IKÄHEIMO, I. ; JELLUM, E. ; LEHTINEN, M. ; LENNER, P. ; HAKULINEN, T. ; NARVANEN, A. ; PUKKALA, E. ; THORESEN, S. ; YOUNGMAN, L. ; PAAVONEN, J. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. **JAMA**, v. 285, p. 47-51, 2001.
- APPLE, R. J. ; ERLICH, H. A. ; KLITZ, W. ; MANOS, M. M. ; BECKER, T. M. ; WHEELER, C. M. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nature Genet.**, v. 6, p. 157-162, 1994.
- APPLE, R. J. ; BECKER, T. M. ; WHEELER, C. M. ; ERLICH, H. A. Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 427-436, 1995.
- BENACERRAF, B. Role of MHC products in immune regulation. **Science**, v. 212, p. 1229-1238, 1981.
- BESKOW, A. H. ; JOSEFSSON, A. M. ; GYLLENSTEN, U. B. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer *in situ*. **Int. J. Cancer**, v. 93, p. 817-822, 2001.
- BJORKMAN, P. J. ; SAPER, M. A. ; SAMRAOUI, B. ; BENNETT, W. S. ; STROMINGER, J. L. ; WILEY, D. C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329, p. 506-512, 1987.
- BONTKES, H. J. ; de GRUIJL, T. D. ; WALBOOMERS, J. M. ; SCHILLER, J. T. ; DILLNER, J. ; HELMERHORST, T. J. ; VERHEIJEN, R. H. ; SCHEPER, R. J. ; MEIJER, C. J. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV 16. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 409-417, 1999.

- BOSCH, F.X.; MANOS, M.M.; MUÑOZ, N., SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M.H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, S.K. AND THE IBSCC STUDY GROUP. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 796-802, 1995.
- BOSCH, F. X. ; MUNOZ, N. ; SANJOSE, S. Human papillomavirus and other risk for cervical cancer. **Biomed & Pharmacother.**, v.51, p.268-275, 1997.
- BROWN, J. H. ; JARDETZKY, T. S. ; GORGA, J. C. ; STERN, L. J. ; URBAN, R. G. ; STROMINGER, J. L. ; WILEY, D. C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v. 364, p. 33-39, 1993.
- CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunol. Today**, v.14, n.7, p.349-352, 1993.
- CASTLE, P. E. ; HILLIER, S. L. ; RABE, L. K. ; HILDESHEIM, A. ; HERRERO, R. ; BRATTI, M. C. ; SHERMAN, M. E. ; BURK, R. D. ; RODRIGUEZ, A. C. ; ALFARO, M. ; HUTCHINSON, M. L. ; MORALES, J. ; SCHIFFMAN, M. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer Epidemiol. Biom. Prev.**, v. 10, p. 1021-1027, 2001.
- CHELVANAYAGAM, G. A roadmap for HLA-DR peptide binding specificities. **Hum. Immunol.**, v. 58, p. 61-69, 1997.
- CLERICI, M. ; MEROLA, M. ; FERRARIO, E. ; TRABATTONI, D. ; VILLA, M. L. ; STEFANON, B. ; VENZON, D. J. ; SHEARER, G. M. ; DE PAOLO, G. ; CLERICI, E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, n. 3, p. 245-250, 1997.
- COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W. Immunologic studies in humans. In: _____. **Current protocols in immunology**. 1. ed. John Wiley & Sons, Inc., 1991, v. 2, p. 7.0.1-7.28.22.
- CONWAY, D. J. ; HOLLAND, M. J. ; BAILEY, R. L. ; CAMPBELL, A. E. ; MAHDI, O. S. ; JENNINGS, R. ; MBENA, E. ; MABEY, D. C. Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter and with elevated TNF- α levels in tear fluid. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1003-1006, 1997.
- DAVENPORT, M. P.; QUINN, C. L.; CHICZ, R. M.; GREEN, B. N.; WILLIS, A. C.; LANE, W. S.; BELL, J. I.; HILL, A. V. S. Naturally processed peptides from two disease-resistance-associated HLA-DR13 alleles show related sequence motifs and the effects of the dimorphism at position 86 of the HLA-DR β chain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 6567-6571, 1995.
- de GRUIJL, T. D. ; BONTKES, H. J. ; WALBOOMERS, J. M. M. ; SCHILLER, J. T. ; STUKART, M. J. ; GROOT, B. S. ; CHABAUD, M. M. R. ; REMMINK, A. J. ;

- VERHEIJEN, R. H. M. ; HELMERHORST, T. J. M. ; MEIJER, C. J. L. M. ; SCHEPER, R. J. Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, n. 9, p. 630-638, 1997.
- de GRUIJL, T. D. ; BONTKES, H. J. ; WALBOOMERS, J. M. ; STUKART, M. J. ; DOEKHIE, F. S. ; REMMINK, A. J. ; HELMERHORST, T. J. ; VERHEIJEN, R. H. ; DUGGAN-KEEN, M. F. ; STERN, P. L. ; MEIJER, C. J. ; SCHEPER, R. J. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 relates to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1700-1706, 1998.
- de JONG, A. ; van der BURG, S. H. ; KWAPPENBERG, K. M. C. ; van der HULST, J. M. ; FRANKEN, K. L. M. C. ; GELUK, A. ; van MEIJGAARDEN, K. E. ; DRIJFHOUT, J. W. ; KENTER, G. ; VERMEIJ, P. ; MELIEF, C. J. M. ; OFFRINGA, R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. **Cancer Res.**, v. 62, p. 472-479, 2002.
- DEMBIC, Z. ; HAAS, W. ; WEISS, S. ; McCUBREY, J. ; KIEFER, H. ; von BOEHMER, H. ; STEINMETZ, M. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. **Nature**, v. 320, p. 232-238, 1986.
- DIECKMANN, D. ; PLOTTNER, H. ; BERCHTOLD, S. ; BERGER, T. ; SCHULER, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1303-1310, 2001.
- DJOULAH, S. ; BUSSON, M. ; SASAZUKI, T. ; MAILLIERE, B. ; YASUNAGA, S. ; KIMURA, A. ; CHARRON, D. ; HORS, J. A new predictive model for insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility based on combinations of molecular HLA-DRB1 and HLA-DQB1 pockets. **Tissue Antigens**, v. 54, p. 341-348, 1999.
- DYSON, N. ; HOWLEY, P. M. ; MÜNGER, K. ; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, p. 934-937, 1989.
- EVANS, E. M. ; MAN, S. ; EVANS, A. S. ; BORYSIEWICZ, L. K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Res.**, v. 57, p. 2943-2950, 1997.
- FERRERA, A. ; OLIVO, A. ; ALAEZ, C. ; MELCHERS, W. J. G. ; GORODEZKY, C. HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection. **Hum. Biol.**, v. 71, p. 367-379, 1999.
- FRANCO, E. ; VILLA, L. ; ROHAN, T. ; FERENCZY, A. ; PETZL-ERLER, M. ; MATLASHEWSKI, G. ; LUDWIG-MCGILL STUDY GROUP. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. **Pan. Am. J. Public Health**, v. 6, p. 223-233, 1999.

- GHADERI, M. ; NIKITINA, L. ; PEACOCK, C. S. ; HJELMSTROM, P. ; HALLMANS, G. ; WIKLUND, F. ; LENNER, P. ; BLACKWELL, J. M. ; DILLNER, J. ; SANJEEVI, C. B. **Cancer Epidemiol. Biom. Prev.**, v. 9, p. 1067-1070, 2000.
- GOLDBERG, A. C. ; BITTENCOURT, P. L. ; MOUGIN, B. ; CANÇADO, E. L. R. ; PORTA, G. ; CARRILHO, F. ; KALIL, J. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. **Hum. Immunol.**, v. 62, p. 165-169, 2001.
- GRASSEGGER, A. ; ROLLINGER-HOLZINGER, I. ; ZELGER, B. W. H. ; HEIM, K. ; ZWIERZINA, H. ; FRITSCH, P. O. ; HÖPFL, R. M. Spontaneous or interferon- γ -induced T-cell infiltration, HLA-DR and ICAM-1 expression in genitoanal warts are associated with TH1 or mixed TH1/TH2 cytokine mRNA expression profiles. **Arch. Derm. Res.**, v. 289, p. 243-250, 1997.
- GRAVITT, P. E. ; PEYTON, C. L. ; APPLE, R. J. ; WHEELER, C. M. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization , reverse line blot detection method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3020-3027, 1998.
- HAMMER, J. ; STURNIOLO, T. ; SINIGAGLIA, F. HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity. **Adv. Immunol.**, v. 66, p. 67-100, 1997.
- HAN, R. ; BEITBURD, F. ; MARCHE, P. N. ; ORTH, G. Linkage of regression and malignant conversion of rabbit viral papillomas to MHC genes. **Nature**, v. 356, p. 66-68, 1992.
- HELLAND, A. ; BORRESEN, A. L. ; KAERN, J. ; RONNINGEN, K. S. ; THORSBY, E. HLA antigens and cervical carcinoma. **Nature**, v.356, n.6364, p.23, 1992.
- HEMMINKI, K. ; DONG, C. ; VAITTINEN, P. Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component? **Int. J. Cancer**, v. 82, p. 775-781, 1999.
- HILDESHEIM, A. ; SCHIFFMAN, M. ; SCOTT, D. R. ; MARTI, D. ; KISSNER, T. ; SHERMAN, M. E. ; GLASS, A. G. ; MANOS, M. M. ; LORINCZ, A. T. ; KURMAN, R. J. ; BUCKLAND, J. ; RUSH, B. ; CARRINGTON, M. 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.**, v. 7, p.1035-1041, 1998.
- HÖPFL, R. Skin test for HPV: potential for clinical application? **Papillomavirus Report**, v.12, p. 31-36, 2001.
- HUNG, K. ; HAYASHI, R. ; LAFOND-WALKER, A. ; LOWENSTEIN, C. ; PARDOLL, D. ; LEVITSKY, H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. **J. Exp. Med.**, v.188, p. 2357-2368, 1998.

IARC. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0 (<http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>). IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press, 2001.

INCA. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil: 2000.** Rio de Janeiro: INCA, 2000.

JEON, S. ; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 1654-1658, 1995.

KADISH, A. S. ; ROMNEY, S. L. ; LEDWIDGE, R. ; TINDLE, R. ; FERNANDO, G. J. P. ; ZEE, S. Y. ; VAN RANST, M. A. ; BURK, R. D. Cell-mediated immune responses to E7 peptides of human papillomavirus (HPV) type 16 are dependent on the HPV type infecting the cervix whereas serological reactivity is not type-specific. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 2277-2284, 1994.

KADISH, A. S. ; HO, G. Y. ; BURK, R. D. ; WANG, Y. ; ROMNEY, S. L. ; LEDWIDGE, R. ; ANGELETTI, R. H. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, n. 17, p. 1285-1293, 1997.

KJAER, S. K. ; van den BRULE, A. J. ; BOCK, J. E. ; POLL, P. A. ; ENGHOLM, G. ; SHERMAN, M. E. ; WALBOOMERS, J. M. ; MEIJER, C. J. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v. 6, p. 799-805, 1997.

KOSKELA, P. ; ANTTILA, T. ; BJORGE, T. ; BRUNSVIG, A. ; DILLNER, J. ; HAKAMA, M. ; HAKULINEN, T. ; JELLUM, E. ; LEHTINEN, M. ; LENNER, P. ; LUOSTARINEN, T. ; PUKKALA, E. ; SAIKKU, P. ; THORESEN, S. ; YOUNGMAN, L. ; PAAVONEN, J. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. **Int. J. Cancer**, v. 85, p. 35-39, 2000.

KRENSKY, A. M. The HLA system, antigen processing and presentation. **Kidney Int. Suppl.**, v. 58, p. S2-S7, 1997.

LANGO-WARENJO, A. ; CARDELL, K. ; LINDBLOM, B. Haplotypes comprising subtypes of the DQB*06 allele direct the antibody response after immunisation with hepatitis B surface antigen. **Tissue Antigens**, v. 52, p. 374-380, 1998.

LIN, P. ; KOUTSKY, L. A. ; CRITCHLOW, C. W. ; APPLE, R. J. ; HAWES, S. E. ; HUGHES, J. P. ; TOURE, P. ; DEMBELE, A. ; KIVIAT, N. B. HLA class II DR-DQ and increased risk of cervical cancer among Senegalese women. **Cancer Epidemiol. Biom. Prev.**, v. 10, p. 1037-1045, 2001.

LONDESBOROUGH, P. ; HO, L. ; TERRY, G. ; CUZICK, J. ; WHEELER, C. ; SINGER, A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and

- development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, v. 69, p. 364-368, 1996.
- LOWY, D. R. ; KIRNBAUER, R. ; SCHILLER, J. T. Genital human papillomaviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2436-2440, 1994.
- LUXTON, J. C. ; ROWE, A. J. ; CRIDLAND, J. C. ; COLETART, T. ; WILSON, P. ; SHEPHERD, P. S. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 1585-1593, 1996.
- MACIAG, P. C. ; VILLA, L. L. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 915-922, 1999;
- MACIAG, P. C. ; SCHLECHT, N. F. ; SOUZA, P. S. A. ; FRANCO, E. L. ; VILLA, L. L. ; PETZL-ERLER, M. L. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 9, p. 1183-1191, 2000.
- MACIAG, P. C. ; SCHLECHT, N. F. ; SOUZA, P. S. A. ; FRANCO, E. L. ; ROHAN, T. ; VILLA, L. L. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 164-172, 2002
- MONTOYA, L. ; SAIZ, I. ; REY, G. ; VELA, F. ; CLERICI-LARRADET. Cervical carcinoma: human papillomavirus infection and HLA-associated risk factors in the Spanish population. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 25, p. 329-337, 1998.
- MORAES, M. E. ; FERNANDEZ-VIÑA, M. ; SALATIEL, I. ; TSAI, S. ; MORAES, J. R. ; STASTNY, P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens**, v. 41, p. 238-242, 1993.
- MORRISON, E. A. B. Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 172-180, 1994.
- MOSS, D. J. ; KHANNA, R. Major histocompatibility complex: from genes to function. **Immunol. Today**, v. 20, n. 4, p. 165-67, 1999.
- MUÑOZ, N. ; BOSH, F. X. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. **Bulletin of PAHO**, v. 30, n. 4, p. 362-377, 1996.
- NAKAGAWA, M. ; STITES, D. P. ; FARHAT, S. ; JUDD, A. ; MOSCICKI, A. B. ; CANCHOLA, A. J. ; HILTON, J. F. ; PALEFSKY, J. M. T-cell proliferative response to human papillomavirus type 16 peptides: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, p. 205-210, 1996.
- NAKAGAWA, M. ; STITES, D. P. ; PATEL, S. ; FARHAT, S. ; SCOTT, M. ; HILLS, N. K. ; PALEFSKY, J. M. ; MOSCICKI, A. B. Persistence of human papillomavirus

type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 595-598, 2000.

NIMAKO, M. ; FIANDER, A. N. ; WILKINSON, G. W. G. ; BORYSIEWICZ, L. K. ; MAN, S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4855-4861, 1997.

ODUNSI, K. ; TERRY, G. ; HO, L. ; BELL, J. ; CUZICK, J. ; GANESAN, T. S. Susceptibility to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. **Int. J. Cancer**, v. 67, p. 595-602, 1996.

OSSENDORP, P. ; MENGED, E. ; CAMPS, M. ; FILIUS, R. ; MELIEF, C. J. M. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility class II-negative tumors. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 693-702, 1998.

PALEFSKY, J. M. ; MINKOFF, H. ; KALISH, L. A. ; LEVINE, A. ; SACKS, H. S. ; GARCIA, P. ; YOUNG, M. ; MELNICK, S. ; MIOTTI, P. ; BURK, R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n. 3, p. 226-236, 1999.

PETRY, K. U. ; SCHEFFEL, D. ; BODE, U. ; GABRYSIK, T. ; KÖCHEL, H. ; KUPSCH, E. ; GLAUBITZ, M. ; NIESERT, S. ; KÜHNLE, H. ; SCHEDEL, I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. **Int. J. Cancer**, v. 57, p. 836-840, 1994.

PEYTON, C. L. ; GRAVITT, P. E. ; HUNT, W. C. ; HUNDLEY, R. S. ; ZHAO, M. ; APPLE, R. J. ; WHEELER, C. M. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1554-1564, 2001.

PISANI, P. ; PARKIN, D. M. ; FERLAY, J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. **Int. J. Cancer**, v. 55, p. 891-903, 1993.

RIDGE, J. P. ; DI ROSA, F. ; MATZINGER, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. **Nature**, v. 393, p. 474-478, 1998.

SAKAGUCHI, S. ; SAKAGUCHI, N. ; ASANO, M. ; ITOH, M. ; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-1164, 1995.

SALMON, J. ; NONNENMACHER, M. ; CAZE, S. ; FLAMANT, P. ; CROISSANT, O. ; ORTH, G. ; BREITBURD, F. Variation in the nucleotide sequence of cottontail

- rabbit papillomavirus a and b subtypes affects wart regression and malignant transformation and level of viral replication in domestic rabbits. **J. Virol.**, v. 74, p. 10766-10777, 2000.
- SANJEEVI, C. B. ; HJELMSTRÖM, P. ; HALLMANS, G. ; WIKLUND, F. ; LENNER, P. ; ANGSTRÖM, T. ; DILLNER, J. ; LERNMARK, A. Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative swedish women. **Int. J. Cancer**, v. 68, p. 409-414, 1996.
- SASTRE-GARAU, X. ; LOSTE, M. N. ; VINCENT-SALOMON, A. ; FAVRE, M. ; MOURET, E. ; ROCHEFORDIERE, A. DE LA ; DURAND, J. C. ; TARTOUR, E. ; LEPAGE, V. ; CHARRON, D. Decreased frequency of HLA-DRB1*13 alleles in frenchwomen with HPV-positive carcinoma of the cervix. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, v. 69, p. 159-164, 1996.
- SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 84, n. 6, p. 394-398, 1992.
- SCHIFFMAN, M. H. ; BAUER, H. M. ; HOOVER, R. N. ; GLASS, A. G. ; CADELL, D. M. ; RUSH, B. B. ; SCOTT, D. R. ; SHERMAN, M. E. ; KURMAN, R. J. ; WACHOLDER, S. ; STANTON, C. K. ; MANOS, M. M. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 12, p. 958-964, 1993.
- SCHLECHT, N. F. ; FRANCO, E. L. ; VILLA, L. L. ; FERENCZY, A. Longitudinal data analysis of the association between HPV and cervical intraepithelial neoplasia in Southern Brazil. **18th International Papillomavirus Conference**. Program and Abstracts, p.133, 2000.
- SCHLEGEL, R. ; PHELPS, W. C. ; ZHANG, Y-L. ; BARBOSA, M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. **EMBO**, v. 7, n. 10, p. 3181-3187, 1988.
- SHEPHERD, P. S. ; TRAN, T. T. T. ; ROWE, A. J. ; CRIDLAND, J. C. ; COMEFORD, S. A. ; CHAPMAN, M. G. ; RAYFIELD, L. S. T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in mice of different haplotypes. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 1269-1274, 1992.
- SHEPHERD, P. S. ; ROWE, A. J. ; CRIDLAND, J. C. ; COLETART, T. ; WILSON, P. ; LUXTON, J. C. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 593-602, 1996.
- SHIMIZU, J. ; YAMAZAKI, S. ; SAKAGUCHI, S. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **J. Immunol.**, v. 163, p. 5211-5218, 1999.

- SMITH, J. D. ; MUÑOZ, N. ; HERRERO, R. ; ELUF-NETO, J. ; NGELANGEL, C. ; FRANCESCHI, S. ; BOSCH, F. X. ; WALBOOMERS, J. M. M. ; PEELING, R. W. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and The Philippines. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 324-331, 2002.
- SOLOMON, D. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, USA, December 12-13, 1988. **J. Clin. Cytol. Cytopathol.**, v. 33, p. 567-574, 1989.
- STERN, L. J. ; BROWN, J. H. ; JARDETZKY, T. S. ; GORGA, J. C. ; URBAN, R.G. ; STROMINGER, J. L. ; WILEY, D. C. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. **Nature**, v. 17, p. 215-221, 1994.
- STRANG, G. ; HICKLING, J. K. ; McINDOE, G. A. J. ; HOWLAND, K. ; WILKINSON, D. ; IKEDA, H. ; ROTHBARD, J. B. Human T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 and E6 synthetic peptides: identification of T cell determinants, HLA-DR restriction and virus type specificity. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p 423-431, 1990.
- STURNIOLO, T. ; BONO, E. ; DING, J. ; RADRIZZANI, L. ; TUERICI, O. ; SAHIN, U. ; BRAXENTHALER, M. ; GALLAZZI, F. ; TROTTI, M. P. ; SINIGAGLIA, F. ; HAMMER, J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. **Nature Biotech.**, v.17, p. 555-561, 1999.
- SUTMULLER, R. P. M. ; van DUIVENVOORDE, L. M. ; van ELSAS, A. ; SCHUMACHER, T. N. M. ; WILDENBERG, M. E. ; ALLISON, J. P. ; TOES, R. E. M. ; OFFRINGA, R. ; MELIEF, C. J. M. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25⁺ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 823-832, 2001.
- TAKAHASHI, T. ; TAGAMI, T. ; YAMAZAKI, S. ; UEDE, T. ; SHIMIZU, J. ; SAKAGUCHI, N. ; MAK, T. W. ; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 303-309, 2000.
- TARTOUR, E. ; GEY, A. ; SASTRE-GARAU, X. ; SURIN, I. L. ; MOSSERI, V. ; FRIDMAN, W. H. Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 4, p. 287-294, 1998.
- THOMPSON, C. B. ; ALLISON, J. P. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. **Immunity**, v. 7, p. 445-450, 1997.
- TING, Y.; MANOS, M. M. Detection and typing of genital human papillomavirus. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols**.

A guide to methods and applications. 1. ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1990, p. 356-367.

- TOES, R. E. M. ; OSSENDORP, F. ; OFFRINGA, R. ; MELIEF, C. J. M. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. **J. Exp. Med.**, v. 189, n.5, p.753-756, 1999.
- TSUKUI, T. ; HILDESHEIM, A. ; SCHIFFMAN, M. H. ; LUCI III, J. ; CONTOIS, D. ; LAWLER, P. ; RUSH, B. B. ; LORINCZ., A. T. ; CORRIGAN, A. ; BURK, R. D. ; QU, W. ; MARSHALL, M. A. ; MANN, D. ; CARRINGTON, M. ; CLERICI, M. ; SHEARER, G. M. ; CARBONE, D. P. ; SCOTT, D. R. ; HOUGHTEN, R. A. ; BERZOFSKY, J. A. Interleukin 2 production *in vitro* by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. **Cancer Res.**, v.56, p.3967-3974, 1996.
- UNANUE, E. R. ; ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 236, p. 551-557, 1987.
- van der BURG, S. H. ; RESSING, M. E. ; KWAPPENBERG, K. M. C. ; de JONG, A. ; STRAATHOF, K. ; de JONG, J. ; GELUK, A. ; van MEIJGAARDEN, K. E. ; FRANKEN, K. L. M. C. ; OTTENHOFF, T. H. M. ; FLEUREN, G. J. ; KENTER, G. ; MELIEF, C. J. M. ; OFFRINGA, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leucocyte antigen class II-restricted epitopes. **Int. J. Cancer**, v. 91, p. 612-618, 2001.
- VERNON, S. D. ; UNGER, E. R. ; MILLER, D. L. ; LEE, D. R. ; REEVES, W. C. Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, v. 74, p. 50-56, 1997.
- VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv. Cancer Res.**, v. 71, p. 321-341, 1997.
- VILLA, L. L. ; RAHAL, P. ; FRANCO, E. L. Molecular variant analysis as a tool in natural history studies of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. In: FRANCO, E. L. ; MONSONEGO, J. **New developments in cervical screening and prevention**. Blackwell Science, 1997, p. 374-379.
- VILLADANGOS, J. A. ; PLOEGH, H. L. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? **Immunity**, v.12, p.233-239, 2000.
- WALBOOMERS, J.M. ; JACOBS, M.V. ; MANOS, M.M. ; BOSCH, F.X. ; KUMMER, J.A. ; SHAH, K.V. ; SNIJDERS, P.J. ; PETO, J. ; MEIJER, C.J. ; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 1, p. 12-9, 1999.
- WANK, R. ; THOMSEN, C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. **Nature**, v. 352, p. 723-725, 1991.

- WERNESSE, B. A. ; LEVINE, A. J. ; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, p. 76-79, 1990.
- WIDEROFF, L. ; SCHIFFMAN, M. H. ; NONNENMACHER, B. ; HUBBERT, N. ; KIRNBAUER, R. ; GREER, C. E. ; LOWY, D. ; LORINCZ, A. T. ; MANOS, M. M. ; GLASS, A. G. ; SCOTT, D. R. ; SHERMAN, M. E. ; KURMAN, R. J. ; BUCKLAND, J. ; TARONE, R. E. ; SCHILLER, J. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particle in an incident case-control study of cervical neoplasia. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 1425-1430, 1995.
- WILSON, A. G. ; de VRIES, F. S. ; POCIOT, F. ; di GIOVINE, , F. S. ; van der PUTTE, L. B. A. ; DUFF, G. W. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 557-560, 1993.
- WOO, E. Y. ; YEH, H. ; CHU, C. S. ; SCHLIENGER, K. ; CARROL, R. G. ; RILEY, J. L. ; KAISER, L. R. ; JUNE, C. H. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4272-4276, 2002.
- YEWDELL, J. W. ; BENNINK, J. R. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, n.1, p.13-8, 2001.
- ZINKERNAGEL, R. M. ; EHL, S. ; AICHELE, P. ; OEHEN, S. ; KÜNDIG, T. ; HENGARTNER, H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 199-209, 1997.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, p. F55-F78, 1996.