

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESSQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

PAULA ANDRÉA GABRIELLI FREGONEZI

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS HLA NÃO CLÁSSICAS (HLA-G E HLA-E) E RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL, ASSOCIADA A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

ARARAQUARA

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESSQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

PAULA ANDRÉA GABRIELLI FREGONEZI

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS HLA NÃO CLÁSSICAS (HLA-G E HLA-E) E RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL, ASSOCIADA A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

ARARAQUARA

2007

PAULA ANDRÉA GABRIELLI FREGONEZI

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS HLA NÃO CLÁSSICAS (HLA-G E HLA-E) E RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL, ASSOCIADA A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Análises Clínicas, área de Citologia Clínica.

ORIENTADORA: Prof(a).Dra. Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA

2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Fregonezi, Paula Andréa Gabrielli

F859e Expressão imunohistoquímica de moléculas *HLA não clássicas (HLA-G e HLA-E)* e receptores *CD4, CD25 e CD28* em lesões de mucosa oral, associadas à infecção pelo *Papilomavírus humano (HPV)* / Paula Andréa Gabrielli Fregonezi. – Araraquara, 2006.
145 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.

Orientadora: Christiane Pienna Soares.

1. *Papilomavírus humano (HPV)* – Lesões orais. 2. *HLA não clássicas HLA-G e HLA-E*. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

CDD: 616.075

COMISSÃO EXAMINADORA

**Profa.Dra. Christiane Pienna Soares – Orientadora e
Presidente**

**Profa.Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros – Membro
Titular**

Prof.Dr. Eduardo Antonio Donadi – Membro Titular

Prof.Dr. Sérgio Nicolau Mansini – Membro Titular

Prof.Dr. Paulo Tambasco – Membro Titular

MENSAGEM

*BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINAÇÃO,
ABRAÇAR A VIDA E VIVER COM PAIXÃO,
PERDER COM CLASSE E VENCER COM OUSADIA,
POIS O TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE...
E A VIDA É MUITO PARA SER INSIGNIFICANTE.*

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

**Dedico esta tese as minhas filhas Maria Paula e Paola,
ao meu marido Carlinhos e aos meus amados pais,
por todo tempo que fui ausente e não pude compartilhar
os momentos de alegria que vocês sempre me proporcionam.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, consciência, habilidade e coragem para atingir o meu objetivo realizando este trabalho.

Ao meu esposo Carlinhos, o meu reconhecimento pelo sacrifício e a minha promessa de fazer o máximo para que esses anos sejam lembrados, de momentos poucos, mas muito intensos, nos méritos de minhas conquistas há muito de sua presença.

A minha orientadora profa. Dra. Christiane exemplo, aprendizado, pois todo o tempo foi presente e realizou sua função com excelência.

A professora Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros pela colaboração com seus valiosos conhecimentos que foram relevantes na conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo Antonio Donadi que nos auxiliou com seu conhecimento e nos ofereceu seu laboratório para realizar parte dos experimentos.

Ao professor Dr. Vanderlei Menani que novamente foi pronto para nos emprestar seus equipamentos de captura de imagem e analisador.

Ao Dr. Edson Garcia Soares que nos auxiliou na interpretação dos resultados das biópsias e dos marcadores.

A Débora, grande amiga, que sempre me incentivou na execução deste trabalho.

A Renata Mazon que participou ativamente deste trabalho e se tornou grande amiga.

Mariana, Maísa e Roberta que sempre me ajudaram quando solicitava e estavam a todo o momento presente.

A Renata Simões que foi essencial na realização deste trabalho me ensinou muito do seu profissionalismo e competência.

Ao pessoal do laboratório da Usp de Ribeirão, Neife, Marcos e Mariana, que estiveram sempre prontos para me auxiliar.

A Ana Soares que cortou as biópsias com rapidez e prontidão.

As funcionárias da Seção de Pós-graduação Claudia, Laura e Sônia por estarem sempre prontos para atender e dispensar toda atenção e informações necessárias para a realização deste trabalho.

A Irani que sempre me auxiliou em todas as dúvidas com relação a realização deste trabalho.

As minhas funcionárias do laboratório e de minha casa, que sem elas não conseguiria completar este trabalho.

A minha amiga Laurita que me ajudou muito com a impressão destes exemplares.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, não podendo citar todos neste espaço, mas os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1) RESUMO	15
2) ABSTRAT	17
3) REVISÃO DA LITERATURA E INTRODUÇÃO	19
-3.1 Cancer oral	20
-3.2 Cofatores da carcinogênese oral	25
-3.3 HPV e Câncer oral	30
-3.4 CHP e Câncer	30
-3.5 Resposta de células T e moléculas co-estimulatórias	34
-3.6 Resposta imunológica, HPV e Câncer	38
4) JUSTIFICATIVA	39
5) OBJETIVOS	43
6) MATERIAIS E MÉTODOS	45
-6.1 Casuística	46
-6.2 Metodologias	47
-6.2.1 Imunohistoquímica	47
-6.2.2 Controles	48
-6.2.3 Análise Quantitativa da expressão imunohistoquímica	48
-6.2.4 Interpretação da imunoreatividade	49
-6.2.5 Detecção e tipagem do HPV	50
-6.2.6 Amplificação do HPV e de Beta-globina	51
-6.2.7 Análise Estatística	53

7) RESULTADOS:	54
7.1-EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS NÃO CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM LESÕES DE MUCOSA ORAL SSOIADAS A INFECÇÃO PELO HPV	55-61
7.2- EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL INFECTADDAS PELO HPV	62-68
8) DISCUSSÃO	69
9) CONCLUSÕES	79
10) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
11) ANEXO 1	105
12) ANEXO 2	124

LISTA DE TABELAS

01) EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS NÃO CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM LESÕES DE MUCOSA ORAL ASSOCIADAS A INFECÇÃO PELO HPV

TABELA 1- Expressão de moléculas não clássicas e detecção do DNA de HPV **57**

TABELA 2- Expressão imunohistoquímica quantitativa de HLA-G and HLA-E **58**

2) EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL INFECTADAS PELO HPV

TABELA 1- Detecção do DNA de HPV **64**

TABELA 2- Ausência ou baixa expressão imunohistoquímica (positivity index = zero to < 15%) das moléculas CD4, CD25 and CD28 molecules de acordo com as lesões **64**

TABELA 3- Ausência ou baixa expressão imunohistoquímica das moléculas CD4, CD25 and CD28 de acordo com a presença de HPV **65**

LISTA DE FIGURAS

01) REVISÃO DA LITERATURA E INTRODUÇÃO

FIGURA 1- Incidência de Câncer Oral	21
FIGURA 2- Ciclo de Vida do HPV	29
FIGURA 3- Representação Esquemática do complexo HLA	32

2) RESULTADOS

2.1 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS NÃO CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM LESÕES DE MUCOSA ORAL ASSOCIADAS A INFECÇÃO PELO HPV

FIGURA 1- Expressão quantitativa das moléculas não clássicas (HLA-G e HLA-E)	59
FIGURA 2- Correlação de Pearson de HLA-G and HLA-E e o HPV	60
FIGURA 3- HLA-G (Painel A a C) e HLA-E (Painel D a F) marcação da membrana citoplasmática em lesões infectadas pelo HPV	61

2.2 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL INFECTADAS PELO HPV

FIGURA 1- Expressão quantitativa dos receptores CD4, CD25 e CD28	66
FIGURA 2- CD25 (Painel A a C) and CD28 (Painel D a F) marcação de infiltrado linfocitário em lesões infectadas pelo HPV	67
FIGURA 3- CD4 (Painel A a C) marcação do infiltrado linfocitário em lesões orais	68

ABREVIATURAS

HPV- Papilomavírus Humano

CEC- Carcinoma espinocelular

KDa-Kilo Daltons

CTLs- Linfócitos T citotóxicos

CHP- Complexo de Histocompatibilidade Principal

HLA- *Human Leukocyte Antigen*

TNF- Fator de Necrose Tumoral

KIR- *Human Killer inhibitory receptor group*

LIR- *Leucocyte Ig-like receptors*

CD- *Cluster of differentiation*

APC- Célula Apresentadora de Antígeno

IL- Interleucina

NK- *Natural Killer*

PCR- Reação de Polimerização em Cadeia

TAP- Transportador Associado ao Processamento de Antígeno

INF- Interferon

As células tumorais infectadas pelo HPV podem apresentar estratégias para escapar da resposta imunológica resultando na persistência da infecção viral e na transformação celular maligna. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel das células T e, indiretamente, das células *Natural Killer* (NK), em lesões orais causadas pelo HPV. A avaliação imunohistoquímica dos receptores de células T em infiltrado linfocitário foi realizada nas 79 biópsias de mucosa oral divididas de acordo com sua diferenciação histológica. Por outro lado, em algumas destas lesões (=51) foi avaliada a expressão tecidual de moléculas HLA não clássicas. A expressão das moléculas CD4, CD25, CD28, HLA-G e HLA-E foi avaliada pelo método de imunoperoxidase e quantitativamente avaliado por análise de imagem. A detecção do DNA do HPV e a identificação dos tipos virais foi realizada pela técnica de polimerização em cadeia (PCR). Das 79 lesões orais, 30(38%) tinham HPV e 49(62%) não tinham HPV, enquanto em 51 pacientes, 24(47%) foram HPV positivo e 27(53%) foram HPV negativos. Tipos de HPV de alto risco foram mais frequentes em todas as lesões orais e infecções por diferentes tipos de HPV foram observados na mesma lesão. Diminuição da expressão de CD4/CD25 e CD25/CD28 ($P=0,037$) foi observada nas lesões malignas e em todas as lesões com HPV. Menor expressão de CD4 e maior expressão de CD28 foram observadas em lesões orais malignas quando comparadas com as lesões benignas ($P=0,005$). Em 51 pacientes, elevada expressão de HLA-G foi observada em lesões orais benignas ($p<0,01$) e progressivamente diminuiu nas lesões pré-malignas e malignas. Correlação inversa ($r = - 0,3944$, $p<0,05$) foi observada em lesões orais com HPV, com alta expressão de HLA-G e baixa expressão de HLA-E. Em conclusão, a diminuição da expressão de receptores de células T e de moléculas HLA-E, bem como a maior expressão de moléculas HLA-G pode ser uma estratégia do HPV para escapar da imunovigilância do hospedeiro, resultando na infecção viral persistente e na carcinogênese oral.

HPV-infected tumor cells could present strategies to evade from the immune responses, resulting in the persistence of viral infection and to malignant cell transformation. The aim of the present study was to investigate the role of T cells, and, indirectly, natural killer cells, in HPV-infected oral lesions. To investigate T cell receptors in lymphocyte infiltrate, immunohistochemistry evaluation was performed in 79 oral biopsies, stratified according histological differentiation. On the other hand, some of those oral lesions (n=51) were evaluated to non-classic HLA molecules tissue expression. The analysis of CD4, CD25, CD28, HLA-G and HLA-E expression were performed by immunoperoxidase method and quantitatively evaluated by computer-assisted image analyse method. DNA HPV detection and HPV typing was performed by PCR technique. Out of 79 oral lesions, 30 (38%) were infected with HPV and 49 (62%) were not infected, while in 51 patients, 24(47%) were HPV positive and 27(53%) were negative. High-risk HPV types were more frequent among all oral lesions and multiple HPV type infection was observed in the same oral lesions. Downregulation of CD4/CD25 and CD25/28 (P=0.037) was observed in malignant oral lesions and in all oral lesions groups HPV-infected. Lower expression of CD4 and higher expression of CD28 were observed in malignant oral lesions, when compared with benign lesions (P=0.005). In 51 patients, HLA-G overexpression was observed in benign oral lesions (p < 0.01) and progressively decreased in premalignant to malignant oral lesions. An inverse correlation (r = - 0.3944, p< 0.05) was observed in HPV-infected oral lesions, with high HLA-G expression and low HLA-E expression. We can conclude that downregulation of T cell receptors and HLA-E tissue expression as well as upregulation of HLA-G molecule might be an HPV strategy to escape from host immune surveillance, which could result in HPV persistent infection and oral carcinogenesis

CÂNCER ORAL

O câncer é uma das maiores ameaças à saúde pública tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento e, segundo relatório de 2004, ele foi o responsável pela morte, em todo o mundo, de 7,1 milhões de pessoas no ano de 2003 (WHO, 2004). Mundialmente considerado como um problema de saúde pública, o câncer representa a terceira causa de morte no Brasil, e, segundo dados do Ministério da Saúde, 402.190 novos casos e 126.960 óbitos por câncer foram observados no ano de 2003 (BRASIL, 2004).

Os carcinomas de cabeça e pescoço representam 5,5% do total de neoplasias malignas no mundo, sendo o sexto tipo de carcinoma mais comumente encontrado (SARANATH et al., 1999) . No Brasil, excluindo o câncer de pele, os cânceres de oro-faringe representam a quinta maior incidência de neoplasias entre os homens e a sétima entre as mulheres. Esses tumores contribuíram com, em média, 2,7% e 0,7% do total de mortes causadas por câncer entres homens e mulheres, respectivamente, no período compreendido entre 1980-1995 (WUNSCH-FILHO, 2002) . A incidência de câncer oral é de 9,5 em homens e 3,0 em mulheres por 100 mil habitantes. Anualmente, cerca de 500.000 novos casos de carcinomas da região da orofaringe são diagnosticados no mundo, sendo que desses, 65.000 casos ocorrem na Índia. Em alguns países, a incidência e a mortalidade por esse tipo de carcinoma têm permanecido estáveis ou aumentado nas últimas décadas, especialmente na população masculina jovem dos países ocidentais e na Europa Oriental (SARANATH et al., 1999) . Por outro lado, o aumento da incidência do câncer oral/faríngeo tem sido relatado em várias regiões tais como Dinamarca, França, Alemanha, Escócia, Europa Central e Oriental (LANE, 2003); nos Estados Unidos cerca de 29.000 casos por ano são diagnosticados (WALKER et al., 2003) .

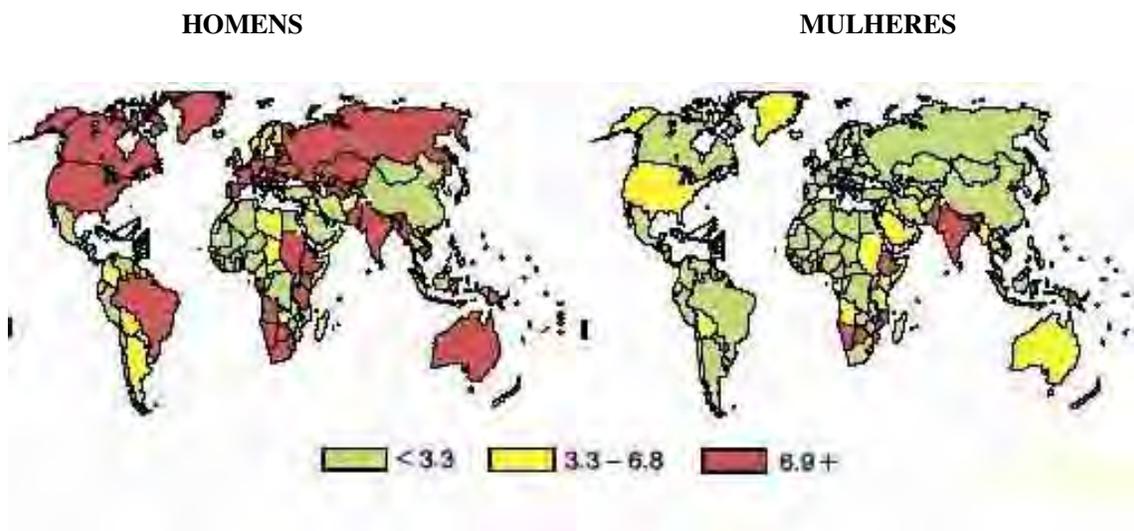


Figura 1- Incidência do Câncer Oral no mundo, independente da idade. As diferenças observadas se devem aos fatores de risco de cada região e ao acesso ao sistema de saúde. IARC - *International Agency for Research on Cancer*, 2003.

Dentre as lesões de orofaringe o câncer oral é um grave e crescente problema de saúde pública no Brasil, correspondendo a 4% de todos os tipos de câncer, ocupando o oitavo lugar entre os tumores que acometem o homem e o décimo primeiro entre as mulheres. O carcinoma espinocelular é a neoplasia mais comum na mucosa oral, representando 95% dos tumores malignos dessa região. (SCULLY et al., 2000; BIRNER et al., 2001). O diagnóstico do câncer oral é simples e deve ser precoce, pois sua evolução natural é rápida e, num estágio avançado não é possível o tratamento, culminando com a morte do indivíduo (KOWALSKI e CARVALHO, 2001). Adicionalmente, a média de vida de um paciente com câncer oral é de aproximadamente 5 anos em 40 a 50% dos casos e algumas vezes essa mortalidade tem sido atribuída ao acesso de determinados pacientes a serviços especializados (BROUHA et al., 2005). Por outro lado, o diagnóstico tardio resulta no aumento dos custos com o tratamento e

prolongado tempo de internação hospitalar do paciente, ocasionando severo impacto no sistema de saúde. (KOWALSKI et al., 1994) .

Nas regiões geográficas de maior prevalência de câncer oral, o hábito de fumar e a ingestão regular de álcool parecem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento desse tipo de carcinoma, totalizando 90% dos cânceres orais; o risco de câncer aumenta com o consumo de álcool (REIBEL, 2003; COGLIANO, 2004). Um estudo no Rio de Janeiro revelou que 76,5% dos pacientes com câncer oral eram fumantes, enquanto um outro estudo realizado nas cidades de São Paulo, Curitiba e Goiânia também apontou uma forte associação entre o fumo e o aumento da incidência de câncer oral. Esse e outros estudos também indicam o consumo de álcool, especialmente da cachaça, como contundente fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias orais (FRANCO et al., 1989; LEITE e KOIFMAN, 1998; WUNSCH-FILHO, 2002).

Dentre as diferentes lesões que são observadas na cavidade oral, carcinoma espinocelular (CEC) é o tumor maligno mais frequentemente encontrado na mucosa oral, nas regiões da língua, lábio e assoalho bucal (KUFFER e LOMBARDI, 2002). Sendo precedido por lesões pré-malignas que podem apresentar-se clinicamente como leucoplasias, eritroplasias, leucoeritroplasia e líquen plano (NEVILLE et al., 1998, RUIZ MENDEZ et al., 1989; GERVASIO et al., 2001; COLETTA et al., 2002) . Durante a última década, um maior interesse tem ocorrido em relação às alterações celulares que precedem o carcinoma espinocelular, como por exemplo, as leucoplasias sendo uma parte delas representativas de diferentes estágios de malignização ou decorrentes de lesões que parecem clinicamente normais. A maioria dessas lesões tem sido chamadas de pré-cancerosas, um termo que é empregado de forma diversa entre os diferentes especialistas. Para os ginecologistas, lesões pré-cancerosas são entendidas segundo o conceito histológico de displasia ou neoplasia intraepitelial. Entretanto, para os dentistas e estomatologistas, o entendimento de alterações

pré-malignas está associado ao conceito clínico de leucoplasia (KUFFER e LOMBARDI, 2002). O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia mais comum na cavidade bucal e representa 90% de todos os tumores malignos da região bucal e 4% de todos os tipos de câncer (SCULLY et al., 2000; BIRNER et al., 2001; KUFFER e LOMBARDI, 2002; WALKER et al., 2003).

As lesões pré-malignas na mucosa oral são classificadas clinicamente como leucoplasia oral que é conceituada como uma lesão predominantemente branca que clinicamente não pode ser caracterizada como qualquer outro tipo de lesão (AXELL et al., 1996), sendo considerada uma lesão pré-maligna ou potencialmente malignizante (AXELL et al., 1996; VAN DER WAAL, et al., 1997). As leucoplasias apresentam padrões e aspectos semelhantes, porém, microscopicamente, são muito heterogêneas, variando da hiperqueratose benigna ao carcinoma invasor de células escamosas. As características histológicas das leucoplasias podem, eventualmente, estar associadas a um maior risco de transformação maligna, podendo ser classificadas segundo o grau de displasia (REGEZI e SCIUBA, 2000; VAN DER WAAL et al., 2000; SCHEPMAN et al., 1998).

Assim, displasia é uma organização anormal ou um crescimento desordenado de células ou tecidos presentes em um órgão. Histologicamente, comparando-se o tecido normal ao displásico, podem-se observar alterações epiteliais nítidas e bem características, constituindo-se um quadro histológico distinto (REGEZIE e SCIUBA, 2000). Quanto maior a atipia celular presente na displasia epitelial, maior será o risco de transformação maligna. Dessa forma, a caracterização histopatológica tecidual é importante para o estabelecimento da extensão e gravidade dessas lesões.

O sistema de classificação das leucoplasias orais inclui o tamanho, o local da lesão em sítios de alto risco ou de baixo risco, a subclassificação clínica homogênea ou não homogênea e grau de displasia epitelial (VAN DER WAAL et al., 2000). Em geral, o aspecto histológico

da leucoplasia pode variar de atrofia a hiperplasia epitelial com ou sem hiperqueratose. Entretanto, as leucoplasias também podem apresentar diferentes graus de displasia epitelial, de discreto a severo, e em alguns casos, ter alterações compatíveis com carcinoma *in situ* (VAN DER WAAL et al., 1997). O diagnóstico histopatológico das leucoplasias serve para dois propósitos: excluir qualquer outra lesão branca definida, como por exemplo, o líquen plano, e estabelecer o grau de displasia epitelial, se presente. Ainda, o diagnóstico clínico de leucoplasia pode ser substituído, se o diagnóstico histopatológico for definido como carcinoma *in situ* ou invasivo (VAN DER WAAL et al., 1997).

O risco de transformação maligna pode variar de acordo com o sexo, mais prevalente entre as mulheres, tipo de leucoplasia, presença de *Candida albicans*, e/ou a presença de displasia epitelial. Em relação ao tipo, as lesões leucoplásicas idiopáticas, não homogêneas e de longa duração, ou mesmo aquelas situadas na língua e/ou assoalho da boca, apresentam maior probabilidade de tornarem-se lesões malignas (RODRIGUES, et al., 1998). Dessa forma, as lesões displásicas (leucodisplasia) possuem maior risco de transformação maligna que as lesões não displásicas, também denominadas leucoqueratoses (AXELL, et al., 1996; VAN DER WAAL, et al., 2000). Embora a malignização seja mais freqüente nas lesões com displasias, a transformação carcinomatosa pode também acontecer em leucoplasias não displásicas (BURKHARDT, 1985; CRISSMAN, 1989; SILVERMAN, 1996). As lesões sem displasia são consideradas benignas com possibilidade de reversão e apresentam, em geral, bom prognóstico. Das lesões benignas que acometem os tecidos orais, a hiperplasia fibrosa inflamatória é encontrada com freqüência, localizada na face vestibular do rebordo alveolar. Estas lesões apresentam padrão de proliferação celular em tecido conjuntivo fibroso, em função de trauma ocasionado por prótese total ou parcial mal-adaptada. Outras hiperplasias fibrosas similares não tão comuns, classificadas como pólipos fibroepiteliais, estão localizadas no palato duro como resposta celular proliferativa induzida por dentadura (NEVILLE et al.,

1998). Porém, é possível encontrar esse tipo de hiperplasia em gengiva, resultantes de irritação local, com quadro histológico característico de processo inflamatório (SHAFER, 1987).

COFATORES DA CARCINOGENESE ORAL

Fumo e Álcool

O cigarro contém uma mistura de pelo menos 50 componentes, incluindo carcinógenos como nitrosaminas, aldeídos, aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SCULLY, 2000.). Muitos desses componentes formam aductos com o DNA, sendo que fumantes apresentam uma maior quantidade de aductos e de quebras no DNA em tecidos da cavidade oral do que não fumantes (PHILLIPS, 2002). As bebidas alcoólicas também contêm muitos carcinógenos e pró-carcinógenos, incluindo o etanol e as nitrosaminas. O acetaldeído, um dos produtos do metabolismo do etanol, é citotóxico e resulta na produção de radicais livres e bases hidroxiladas no DNA (SCULLY, 2000) . Existe uma clara evidência de que pacientes com câncer oral apresentam maior dano no DNA do que pessoas com hábitos similares de consumo de álcool e fumo, mas sem neoplasia (SCULLY, 2000). Adicionalmente, a presença de lesões de cavidade oral pode ocorrer em diferentes sítios anatômicos e está associada a cofatores distintos. No carcinoma de lábio inferior, a participação da radiação solar como fator de risco está bem estabelecida. Em contrapartida, a etiologia dos carcinomas intrabucais, principalmente o de língua, é atribuída ao fumo e ao álcool (BUNDGAARD, 1994; COLETTA et al., 2002). Embora tabaco e álcool sejam fatores de risco bem estabelecidos para o câncer oral, entretanto uma pequena proporção (15 a 20%) dos pacientes não tem historia de tabagismo e etilismo, sugerindo a presença de outros fatores de risco como o papilomavírus humano (HPV), porém seu papel ainda não foi bem definido

(XAVIER et al., 2005). Assim, o carcinoma da cavidade oral é considerado uma doença que envolve a participação de fatores genéticos e ambientais e alguns estudos apontam a infecção pelo HPV no desenvolvimento desse tipo de câncer (FREGONESI, 2003; NAGPAL, 2003).

Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é um vírus de DNA, da família *Papovaviridae*, identificado primeiramente por STRAUSS, em 1949, e, desde então, vem sendo isolado em inúmeras espécies animais. As partículas virais completas não são envelopadas e o capsídeo proteico tem padrão icosaédrico, possuindo 55 nm de diâmetro. No interior do capsídeo, o DNA é circular e dupla fita, medindo de 7500 a 8000 pares de bases (pb) (HOWLEY, 1994; MAJEWSKI, 1997; ZUR HAUSEN, 2002). O ciclo de vida dos tipos de HPV está ligado ao processo de diferenciação celular do epitélio (STUBENRAUCH, 1999; ZUR HAUSEN, 2000). O genoma viral contém duas regiões principais compostas por ORFs (*open reading frames*) que codificam as proteínas virais. A região E (precoce) é constituída por 8 genes (E1-E8, sendo que E3 e E8 não têm função conhecida) e codifica as proteínas envolvidas na replicação viral, e, para os HPVs de alto risco, no processo de imortalização. A região L (tardia) codifica as proteínas estruturais necessárias para a produção do capsídeo. Além dessas, ainda existe uma região regulatória que contém a origem para a replicação viral e controla a transcrição de alguns genes da região E (HEISE, 2003). As proteínas codificadas pela região E são capazes de interagir com várias proteínas da célula hospedeira, interferindo com processos como controle do ciclo celular, resposta apoptótica, sinalização celular e expressão gênica e podendo colaborar com a transformação maligna celular (ZUR HAUSEN, 2000).

O tamanho relativamente pequeno do genoma do HPV permite a análise de cada gene e a interação das proteínas virais com a célula hospedeira. Os genes precoces compõem 60%

do genoma viral e estão envolvidos com a replicação do DNA (região E1), controle da transcrição (região E2), maturação do vírus e alteração da matriz e citoesqueleto celulares (região E4) e no estímulo da proliferação e transformação celular (regiões E5, E6 e E7). Os genes L1 e L2, da região tardia, compõem 40% do genoma e constituem seqüências altamente conservadas entre todos os papilomavírus e respondem por sua antigenicidade. Estes genes codificam proteínas estruturais do capsídeo viral, a proteína principal L1, de 54 Kilo Daltons (KDa) e a proteína secundária L2, de 52 KDa (ZUR HAUSEN, 2002).

A origem de replicação está localizada na região designada LCR ou URR, entre L1 e E6, com aproximadamente 500 a 1000 pb, onde foram mapeados vários sítios de ligação de elementos regulatórios virais (produtos de E2), ou celulares (fatores de transcrição da célula hospedeira) que, em conjunto, determinam a regulação positiva ou negativa da transcrição dos genes virais (HOWLEY, 1994; IARC, 1995; ZUR HAUSEN, 2002).

O HPV tem tropismo por células epiteliais de pele e mucosa, causando proliferação benigna ou maligna, na dependência do tipo viral, decorrente do modo de interação, episomal ou integrada, entre o vírus e a célula. Portanto, esta interação determina o potencial oncogênico de determinados tipos virais em sítios anatômicos prevalentes. Alguns tipos são encontrados com maior frequência em lesões malignas de pele (HPV 5 e 8) e os tipos 16, 18, 31, 33 e 45 nas mucosas. Outros tipos são encontrados mais comumente em lesões benignas, como o HPV1 e 2 (pele) e 6, 11 e 42 (mucosas). A infecção de pele e mucosas pelo HPV ocorre através de microlesões existentes na camada basal do tecido (ZUR HAUSEN, 1996; 2002). Ainda, os tipos de HPV são classificados, segundo seu potencial oncogênico, em baixo risco e alto risco de malignidade, segundo estudos clínicos, epidemiológicos e imunológicos (LAZO, 1988; MAJEWSKI, 1997). Têm-se conhecimento até o momento de 100 tipos diferentes de HPVs sequenciados e cerca de 35% não são totalmente caracterizados,

cada qual relacionado com o desenvolvimento de um tipo de lesão em pele ou mucosas (ZUR HAUSEN, 2002).

A transcrição inicia-se a partir de um mesmo promotor em todos os RNAm dos diferentes tipos virais, na região próxima ao gene E6 (ZUR HAUSEN, 2002). Contudo, a transcrição ocorre de maneira diferenciada em determinados tipos celulares, na dependência da interação viral com o genoma da célula hospedeira e o grau de diferenciação do epitélio. Dessa forma, os genes precoces são expressos na camada basal do tecido infectado, e continuam nas linhagens celulares subsequentes, observados em células benignas e malignas. Por sua vez, os genes tardios, L1 e L2, são expressos somente em células queratinizadas, resultando na produção de partículas virais completas e infectantes observados nas verrugas e condilomas (ZUR HAUSEN, 2002). Há dois modos de replicação do HPV, o primeiro ocorre nas células da camada basal do epitélio, onde o genoma viral é distribuído às células filhas, principalmente quando o DNA próviral encontra-se integrado ao genoma da célula hospedeira. A integração do genoma viral garante uma infecção persistente nas células proliferativas das camadas basais, associadas ao maior risco de malignização celular. No segundo, chamado episomal ou vegetativo, a replicação do HPV ocorre nas camadas mais diferenciadas do epitélio e não há a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. Neste caso, são produzidas múltiplas cópias do genoma do vírus, que serão envolvidas pelo capsídeo protéico, formando assim as partículas virais maduras, também denominadas vírions (ZUR HAUSEN, 2002).

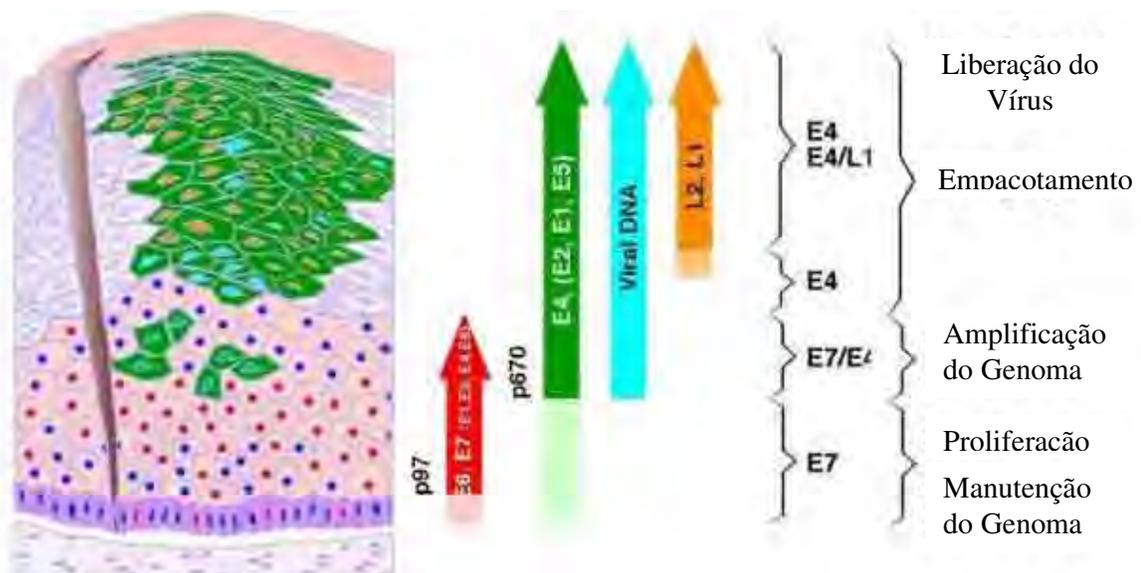


Figura 2 – Ciclo de vida do HPV em relação à diferenciação celular. Em vermelho estão demonstrados os genes de E6 e E7 expressos na camada basal e parabasal e relacionados com a manutenção e proliferação do vírus. Em verde está demonstrada a relação de expressão dos genes E4, E1 e E2 em relação à amplificação do genoma viral nas camadas intermediárias do epitélio infectado. Em azul está demonstrado o DNA viral no interior do núcleo das células intermediárias e superficiais. Em laranja, a expressão dos genes relacionados com o empacotamento do DNA viral na camada superficial. Nas células da camada superficial queratinizadas os vírus são liberados (ZHENG E BAKER, 2006).

HPV E O CÂNCER ORAL

Dessa forma, o HPV vem sendo considerado como um dos agentes etiológicos relevantes e a infecção viral parecem promover o descontrole do ciclo celular no desenvolvimento das lesões bucais. A possível relação do HPV na etiologia do câncer oral foi primeiramente relatada por SYRJANEN (1993) . Muitos trabalhos, desde então, se seguiram e essa associação vem se tornando cada vez mais consistente (MCGLENNEN, 2000; SAND et al., 2000; SCULLY et al., 2000). Estudos realizados no Brasil demonstram a presença de HPV em lesões benignas e malignas de mucosa oral com positividade variando de 15-60%, sendo que a infecção com os tipos de HPV oncogênicos, tais como 16 e 18, tem sido descrita em cerca de 20 a 30 % das lesões orais pré-malignas e neoplásicas (MIGUEL et al., 1998; GIOVANNELLI et al., 2002; SOARES et al., 2002; FREGONESI, et al., 2003; OSTWALD et al., 2003; SOARES et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2003). Lesões malignas ou pré-malignas apresentam maior risco de associação com o vírus, o que sugere que o HPV pode estar envolvido na carcinogênese de mucosa oral (GIOVANNELLI et al., 2002; RITCHIE et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2003).

O envolvimento do HPV com a carcinogênese celular tem sido alvo de diversos estudos, com o objetivo de melhor compreender os fatores virais e celulares responsáveis pelos eventos de transformação maligna (SYRJANEN e SYRJANEN, 1999; MCGLENNEN, 2000; ZUR HAUSEN, 2000). Estudos com HPVs de alto risco permitiram definir a importância do modo de replicação (integrado ou episomal) e a função dos genes precoces E6 e E7 nos eventos de proliferação celular (MUNGER e PHELPS, 1993). Os produtos dos genes E6 e E7 dos HPVs de alto risco codificam proteínas multifuncionais que interferem no crescimento celular, estando diretamente envolvidos nos eventos de transformação celular (TOMMASINO e CRAWFORD, 1995). A ligação da proteína E6 de HPVs de alto risco

resulta na degradação da p53, uma proteína supressora de tumor que determina a parada do ciclo celular para o reparo de danos no DNA genômico. Dessa forma, o complexo gerado por E6/p53 remove o controle p53-dependente do ciclo celular, provocando o aumento de divisão celular, com instabilidade cromossômica e acúmulo de várias mutações na célula infectada (ZUR HAUSEN, 1996). Por outro lado, a ligação da proteína E6 de HPVs de baixo risco à p53 não resulta em sua degradação e portanto não colabora para os eventos de carcinogênese (LI, 1996). Há uma estreita correlação entre a presença do genoma viral de alto risco e mutações na seqüência gênica, também colaborando com a proliferação celular desordenada (SCULLY et al., 2000). Portanto, a inativação de p53 parece representar o fator mais importante na progressão de malignidade, possivelmente por não conseguir impedir diretamente a imortalização e transformação celular.

O aparecimento de tumor ou a persistência de uma infecção viral depende da resposta imunológica do hospedeiro. Uma vez que a partícula viral infecte as células hospedeiras, os linfócitos T citotóxicos (CTLs) reconhecem os peptídeos antigênicos apresentados na superfície das células infectadas associadas às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP).

MOLÉCULAS DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL (CHP) E O CÂNCER

Os genes CHP estão relacionados à rápida rejeição de tecidos transplantados entre animais de experimentação, particularmente entre camundongos. Assim, o CHP representa o conjunto de genes responsáveis por codificar as moléculas de

histocompatibilidade em uma determinada espécie, sendo chamado no ser humano de sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Esses genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6 e reunidos em 3 grupos, denominados genes de classe I, classe II e classe III. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, B e C, os genes de classe II codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-DR, DQ e DP e os genes de classe III, embora estejam incluídos dentro do CHP, não codificam moléculas de histocompatibilidade. Assim, as proteínas C4 e C2 da via clássica e o fator B da via alternativa do complemento, os fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), proteína *heat shock* (HSP 70) e as enzimas 21-hidroxilase são moléculas incluídas na região de classe III (DONADI, 2001) . A Figura 1 representa de modo esquemático os genes do CHP humano.

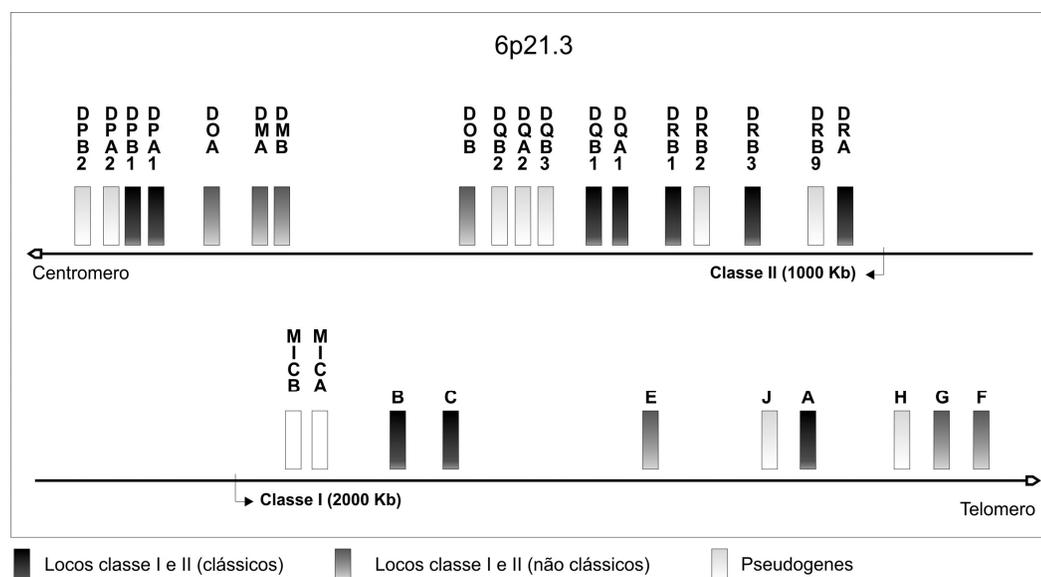


Figura 3 - Representação esquemática do complexo HLA, ilustrando os principais locos de classe I e II. A região de classe III não está representada. (Não estão representados todos os locos existentes no complexo HLA).

O CHP é o conjunto de genes mais polimórfico entre os mamíferos. O entendimento do termo polimorfismo é essencial para a compreensão dos mecanismos de associação com as doenças, da evolução das espécies, e também, para a seleção de doadores em transplantes de órgãos ou células. Alguns genes apresentam uma mesma seqüência de ácidos nucléicos em todos os membros de uma população, sendo chamados não polimórficos (exemplo: β_2 -microglobulina). Assim, se o gene não polimórfico (não relacionado ao sexo) vier do cromossomo materno ou paterno, a proteína sintetizada será basicamente a mesma em todos os membros da população (REYBURN et al., 1997).

Entre os loci HLA-C e HLA-A há muitos genes que são chamados classe *I-like* porque se assemelham aos genes de classe I, mas exibem pouco ou nenhum polimorfismo. Alguns desses genes codificam proteínas que são expressas em associação com a β_2 -microglobulina e são chamadas de moléculas de classe IB, para diferenciá-las das moléculas clássicas polimórficas de classe I. Nesta classe de moléculas IB estão as moléculas HLA-G, HLA-E e HLA-F (ABBAS et al., 2005).

Os peptídeos associados às moléculas codificadas pelo CHP de classe I são produzidos pela degradação proteolítica de proteínas citosólicas, pelo transporte dos peptídeos através de proteínas TAP gerados no retículo endoplasmático, e pela ligação de moléculas de classe I recém sintetizadas (ABBAS, 2005).

O HLA-G é expresso nos tecidos placentários (trofoblastos, macrófagos placentários e células endoteliais) nos quais não há expressão de moléculas clássicas do HLA de classe I e II. Contudo, transcritos de HLA-G foram encontrados em baixos níveis nos olhos, timo, pulmão, coração e rins de fetos e nas células mononucleares do cordão umbilical. Interessantemente, os transcritos não foram encontrados nas células pluripotentes hematopoéticas (KIRSZENBAUM et al., 1995). Moléculas de RNA mensageiro de HLA-G foram também observadas em altos níveis na câmara anterior dos olhos, pele, pulmão e

células mononucleares do sangue periférico de adultos (JURISICOVA et al., 1996). Três receptores das células NK, no mínimo, reconhecem a molécula de HLA-G, são eles: receptor p49, que é membro do grupo KIR (*human killer inhibitory receptor group*) (LOPEZ-BOTET et al., 2000); receptor LIR-1/ILT-2 e receptor ILT-4, membros do grupo LIR (*leukocyte Ig-like receptors*) ou da família ILT (*Ig-like transcript families*) (LE BOUTELLIER , 1999). Ocorre uma interação entre células T CD8⁺ e moléculas de HLA-G, sugerindo que esses linfócitos devem ser ativados para desempenhar funções citotóxicas supressoras (SANDERS et al., 1991).

O HLA-E é expresso em maior número de tecidos do que o HLA-G, sendo também expresso em tecidos placentários, contudo, a expressão em tecidos fetais ocorre principalmente em estágios tardios da gestação, estando diretamente relacionada à proteção fetal. Assim como o HLA-G, o HLA-E está envolvido na regulação de células NK, interagindo com o receptor inibitório CD94/NKG2A. O HLA-E apresenta seqüências líder peptídicas de moléculas clássicas do HLA (-A, -B e -C), por isso sua expressão está relacionada à expressão de moléculas clássicas do HLA (HODGKINSON et al., 2000).

RESPOSTA DE CÉLULAS T E MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS

Diversos modelos animais para infecção pelo HPV têm associado a resposta imune celular à regressão da lesão. Em lesões de alto grau pode haver uma regressão espontânea, que é presumivelmente mediada pela resposta imunológica. No câncer cervical é possível verificar que os linfócitos infiltrantes no tumor são predominantemente linfócitos T citotóxicos, CTLs (WANG, et al., 2003). CLTs específicos contra oncoproteínas do HPV foram identificados no sangue periférico de pacientes com câncer cervical e neoplasias intraepiteliais cervicais, bem como em indivíduos saudáveis infectados pelo HPV 16 (MCDEVITT, 2000). A persistência viral está relacionada à resposta imune do hospedeiro, especialmente na ausência de resposta

linfoproliferativa em resposta à infecção (UNG et al., 1999). A resposta imune do tipo Th1 pode gerar resposta específica dos linfócitos T citotóxicos, contribuindo para a eliminação da infecção e regressão das lesões causadas pelos tipos de HPV de baixo risco (GONCALVES e DONADI, 2004). Embora a resposta linfocitária específica possa ser encontrada no sangue periférico, a presença e a retenção de grande quantidade de linfócitos T citotóxicos são observadas, preferencialmente, no tumor cervical (UNG et al., 1999). Entretanto, a relação entre a resposta imunológica e o *clearance* da infecção viral ainda é pouco entendida. A persistência da infecção pelo HPV ou sua eliminação, associados à regressão das neoplasias intraepiteliais cervicais é ainda pouco compreendida.

As células T expressam diferentes proteínas de membrana, as quais servem como marcadores fenotípicos de diferentes populações linfocitárias e atuam em funções importantes e na ativação da resposta imune celular. As moléculas denominadas CD (*Cluster of Differentiation*) são reconhecidas por um agrupamento de anticorpos monoclonais que podem ser usados para identificar a linhagem ou o estágio de diferenciação dos linfócitos (KERREBIJN et al., 1999). As duas funções mais frequentemente atribuídas aos diferentes antígenos CD são de promover as interações entre as células e sua aderência, e enviar sinais que levem à ativação da resposta imune celular (SUGAMURA et al., 1995).

Os linfócitos T desempenham papéis centrais em todas as respostas imunes adaptativas contra antígenos protéicos. Sendo que na imunidade celular, as células T CD4 ativam macrófagos para destruir microrganismos fagocitados, e os linfócitos T CD8 destroem as células infectadas por microrganismos intracelulares. Os linfócitos T reconhecem os fragmentos de peptídeos derivados de antígenos protéicos associados a moléculas da superfície celular codificadas por genes do CHP (ABBAS, 2005).

As moléculas CD4 e CD8 são proteínas das células T que se ligam às regiões não polimórficas das moléculas de CHP e traduzem sinais que, juntamente com sinais liberados

pelo complexo TCR, iniciam a ativação das células T. Uma vez que as moléculas CD4 e CD8 atuam simultaneamente com o TCR no reconhecimento do Ag, essas moléculas passam a ser conhecidas como co-receptores pois passam a ser efetoras. A segregação de resposta da célula T CD4 e do CD8 a esses diferentes grupos de antígenos é derivada das especificidades do CD4 e CD8 para diferentes classes de moléculas do CHP. O CD4 se liga a moléculas de CHP de classe II e é expresso nas células T cujos TCRs reconhecem os complexos de peptídeos e moléculas de CHP de classe II. A maioria das células T CD4 são restritas à classe II, e produz citocinas e, assim, funciona para a defesa contra microrganismos extracelulares. Já a célula T CD8 é restrita à classe I, células citotóxicas (CTLs), que servem para erradicar infecções por microrganismos intracelulares (ABBAS, 2005). Para ocorrer a expansão clonal específica de células T é necessário um co-estímulo, que vai promover interação e reconhecimento do antígeno específico entre as células apresentadoras de antígeno (APC) e as células T CD4 ou CD8 (JANEWAY, 2002). Quando um microrganismo infecta um indivíduo, as células APCs especializadas se ligam aos antígenos e os transportam para os linfonodos, neste trajeto as APCs amadurecem e se tornam eficientes. Nos linfonodos as APCs apresentam peptídeos derivados de antígenos protéicos, associados à classe II para reconhecimento por linfócitos T CD4. Essa reação estimula as APCs a expressarem altos níveis de co-estimuladores, como proteínas B7-1 e B7-2, as quais fornecem o segundo sinal para a ativação das células T, que secretam citocinas tais como a IL-12 a qual estimula a diferenciação das células T (NORTON et al., 1992; ALLISON e BEST, 1998). Já a ativação das células T CD8 é também iniciada pelo reconhecimento de antígenos em APCs especializadas nos órgãos linfóides periféricos. Assim, as células T CD8 respondem a microrganismos que podem infectar qualquer célula nucleada. É provável que as células dendríticas ingiram células infectadas ou células tumorais e processem e apresentem os antígenos dos microrganismos ou tumores para reconhecimento por linfócitos T CD8, sendo

este processo denominado de apresentação cruzada (ABBAS, 2005). Por isso, a ativação de células T CD8 parece exigir um co-estímulo mais forte que as células T CD4 e sua expansão clonal pode ser auxiliada pelas células T CD4 interagindo com a mesma molécula APC (JANEWAY, 2002).

Uma propriedade geral dos linfócitos T e B *naive* é que eles precisam de dois sinais extracelulares distintos para iniciar sua proliferação e diferenciação em células efetoras. Sendo que o primeiro sinal é fornecido pela ligação do antígeno ao receptor antigênico, e é essencial para garantir a especificidade da resposta imune subsequente. No caso das células T, o reconhecimento do complexo peptídeo-CHP pelo receptor de antígeno das células T (TCR) gera o primeiro sinal para ativação e proporciona a especificidade para a subsequente resposta da célula T (aos co-receptores CD4 e CD8). Já o segundo sinal é gerado por moléculas denominadas co-estimulatórias que para os linfócitos T são proteínas denominadas por B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) que são expressas nas APCs. Os co-estimuladores B7 nas APCs são reconhecidos por meio de receptores específicos nas células T, sendo CD28 e CTLA-4 os mais estudados (ABBAS, 2005). A ligação de B7 ao CD28 promove sinais para a célula T que induzem a expressão de proteínas antiapoptóticas e estimulam a produção de fatores de crescimento e de outras citocinas, promovendo diferenciação e proliferação das células T (DONADI, 2001; GONCALVES e DONADI, 2004). Além do CD28 ser o principal receptor para liberar o segundo sinal para a ativação de células T, o CTLA-4 (CD152) é homólogo ao CD28, mas é expresso nas células T CD4 e T CD8 recentemente ativadas, sendo sua função inibir a ativação das células T através da inibição dos sinais liberados pelo CD28 (ABBAS, 2005).

O CD25 é constituído pela cadeia alfa do receptor para interleucina 2 humana (IL-2), sendo uma cadeia simples de glicoproteína com um peso molecular de 55kDa, também conhecido como subunidade do receptor de IL-2, IL-2R (SUGAMURA, et al., 1995). Depois

da ativação das células T pelo antígeno e na presença de interleucina 1 (IL-1), a IL-2 é rapidamente sintetizada e secretada. Em resposta a esse estímulo, a sub-população de células T expressam receptor de IL-2 de alta afinidade, iniciando uma complexa cascata de sinalização celular (TANAKA et al., 1985). O tratamento com medicamentos moduladores da resposta imunológica, demonstra que a resposta imune ao câncer oral garante a diminuição do tamanho tumoral, resultando na regressão da lesão (FEINMESSER et al., 2004). Entretanto, estudos de resposta imune em câncer oral associado à infecção pelo HPV ainda são escassos.

RESPOSTA IMUNOLÓGICA, HPV E O CÂNCER

Muito do que se sabe sobre a resposta imune associada à infecção pelo HPV tem sido observado em diversos estudos com lesões cervicais e, pouco se sabe sobre a resposta imunológica associada ao HPV em lesões de mucosa bucal. Células infectadas pelos tipos de HPV de alto risco parecem estar modificadas no câncer cervical em relação à resposta humoral e celular efetuadas pelas citocinas IL-10, IL-2, IL-6 e IL-8, TNF-alfa, TGF-beta, configurando um dos mecanismos de evasão da resposta imune mediada por células T (KIM, et al., 1995). Parece que, nos estágios precoces do desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral ocorre uma polarização da expressão de citocinas do padrão Th-1(Interferon gama), enquanto que nos estágios avançados do tumor, com acentuada capacidade metastática, a polarização se desvia para o padrão Th-2 (IL-4 e IL-5) (AGARWAL et al., 2003). Entretanto, todos esses eventos celulares e humorais da resposta imune ao vírus são muito pouco estudados na mucosa oral, em especial no câncer da cavidade oral, necessitando ainda, de uma investigação mais detalhada. Até o momento não foi realizada a avaliação da expressão de moléculas HLA-G e HLA-E em câncer oral e sua relação com a infecção por HPV no tecido bucal.

No Brasil, o câncer oral é um grave e crescente problema de saúde pública e, segundo dados do Ministério da Saúde, ocupa o oitavo lugar entre as neoplasias que acometem o sexo masculino e o décimo lugar para o sexo feminino. Nesse contexto, o câncer de boca assume importância, pois, apesar de ser um carcinoma de fácil diagnóstico e tratamento, com lesões precursoras bem definidas, ainda apresenta grande incidência entre os homens brasileiros. Enquanto as lesões superficiais ou aquelas com baixo potencial invasivo demonstram um excelente prognóstico, as lesões carcinomatosas têm prognóstico pior, exigindo tratamento radical, mutilante, com grave impacto físico e psicológico ao paciente, podendo acarretar o óbito. O desenvolvimento do carcinoma oral em diferentes sítios anatômicos está associado a cofatores distintos. No carcinoma de lábio inferior, a participação da radiação solar como fator de risco está bem estabelecida. Em contrapartida, a etiologia dos carcinomas intrabuciais, principalmente o de língua, é atribuída ao fumo e ao álcool. Entre os fatores de risco associados ao câncer oral, o papilomavírus humano (HPV) vem sendo considerado como um dos agentes etiológicos relevantes no desenvolvimento das lesões bucais. Recentemente, alguns trabalhos demonstraram a ocorrência de HPV de alto risco em 11-80% das lesões pré-malignas e malignas de mucosa oral, associada ao descontrole funcional das proteínas supressoras de tumor e de proliferação. Em contrapartida, a maioria dos tipos de HPV de baixo risco está associada a lesões papilomatosas benignas da mucosa bucal (papilomas, condiloma acuminado, verruga vulgar), as quais apresentam menor potencial de progressão maligna. Entretanto, os mecanismos de carcinogênese induzidos pelo HPV na mucosa oral ainda exigem maiores estudos, em especial no tocante às alterações genéticas e à resposta imune do hospedeiro. As moléculas de histocompatibilidade clássicas e não clássicas participam ativamente da resposta imune contra os tumores. A expressão adequada de moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A,B,C), apresentando peptídeos virais, contribui para a eliminação das células tumorais por intermédio da ação dos linfócitos T citotóxicos.

Em diversas linhagens tumorais, incluindo os carcinomas de mama, próstata, colo de útero, pâncreas, esôfago, cólon, pulmão e melanomas, ocorre uma diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I clássicas, permitindo a evasão das células tumorais ao controle dos linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, o organismo ainda pode recrutar as células natural killer (NK) para eliminar as células tumorais deficientes em moléculas clássicas, deflagrando a ação das células NK por estimulação dos receptores estimulatórios que, então, eliminam as células neoplásicas. No entanto, em alguns tumores, particularmente no câncer de colo uterino (lesão também causada pelo HPV), foi demonstrado um aumento de expressão de moléculas HLA não clássicas (HLA-E), à medida que o tumor progride das lesões de baixo grau para as de alto grau, indicando que essas células tumorais também desenvolveram um mecanismo adicional de escape à ação das células NK. Diversas associações têm sido relatadas entre a presença de alelos/haplótipos HLA e o risco alterado para desenvolvimento de neoplasias. A maior ou menor afinidade de alguns antígenos tumorais com moléculas específicas do complexo HLA, em parte explica a maior ou menor susceptibilidade de pacientes que compartilham as mesmas alterações genéticas ou os mesmos alelos HLA para o desenvolvimento de determinada neoplasia. Assim, acredita-se que a afinidade diferencial de determinada molécula HLA por antígenos específicos das células neoplásicas possa influenciar a posterior resposta imunitária do organismo no sentido de contenção, eliminação ou susceptibilidade ao tumor. Existem pouquíssimos estudos acerca da expressão de moléculas HLA não clássicas nas lesões orais e a expressão de moléculas HLA-G e HLA-E poderia contribuir para a maior susceptibilidade ou persistência da infecção pelo HPV na cavidade oral, assim colaborando para a carcinogênese de mucosa bucal.

Por outro lado, pouco se conhece sobre a relação entre a resposta de células T e a carcinogênese de mucosa oral associada à infecção pelo HPV. Sabe-se que o maior problema da infecção pelo HPV é a possibilidade de persistência da infecção viral, promovendo a

progressão das lesões cervicais para câncer. A impossibilidade de regressão da lesão, bem como a remoção do vírus é atribuída à menor eficiência do sistema imunológico do hospedeiro, impedindo a destruição das células tumorais e/ou infectadas pelo vírus. Aparentemente, a resposta imune ao HPV é principalmente celular, do tipo Th1, em menor proporção o vírus ativa resposta humoral ou do tipo Th2. Assim, a deficiência de resposta celular parece ser a chave para o entendimento da capacidade de escape do HPV frente à resposta imunológica complexa do hospedeiro. Dessa forma, ao entender como as células agem, através da observação da expressão de suas moléculas de superfície, será possível o entendimento do mecanismo viral associado à carcinogênese humana. Conhecendo a resposta de células T, poder-se-á contribuir para os futuros estudos de imunoterapia através da vacina profilática do HPV que possivelmente estará disponível para a população até 2007. Adicionalmente, a presença do HPV nas lesões de cabeça e pescoço e a verificação de particularidades da resposta imunológica nos diferentes sítios anatômicos, poderão contribuir para o planejamento de vacinação para o HPV nesses pacientes.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão de moléculas associadas à resposta imunológica do organismo diante das lesões benignas, pré-malignas e malignas de mucosa bucal associada ou não à infecção pelo HPV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a expressão de moléculas HLA-G e HLA-E e receptores CD4, CD25 e CD28 nas lesões orais em estudo, comparando essa expressão ao diagnóstico histopatológico.
2. Verificar a presença de infecção pelo HPV nas lesões orais em estudo, identificando, através de reação de polimerização em cadeia, os tipos virais mais frequentes na mucosa oral 6/11, 16, 18, 31 e 33.
3. Avaliar a expressão das moléculas de resposta imune nas lesões infectadas pelo HPV e verificar a eventual desregulação dessa resposta imune promovida pelo vírus.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

No presente estudo foram avaliados 79 pacientes, que concordaram em participar (Comitê de Ética HCFMRP processo nº10108/2004), e cujas biópsias de mucosa bucal foram fixadas em formol tamponado e incluídas em parafina, retiradas dos arquivos do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). As biópsias foram selecionadas pelo diagnóstico histopatológico dos cortes corados pela hematoxilina/eosina e classificadas de acordo com critérios histopatológicos propostos por VAN DER WAAL et al. (2000), como hiperplasia fibrosa inflamatória, papiloma de células escamosas, líquen plano, leucoplasias sem e com displasia e carcinoma espinocelular. As lesões foram separadas em três grupos: lesões benignas (hiperplasia fibrosa inflamatória, papiloma de células escamosas), lesões pré-malignas (líquen plano e leucoplasias com e sem displasia) e lesões malignas (carcinoma espinocelular) Para as reações de imunohistoquímica, cortes histológicos de 4µm foram colocados em lâminas previamente silanizadas com organossilano 4 % em acetona (3-aminopropil trietoxissilano – SIGMA, St. Louis, USA). Cortes de 15µm foram colocados em *ependorf* estéril e submetidos aos procedimentos de extração e amplificação por PCR para a detecção e tipagem do HPV.

2. METODOLOGIAS

2.1. Imunohistoquímica (CD4,CD25, CD28, HLA-G e HLA-E)

As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos em baterias de xilol e álcool (Synth-Diadema, SP) para a completa desparafinização. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada tratando as lâminas com 2 banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (v/v), por 15 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, para a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos à fervura em panela à vapor *steam-cuisine* (T-FAL, Industria de Aparelhos Médicos LTDA) imersos em solução de citrato 10mM/pH6,0 (Synth - Diadema, SP), durante 40 minutos, a 95°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada lavagem. A seguir, para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes, 5 minutos cada, e incubadas com leite desnatado 1% por 40 minutos. A diluição dos anticorpos foi estabelecida através de avaliação da positividade em lâmina sabidamente positiva com diferentes concentrações para determinação de melhor título dos anticorpos anti-CD25, anti-CD28, anti- HLA-G e anti-HLA-E. Deste modo, as lâminas foram, novamente, lavadas em PBS e foram adicionados sobre os cortes os anticorpos primários monoclonais anti-CD25 (Santa Cruz, Newcastle, UK), anti-CD28 (Santa Cruz), anti-HLA-G e HLA-E (gentilmente cedido pelo Dr Edgardo D. Carosella, Instituto Universitário de Hematologia e Imunologia, Hospital Saint-Louis, Paris, França) As lâminas foram incubadas a temperatura ambiente, *overnight* em câmara úmida. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram submetidas à lavagem com PBS e incubadas com o anticorpo secundário, biotilado anti-cabra, coelho e camundongo, produzido em porco (LSAB, DAKO) em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada lavagem, e incubadas com complexo Streptavidina- Biotina -Peroxidase (LSAB, DAKO,

Glostrup, Dinamarca), em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, e a reação revelada com incubação dos cortes em solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente, por cinco minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente, contra coradas com hematoxilina de Carrazi por 60 segundos, lavadas novamente em água corrente, desidratadas em baterias de álcool e xilol e montadas em *Permount (Fisher Scientific, CA, USA)*.

2.1.1. Controles

Para controle positivo do marcador CD4, CD25 e CD28 foram utilizados cortes histológicos de Tonsila Humana e para HLA-G e HLA-E, cortes histológicos de trofoblasto Humano. O controle negativo para todos os marcadores foi constituído dos mesmos cortes histológicos utilizados no controle positivo, subtraindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário.

2.1.2. Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica (HLA-G, HLA-E, CD4, CD25, CD28)

As lâminas apresentando marcação positiva de HLA-G, HLA-E (membrana citoplasmática das células epiteliais) e a marcação positiva de CD4, CD25 e CD28 no infiltrato linfocítico das lesões orais foram submetidas à captura de imagens e a posterior avaliação quantitativa da expressão de todos os marcadores foi realizada através de um sistema de análise de imagem. O equipamento para análise de imagem é constituído de um microscópio (OLYMPUS BX50) acoplado a uma câmara colorida (OLYMPUS DP10) e a um

computador, contendo o software (Image Pro Plus, versão 4.1 - Media Cybernetics), do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP). A média de 8 a 10 campos com células marcadas foi selecionada de cada lâmina para a análise quantitativa dos diferentes marcadores. As células positivas foram quantificadas em 1000 células/biópsia, estabelecendo a porcentagem de expressão imunohistoquímica para todos os marcadores selecionados para o presente estudo.

2.1.3. Interpretação da Imunorreatividade (HLA-G, HLA-E, CD4, CD25, CD28)

Para a expressão quantitativa de HLA-G e HLA-E as lesões foram consideradas negativas quando $\leq 25\%$ células neoplásicas possuíam marcação castanha em membrana citoplasmática. Em contrapartida, foram consideradas positivas as lesões orais que apresentaram índice de positividade entre 25 a 75% e alta expressão com valores acima de 75%, segundo proposto por PALMISANO et al., 2002. Foram considerados aumento de expressão de HLA-G e HLA-E a presença de $> 25\%$ a 100% de células neoplásicas com marcação castanha na membrana citoplasmática. A partir da quantificação, as lesões orais foram analisadas segundo a marcação de HLA-G e HLA-E em quatro grupos: expressão aumentada de ambas as moléculas (G+/E+), marcação aumentada em uma molécula e diminuída na outra (G+/E- ou G-/E+) e marcação diminuída em ambas as moléculas (G-/E-). Assim, os resultados de expressão dessas moléculas foram comparadas com o grupo de lesões orais segundo o diagnóstico histológico, bem como em relação à presença do HPV.

Para a expressão quantitativa de CD4, CD25 e CD28, as células presentes no infiltrado linfocítico presente no estroma das lesões orais foram consideradas negativas na ausência de imunocoloração até $\leq 15\%$ de células marcadas. A expressão desses receptores foi considerada positiva na presença de > 15 a 100% de células do infiltrado marcadas

(LADANYI et al., 2004). Após a quantificação, a expressão dos receptores foi subdividida em quatro grupos, de acordo com a diminuição da expressão dessas moléculas: quando os três receptores tinham ausência ou expressão $\leq 15\%$ (CD4/25/28), quando 2 receptores apresentavam ausência ou expressão $\leq 15\%$ (CD4/25, CD4/28, CD25/C28).

2.2. Detecção e tipagem do HPV

2.2.1. Extração de DNA genômico de tecido parafinizado

Para a extração do DNA de tecido parafinizado foram utilizados dois cortes histológicos com espessura de 10 μm e, a extração foi realizada segundo proposto por BETTINI et al., (2003) e modificado neste estudo. Os cortes histológicos foram transferidos para *ependorf* estéril, e foi adicionado 1000 μL de xilol absoluto em cada tubo. O tecido parafinizado contendo xilol foi homogeneizado por inversão e incubado em Banho Maria a 65°C, por 10 min, seguido de centrifugação 4000 g, 4°C por 2 min. O sobrenadante é descartado e esse procedimento foi repetido por 4 a 5 vezes para retirada completa da parafina. Na última centrifugação, o sobrenadante foi removido, adicionando 700 μl de xilol absoluto e 300 μl de etanol absoluto, e em seguida a amostra foi homogeneizada, centrifugado a 4000 g, 4°C por 2 min e novamente o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado ao sedimento, 500 μl de xilol e 500 μl de etanol absoluto, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Novamente, foi adicionado 300 μl de xilol e 700 μl de etanol absoluto. Na seqüência, 1000 μl de etanol absoluto foi acrescido ao sedimento, centrifugando e novamente descartando o sobrenadante. No sedimento obtido foi adicionado 1000 μl de tampão de lise Tris-HCL 10Mm, pH 8,5 (2,5mM MgCl₂, 50mM KCl, Nonidet P-40 1% e

Tween1%). Em seguida os tubos foram homogeneizados, centrifugados a 4000 g, por 2 min e o sobrenadante descartado. Novamente, o sedimento obtido foi ressuspenso com 1000µl de tampão de lise Tris-HCl 10mM (pH 8,5) e 10µl de proteinase K (10mg/ml) e incubado em Banho Maria a 65°C por 2h. Após o período de incubação, os tubos foram submetidos à temperatura de 94°C por 10 min, objetivando a inativação da proteinase K. O DNA extraído foi acondicionado a -20°C até o momento dos experimentos de amplificação para a detecção do HPV.

2.2.2. Amplificação do HPV (região consenso) e de Beta-globina

Após a extração, o DNA obtido dos tecidos parafinados foi submetido à amplificação pela reação da polimerase em cadeia (PCR) para verificar a presença de DNA (gene da Beta-globina) nas amostras e para detectar e tipificar o HPV (GP5+/6+ e HPV tipo específico). Considerando que os DNA extraídos de tecidos fixados e incluídos em parafina apresentam-se fragmentados, a estratégia de amplificação deve considerar a utilização de iniciadores para fragmentos de DNA com no máximo 200 pares de bases (pb). Todas as reações foram realizadas no termociclador *Biocycler*.

A amplificação do gene da Beta-globina (β -globina) foi utilizada para avaliar a integridade do DNA genômico pós-extração, e como um controle interno da amplificação. Os iniciadores aqui utilizados PCO3 e PCO4 (PCO3+ CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC e PCO4+ TCA CCA CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC) amplificam um fragmento de 100 pares de bases (pb). A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: 0,20mM de dNTP, 0,1uM de cada iniciador, 1.25U/uL Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1X (Invitrogen), 2µg de DNA genômico, e água destilada deionizada para um volume final de 25 µL. Os ciclos da reação foram estabelecidos segundo

MORALES et al,(1993) e modificados posteriormente nas etapas de padronização A mistura de reação foi amplificada pelo programa de 1 ciclo de 94°C por 7 min, 35 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 1 min e 1 ciclo de 72°C por 10 min.

Para detectar a presença do DNA do HPV nas amostras analisadas, foram utilizados os iniciadores GP5+ e GP6+(MANOS et al., 1989) que amplificam um fragmento de 142 pb da região L1 comum a todos os tipos de HPV. A reação de PCR foi realizada segundo o protocolo modificado de BETTINI et al., (2003), utilizando-se 0,20mM de dNTP, 0,60uM de cada iniciador, 1,25U/uL Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1,4 x (Invitrogen), 2µg de DNA genômico e água deionizada para um volume final de 25 µL. O DNA das amostras foi amplificado em termociclador de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 min, 37 ciclos de 94°C por 30s, 45°C por 45 s e 72°C por 1 min e finalmente 1 ciclo de 72°C por 10 min. Como a quantidade de DNA viral presente na amostra é pouca em relação ao DNA humano e a qualidade do DNA extraído de fragmentos parafinizados com xilol e álcool é baixa, foram necessários 2 reações de PCR (nested PCR) sob as mesmas condições da primeira para permitir a visualização dos produtos amplificados nos géis de poliacrilamida 10%. A segunda PCR foi realizada sob as mesmas condições de primeira, substituindo-se o DNA genômico por 1µL de DNA amplificado na primeira reação.

A tipagem dos HPVs 6, 11, 16, 18, 31 e 33 foi realizada em todas as amostras positivas para GP5+/GP5+, segundo protocolo descrito e modificado por Walboomers et al., (1999). Para os procedimentos de amplificação e identificação dos tipos de HPV um volume final de reação de 25 µl foi utilizado, numa mistura da reação que incluía 20 ng de DNA genômico, 0,020 mM de deoxinucleosideo trifosfato (*Pharmacia, Uppsala, Sweden*), 0.6 µM de primer (IDT, IA, USA), 1,25 U Taq polimerase, 3 mM MgCl₂, and 1x buffer (Invitrogen, Brasil). As condições dos ciclos de amplificação foram: desnaturação de 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1min, and 72°C por 1 min e a extensão por

1 ciclo de 72 °C por 10 min. Para a amplificação do HPV11 a temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C. A observação de todos os produtos amplificados foi feita em gel de poliacrilamida 10%, submetido à eletroforese a 250 volts por 1 hora e 30 minutos e corado com nitrato de prata (SANGUINETI, 1994).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando que os dados apresentaram distribuição Gaussiana no teste de normalidade, a análise estatística da expressão imunohistoquímica quantitativa de HLA-G e HLA-E em relação ao diagnóstico histopatológico e à infecção viral foi realizada através do teste paramétrico de análise de variância (One Way ANOVA) com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni para avaliação de significância entre o grupo. Análise de correlação entre a expressão quantitativa de HLA-G e HLA-E em lesões infectadas por HPV foi realizada pelo teste de correlação linear de Pearson. Para a avaliação da associação entre HLA-G e HLA-E, segundo a maior ou menor expressão imunohistoquímica, em relação ao diagnóstico histológico das lesões e à infecção pelo HPV foram utilizados, respectivamente, o qui quadrado para testes independentes e o teste exato de Fisher. Os dados de expressão de CD4, CD25 e CD28 não passaram no teste de normalidade e, portanto, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunnet para múltiplas comparações entre a expressão quantitativa desses receptores em relação ao diagnóstico das lesões orais bem como a análise de correlação da expressão qualitativa das moléculas CD25 e CD28 em relação ao diagnóstico histológico das lesões orais e à infecção pelo HPV. Teste exato de Fisher foi aplicado na comparação entre a expressão de CD25 e CD28 e o diagnóstico histológico e a presença de HPV. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados estatísticos foram avaliados pelo *software InStat Mac 2.01 (GraphPad software, San Diego, CA, USA)*.

1- EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MOLÉCULAS NÃO CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM LESÕES DE MUCOSA ORAL ASSOCIADAS A INFECÇÃO PELO HPV

Os resultados da avaliação da expressão imunohistoquímica quantitativa de HLA-G e HLA-E em relação ao diagnóstico histológico e a infecção pelo HPV estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 a 3. Na Tabela 1 está demonstrada a detecção do HPV e o diagnóstico histológico das lesões de cavidade oral dos 51 pacientes. Das 51 lesões orais 24 (47%) foram infectadas pelo HPV, dessas 11 (47%) faziam parte do grupo das 18 lesões benignas, 8 (47%) foram das 16 lesões pré malignas e 5 (28%) foram das 17 lesões de carcinoma de células escamosas (OSCC). No grupo das lesões benignas infectadas pelo HPV, 8 (44%) foram diagnosticadas como Hiperplasia oral, sendo que 5 (42%) estavam infectadas com HPV18, 1 (8%) estava infectada com HPV11 e 1 (8%) estava infectada com um tipo não identificado (NI) pelos primers propostos neste estudo. Assim, das 18 lesões benignas infectadas pelo HPV, 3 (17%) foram Papiloma escamoso oral, sendo que 2 (11%) estavam infectadas pelos tipos HPV18/31/6 e 1 (6%) por um tipo NI pelos primers propostos neste estudo. No grupo das lesões pré malignas infectadas pelo HPV, 4 (25%) das 16 pré malignas eram Líquen plano, sendo que 1 (6%) estava infectada pelo HPV18, 1 (6%) estava infectada pelos tipos de HPV 18/6/11 e 1 (6%) por um tipo NI pelos primers propostos neste estudo. Ainda no grupo das lesões pré malignas 4 (25%) foi diagnosticada como Leucoplasia com displasia severa, sendo 2 (13%) infectadas pelo HPV18 e 2 (13%) infectadas por um tipo NI pelos primers propostos neste estudo. Finalmente, dos Carcinomas de células escamosas (OSCC) infectados pelo HPV, 2 (12%) dos 17 diagnosticados como OSCC foram HPV18, 1 (6%) foi HPV18/31/6 e 1 (6%) foi do tipo NI pelos primers propostos neste estudo. Não foi encontrado nenhum HPV16 em todas as lesões avaliadas neste estudo.

Na Tabela 2 e Figura 1 a 3 está demonstrada a expressão imunohistoquímica quantitativa comparadas com os grupos das lesões orais. A expressão de HLA-G e HLA-E foi classificada como alta expressão de ambas as moléculas (G+/E+), alta e baixa expressão (G+/E-) ou (G-/E+) e baixa expressão de HLA-G e HLA-E (G-/E-). A Tabela 2 demonstra a desregulação de HLA-G e HLA-E (G+/E+, G+/E-, G-/E+), sendo verificado em lesões benignas e pré malignas, enquanto nas lesões malignas (OSCC) não foi encontrada expressão. (Tabela 2, P = 0,007).A associação foi encontrada entre as lesões infectadas pelo HPV e a desregulação de HLA-G e HLA-E (P = 0,0025). A desregulação das moléculas não clássicas foi verificada com maior frequência nas lesões orais infectadas pelo HPV18 e nas lesões infectadas com dois ou três tipos de HPV. A análise quantitativa da expressão de HLA-G e HLA-E (Figura 1), demonstra que a alta expressão de HLA-G foi predominante nas lesões benignas e decrescentes nas lesões orais pré malignas e malignas (P=0,0196). Em contraste, não foi observado diferença significativa entre as lesões orais benignas, pré malignas e malignas e a expressão do HLA-E. Interessantemente, houve uma correlação inversa (Figura 2; $r = - 0,3944$; P = 0,0462) observada entre a alta expressão de HLA-G e a baixa expressão de HLA-E nas lesões infectadas pelo HPV, o que poderia indicar que a desregulação de HLA-G e HLA-E pode estar mais relacionada com a infecção pelo HPV do que com a atipia celular e o câncer.

Tabela 1 – Expressão das moléculas não clássicas e detecção do DNA HPV em 51 pacientes com lesões orais de acordo com diagnóstico histopatológico de lesões benignas (Hiperplasia e papiloma) pré malignas (líquen plano, leucoplasia com e sem displasia) e malignas (OSCC).

	HPV Positivo	HPV Negativo	HPV11	HPV18	HPV18/31/6	HPV18/6	NI
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)	n (%)
Benigna (n=18)	11(58)	7 (37)	1 (5)	5 (26)	2 (11)	0	3 (16)
Pre maligna (n=16)	8 (47)	8 (47)	0	4 (24)	0	1 (6)	3 (18)
Maligna (n=17)	5 (28)	12 (67)	0	2 (11)	2 (11)	0	1 (6)
Total	24(47)	27 (53)	1 (4)	11 (46)	4 (17)	1 (4)	7 (29)

NI = HVP não identificado; OSCC = carcinoma célula escamosa.

Tabela 2 - Expressão imunohistoquímica quantitativa das moléculas HLA-G and HLA-E de 51 pacientes com lesões orais de acordo com diagnóstico histopatológico de lesões benignas (Hiperplasia e papiloma), pre malignas (liquen plano, leucoplasia com e sem displasia) e malignas (OSCC).

	G(+)/E(+)	G(-)/E(-)	G(+)/E(-)	G(-)/E(+)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n
Benigna ^(a)	4 (21)	2 (11)	10 (53)	2 (11)	18
Pre maligna	1 (12)	1 (6)	8 (47)	6 (35)	16
Maligna	3 (17)	8 (44)	4 (22)	2 (11)	17
Total n(%)	8 (16)	11 (22)	22 (43%)	10 (20)	51
HPV Positivo ^(b)	5(21)	0	14(58)	5(21)	24
HPV Negativo	3(11)	11(41)	8(30)	5(19)	27
HPV 11	0	0	1(100)	0	1
HPV18	4(36)	0	4(36)	3 (36)	11
HPV18/31/6	0	0	4(100)	0	4
HPV18/6	0	0	1 (100)	0	1
NI	1(14)	0	5 (71)	1(14)	7

HLA-G(+) and HLA-E(+) = $\geq 25\%$ células marcadas, HLA-G (-) e HLA-E(-) = $<25\%$ de células marcadas.

OSCC = carcinoma espino celular.

(a) HLA- G e HLA-E expressão versus lesões orais. Qui quadrado, P = 0.007.

(b) HLA- G and HLA-E expressão versus infecção. Fisher's Exact Test, P = 0.0025.

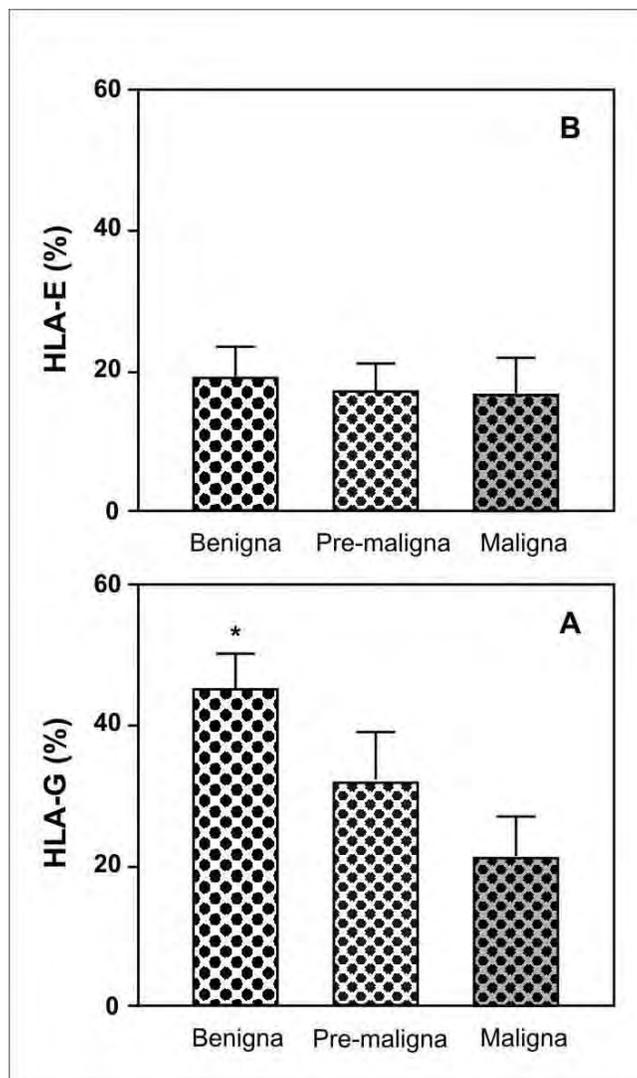


Figura 1: Expressão quantitativa de moléculas não clássicas (HLA-G e HLA-E) nas 51 lesões orais classificadas como benignas (hiperplasia e papiloma), pré malignas (líquen plano e leucoplasia) e malignas (carcinoma espinocelular). A) Expressão quantitativa de HLA-G, ANOVA ($P=0.0196$) com pós teste de comparação múltipla de Bonferroni(*) nas lesões benignas versus malignas; $p<0.05$. B) Expressão quantitativa de HLA-E, ANOVA ($P = 0.9024$).

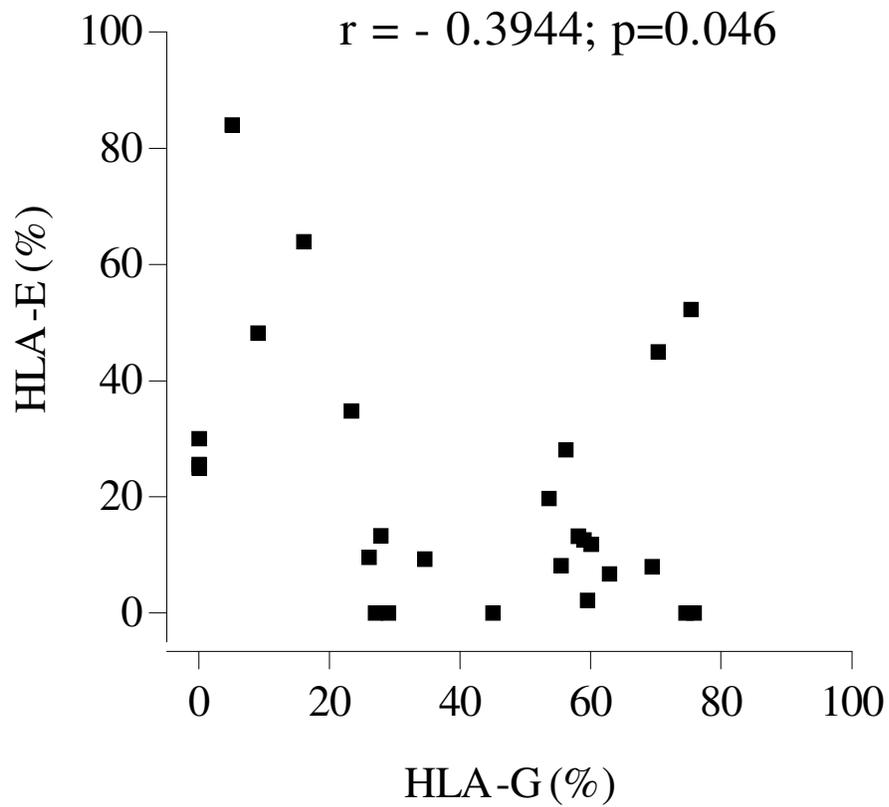


Figura 2 – Correlação de Pearson entre a expressão quantitativa de HLA-G e HLA-E em lesões orais infectas pelo Papilomavírus Humano. $r = -0.3944$; $P = 0.0462$.

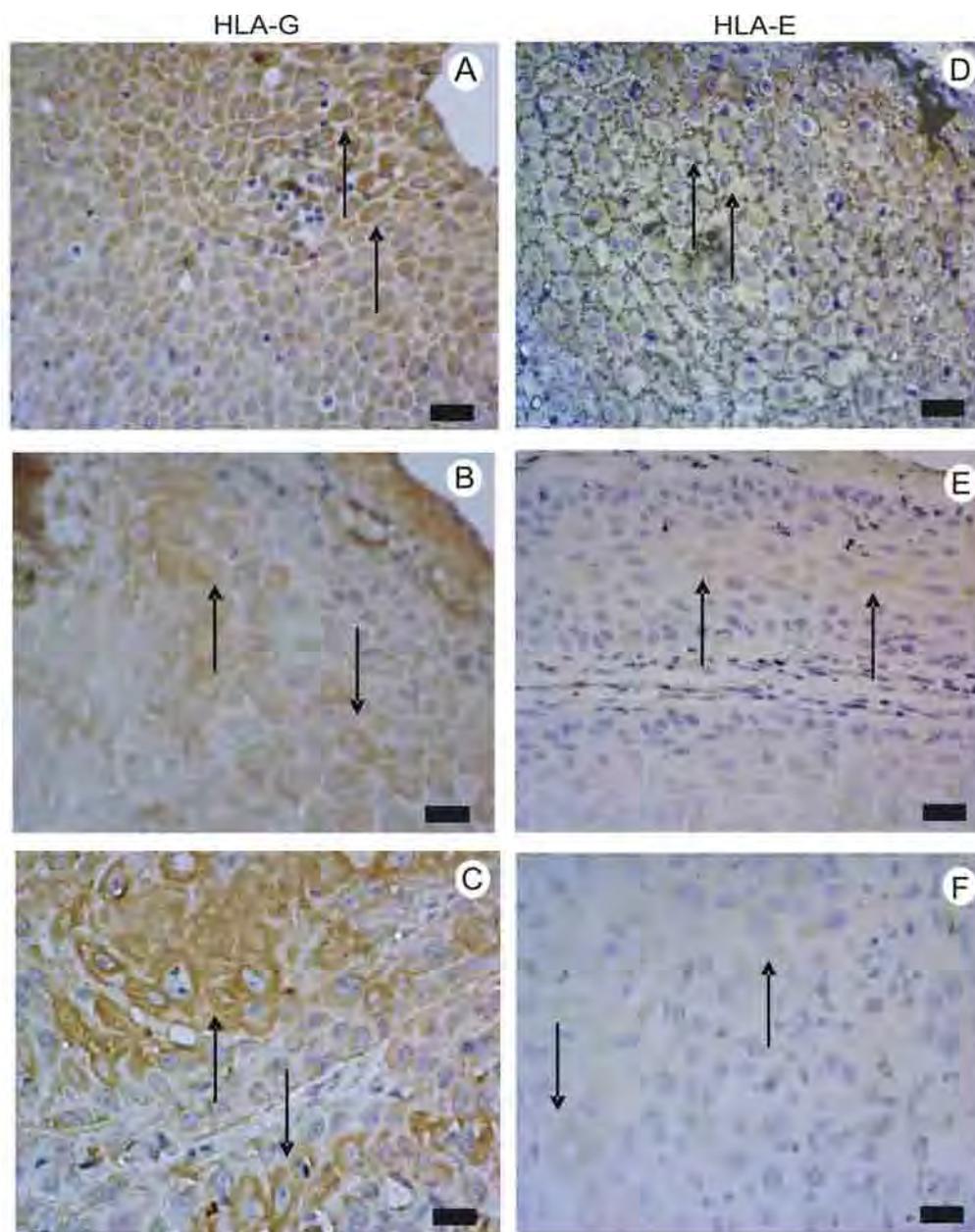


Figura 3- Reação de imunoperoxidase para HLA-G e HLA-E com marcação castanha no citoplasma (setas) em lesões de cavidade oral infectadas por HPV. A) Expressão de HLA-G em Hiperplasia Fibrosa apresentando intensa marcação citoplasmática; B) Expressão de HLA-G em leucoplasia sem displasia com marcação citoplasmática de moderada intensidade; C) Expressão de HLA-G em Carcinoma espinocelular com intensa marcação citoplasmática; D) Expressão de HLA-E em Hiperplasia Fibrosa apresentando marcação citoplasmática discreta; E) Expressão de HLA-E em leucoplasia sem displasia com marcação citoplasmática de intensidade discreta; F) Expressão de HLA-E em Carcinoma espinocelular com marcação discreta. Barra de escala = 25 μ m.

2- EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES CD4, CD25 E CD28 EM LESÕES DE MUCOSA ORAL INFECTADAS PELO HPV

Considerando todas as lesões orais analisadas, foi detectado DNA de HPV em 30 das 79 (38%) pesquisadas, sendo 12 das 31 (40%) foram lesões benignas, 13 das 25 (43%) eram pré malignas e 5 das 23 (17%) eram carcinomas de células escamosas (OSCC). De todas as lesões benignas infectadas com HPV, 8 (67%) foram diagnosticadas como Hiperplasia oral, sendo que 5 (42%) foram HPV18, 1 (8%) foi HPV11 e 2 (17%) do tipo de HPV não identificado pelos primers utilizados neste estudo. Ainda nas lesões benignas, 4 de 12 (33%) foram Papiloma escamoso oral, das quais 2 (17%) tiveram infecção tripla por HPV (HPV18/31/6) e 2 (17%) apresentaram o tipo de HPV não identificado pelos primers utilizados neste estudo. Nas lesões pré malignas infectadas pelo HPV, 3 das 13 (23%) foram Líquen Plano, sendo HPV18, HPV18/31/6 e 1 tipo não foi identificado pelos primers deste estudo respectivamente. Nas lesões pré malignas, 2 (15%) foram Leucoplasia sem displasia e 7 (54%) foram Leucoplasia com displasia discreta a severa. Nas Leucoplasias sem displasias foram encontrados os tipos de HPV18, HPV18/31/6 e HPV31/6 sendo um caso de cada tipo. Em contraste, nas Leucoplasias com displasia 1 (8%) foi HPV18 e 2 (15%) foi HPV18/31/6 e 4 casos (31%) de HPV não identificado. Finalmente, os OSCC infectados com HPV, 2 de 5 (40%) foi HPV18, 1 (20%) foi HPV31/6, 1(20%) foi HPV18/31/6 e 1(20%) foi de HPV não identificado. O HPV 16 não foi encontrado nas lesões avaliadas neste estudo (Tabela 1).

Embora, um pequeno número de macrófagos e células dendríticas foi marcado pelos receptores CD4 e CD25, sendo que a maioria das células marcadas por estes receptores foram os linfócitos (Figura 2). A comparação da expressão quantitativa de CD4, CD25 e CD28 nas lesões orais foi representada de acordo com a expressão nas três moléculas, na combinação de 2 moléculas e pela análise de apenas uma molécula, demonstrada na Tabela 2 e Figura 1. Outra vez, nas lesões orais que exibiu baixa ou ausência de expressão imunohistoquímica

destas moléculas (<15% de células marcadas). Considerando a expressão das três moléculas nos mesmos pacientes, obteve-se ausência ou baixa expressão nas lesões benignas, pré malignas e malignas tanto quanto o aumento da progressão da lesão e da coexpressão destas moléculas. Quando foi considerado a combinação de CD4/CD25 e CD4/CD28 a ausência ou baixa a expressão destas moléculas nas lesões benignas e pré malignas estava aumentada(Tabela 2). Quando a expressão destas moléculas foi considerada individualmente, a expressão de CD4 diminuída foi significativa em pacientes que apresentavam lesões malignas quando comparados com pacientes com lesões benignas e pré malignas ($p<0.005$). A expressão de CD25 foi similar em todas as lesões. A expressão de CD28 foi significativa em lesões malignas quando comparadas com lesões benignas e pré malignas ($p<0.001$). (Figura 1). Quando a expressão das moléculas CD4, CD25 e CD28 em várias combinações foram associadas com a presença ou não da infecção pelo HPV não foi observada diferença estatística significativa (Tabela 3).Contudo, pacientes infectados pelo HPV18 não exibiram diferença estatística significativa na diminuição da expressão destas moléculas relacionadas com pacientes com outros tipos de HPV.

Tabela 1 – Detecção de DNA de HPV observado em 79 lesões de acordo com diagnóstico histológico em benignas (hiperplasia e papiloma), pré-malignas (líquen plano, leucoplasia com ou sem displasia) e malignas (carcinoma espinocelular).

	HPV	HPV	HPV18	HPV18/31/6	HPV31/6	HPV6/11	NI	Total
	Positivo	Negativo						
	N (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n(%)	N(%)
Benigna (n=31)	12 (40)	19 (39)	5 (17)	2 (7)	0	2 (3)	3(10)	12 (40)
Premaligna(n=25)	13 (43)	12 (24)	3 (10)	4 (13)	1 (3)	0	5(17)	13 (43)
Maligna (n=23)	5 (17)	18 (37)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0	1(3)	5 (17)
Total (n=79)	30 (38)	49 (62)	10 (33)	7 (23)	2 (6)	2 (6)	9(30)	79(100)

NI = tipo de HPV não identificado

Tabela 2 – Ausência ou baixa expressão imunohistoquímica (índice de positividade=<15%) de moléculas CD4, CD25 and CD28 observadas em 79 lesões orais, classificadas de acordo com o diagnóstico histopatológico em benignas(hiperplasia e papiloma), pré-malignas (líquen plano, leucoplasia com e sem displasia) e malignas (carcinoma espinocelular).

	CD4/25/28	CD4/CD25	CD4/CD28	CD25/CD28
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Benigna (n=31)	18 (58)	4 (13)	3 (10)	3 (10)
Pre maligna (n=25)	12 (48)	3 (12)	1 (4)	4 (16)
Maligna (n=23)	7 (30)	12 (52)	1 (4)	2 (9)
Total (n=79)	37 (47)	19 (24)	4 (5)	9 (11)

Qui-Quadrado por inpedância, P=0.0347

NI = tipo de HPV não identificado

Tabela 3 – Ausência e baixa expressão imunohistoquímica (índice de positividade=<15%) das moléculas CD4, CD25 and CD28 molecules observadas em 79 lesões orais classificadas de acordo com as lesões orais com a presença ou não de algum tipo de HPV.

	CD4/25/28	CD4/CD25	CD4/CD28	CD25/CD28	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
HPV positivo (n=30)	13 (43)	4 (13)	2 (7)	4 (13)	23 (77)
HPV negativo (n=49)	12 (24)	4 (8)	1 (2)	3 (6)	20 (41)
HPV 18 (n=8)	3	1	1	2	7 (88)
HPV 18/31/33 (n=5)	3	0	0	0	3 (60)
HPV 31/6 (n=2)	1	1	0	0	2 (100)
HPV 6 (n=1)	1	0	0	0	1 (100)
NI (n=10)	6	2	0	2	9 (90)

Qui-Quadrado por inpedância, $P < 0.0001$

NI = tipo de HPV não identificado

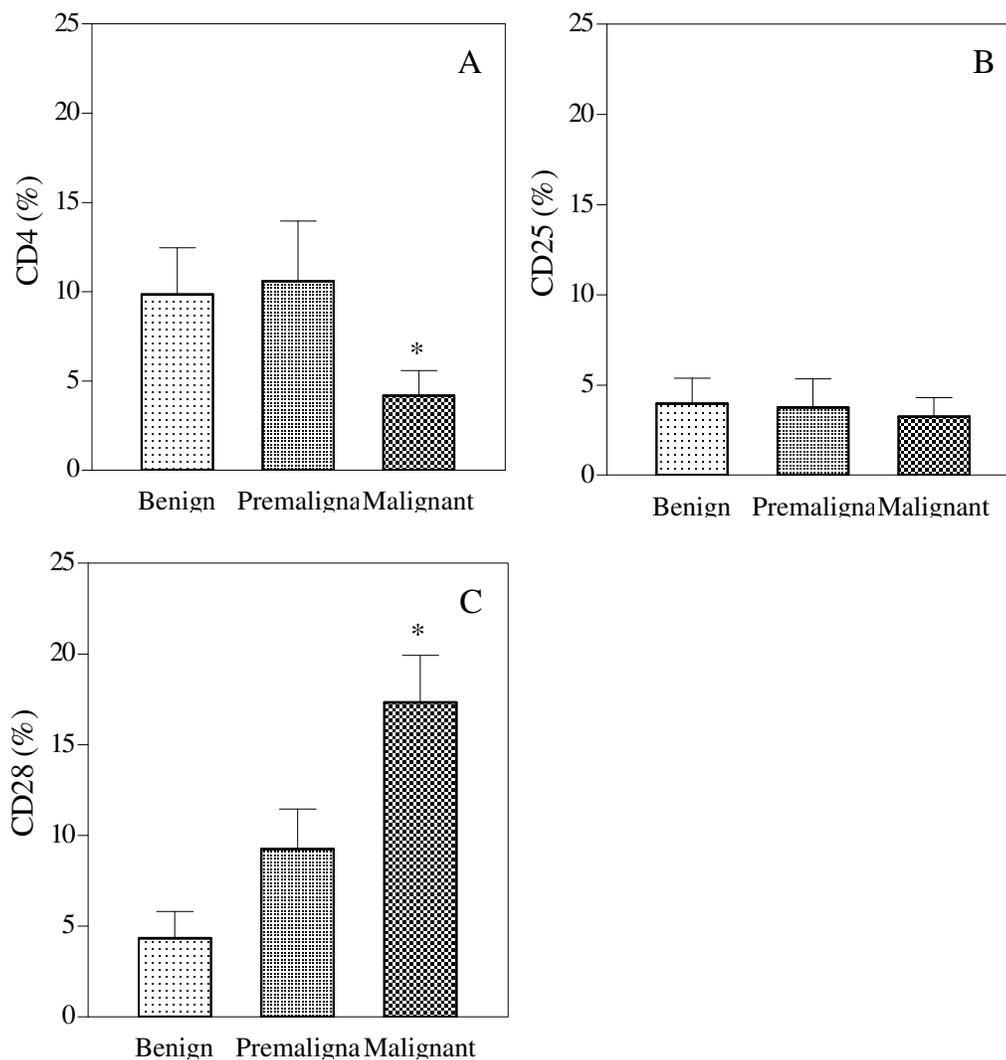


Figura 1- Expressão imunohistoquímica quantitativa de CD4,CD25 e CD28 através do sistema de análise de imagem observada nas 79 lesões orais classificadas de acordo com o diagnóstico histológico em lesões benignas (n=31) (hiperplasia e papiloma), pré-malignas (n=25) (líquen plano, leucoplasia com e sem displasia) e malignas (n=23) (carcinoma espinocelular). * P<0.005; Pós teste de Dunn's comparação entre lesões benignas e malignas, p<0.001.

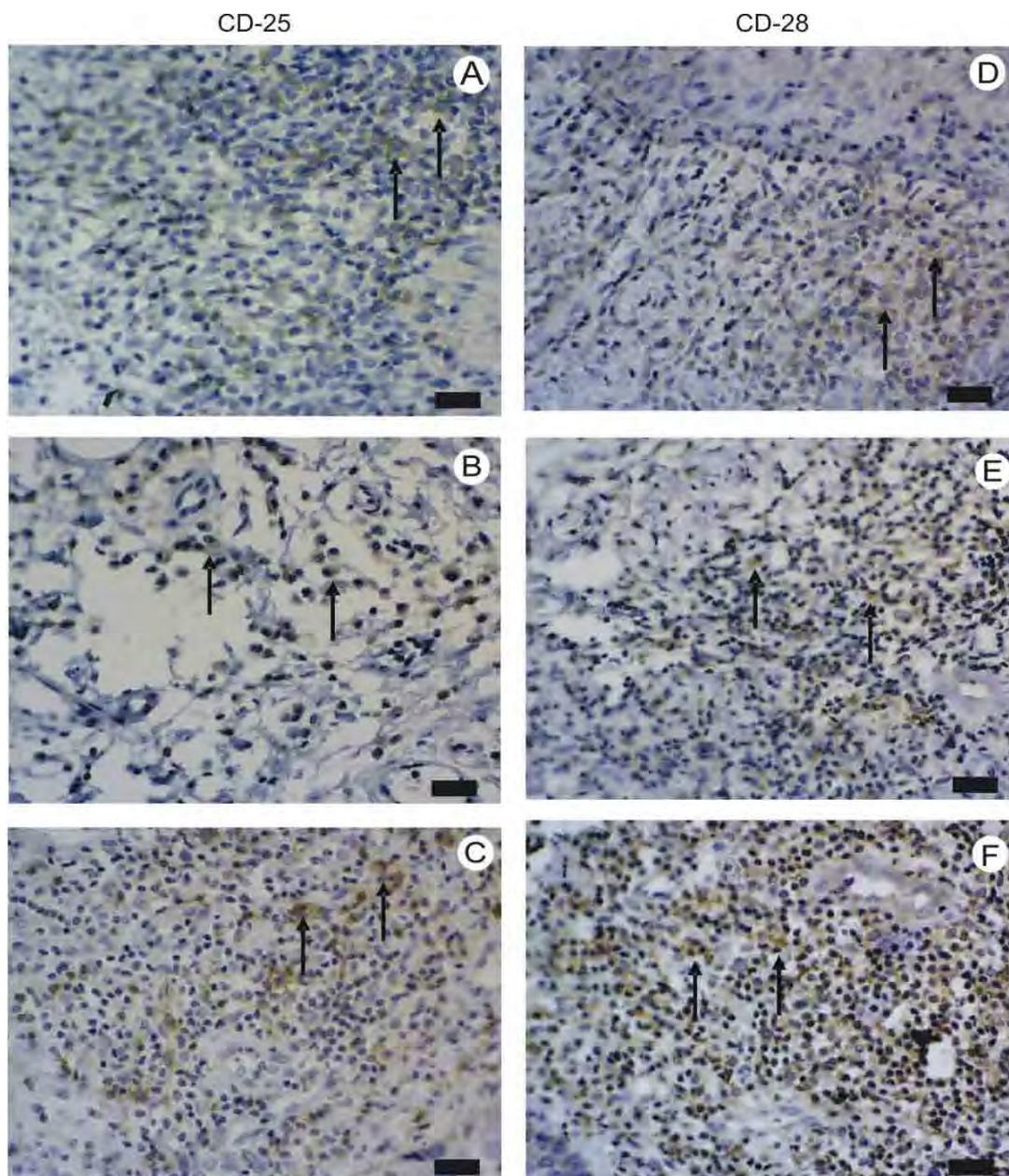


Figura 2 – Reação de imunoperoxidase para CD25 e CD28 no infiltrado inflamatório de lesões de cavidade oral infectadas por HPV com marcação castanha nas células inflamatórias (setas). A) Expressão de CD25 em Hiperplasia Fibrosa com intensidade moderada; B) Expressão de CD25 em Leucoplasia sem displasia com intensidade discreta; C) Expressão de CD25 em Carcinoma espinocelular com intensa marcação; D) Expressão de CD28 em Hiperplasia Fibrosa com intensidade discreta; E) Expressão de CD28 em Leucoplasia sem displasia com intensidade moderada; F) Expressão de CD28 em Carcinoma espinocelular com intensa marcação. Barra de escala = 25 μ m.

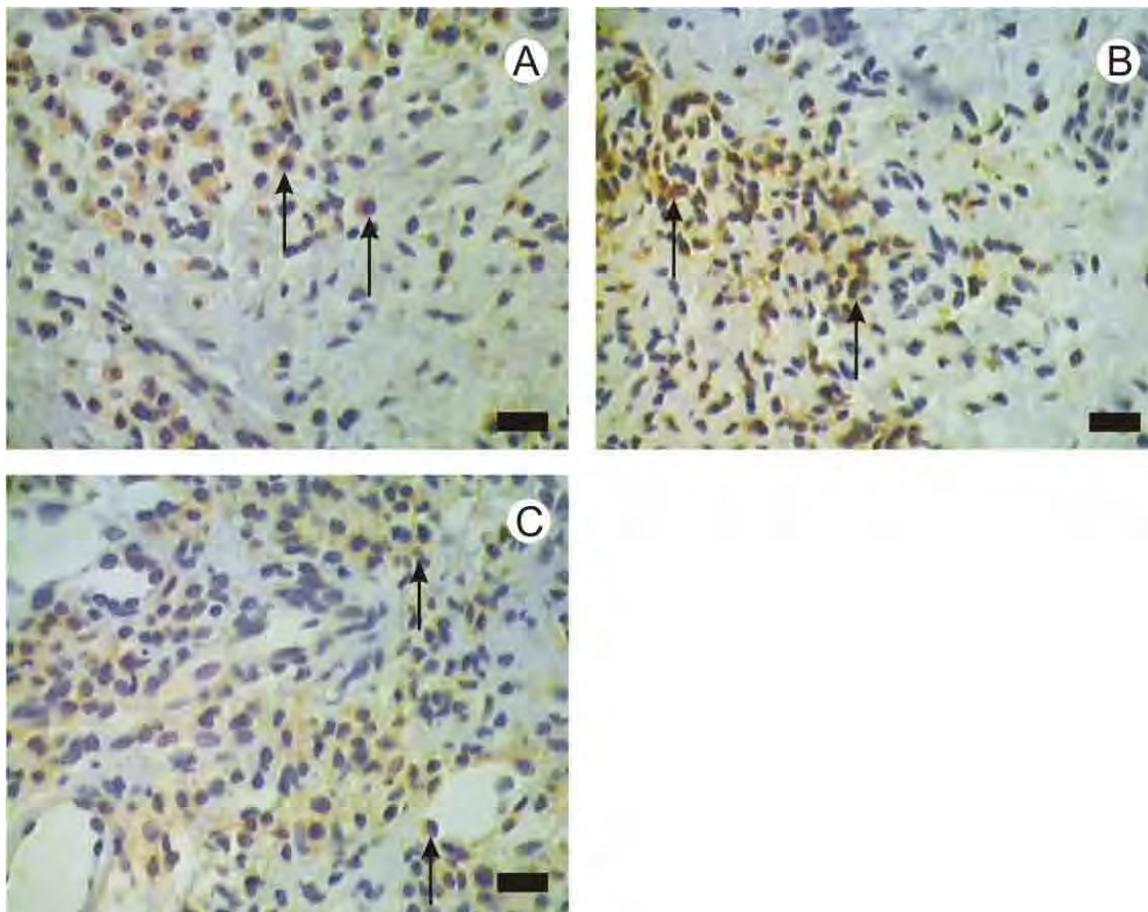


Figure3 - Expressão imunohistoquímica de moléculas CD4 no infiltrado linfocitário de lesões infectadas por DNA HPV, de acordo com o diagnóstico histológico. A) Hiperplasia oral (Moderada) B) Leucoplasia com displasia (Intensa) e C) Carcinoma espinocelular (Moderado). Barra de escala = 25 μ m.

Os tipos de HPV de alto risco são agora reconhecidos como um potencial fator de risco para a carcinogênese oral (HA e CALIFANO, 2004). No presente estudo, a infecção pelo HPV foi encontrada em 38% das lesões de mucosa oral. A presença do DNA do HPV é encontrada em proporções muito variadas em diversos estudos, com frequência média de 20 a 30% (D’COSTA et al., 1998; MIGUEL et al., 1998, SOARES et al., 2003). Estudos anteriormente realizados em nosso laboratório demonstraram a presença de HPV em lesões benignas e malignas de mucosa oral com positividade variando de 33 até 60% (SOARES et al., 2000; SOARES et al., 2002; FREGONESI et al., 2003; SOARES et al., 2003). A presença do vírus na mucosa oral pode contribuir para a carcinogênese por fatores combinados. A somatória de eventos como infecção pelo HPV, deficiências imunológicas e co-carcinógenos químicos ou físicos favorecem o desenvolvimento do câncer oral (LLEWELLYN et al., 2001; MILLER e JOHNSTONE, 2001). A associação entre câncer e infecção pelo HPV no epitélio do trato genital masculino e feminino já é bem conhecida. Entretanto, o estudo do papel do HPV em mucosa oral, relacionado com proliferações benignas ou malignas é um tema que merece ser mais investigado. A possível relação do HPV na etiologia do câncer oral foi primeiramente relatada por SYRJANEN (1993). Muitos trabalhos desde então se seguiram e essa hipótese vem se tornando cada vez mais consistente (MUNGER e PHELPS, 1993; MCGLENNEN, 2000; SAND et al., 2000; SCULLY et al., 2000). Nesse estudo foi observada alta frequência dos tipos de HPV de alto risco em lesões benignas e pré-malignas e, embora prévios estudos tenham associado esses tipos de HPV ao câncer oral (SAND et al., 2000; FREGONESI et al., 2003), foi pequena a frequência do DNA do HPV nos casos de câncer oral (17%). Os mesmos tipos virais, e mais proeminentemente o HPV 18, têm sido encontrados em câncer de laringe, orofaringe e língua (DE VILLIERS, 1997). No total, 16 tipos de HPV (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 57) já foram isolados de lesões orais (CHANG, et al., 1993; MILLER, 1994). A maioria dos tipos HPVs de baixo risco

(6, 11, 13 e 32) estão associados a lesões papilomatosas benignas da mucosa oral (papilomas, condiloma acuminado, verruga vulgar) e apresentam pequeno potencial de progressão maligna. Em contraste, os genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35) têm potencial de malignidade aumentado e estão freqüentemente associados às displasias epiteliais e carcinoma de células escamosas orais (LAKSHMI et al., 1993; SAND et al., 2000). Dessa forma, os tipos de HPVs que eram considerados exclusivos do trato anogenital estão sendo encontrados nos tecidos de revestimento bucal, o que torna este vírus um importante agente etiológico no desenvolvimento do câncer (CHANG, SYRJANEN et al., 1993; MIGUEL et al., 1998). Nas lesões orais benignas avaliadas no presente estudo, foi observada uma alta prevalência de tipos de HPV oncogênicos, sugerindo que a infecção pelo HPV ocorra em estágios precoces de desenvolvimento das lesões proliferativas de cavidade oral (PAPAROTTO LOPES e MEEKS 2001, HABERLAND-CARRODEGUAS et al., 2003). Assim, a detecção precoce do HPV nessas lesões é altamente recomendada e pode oferecer novas direções para a terapia e prevenção do câncer oral (MOLIJN et al., 2004).

Entre as lesões infectadas, foi observada uma maior prevalência de HPV18 e, surpreendente ausência de HPV16. Recente estudo, avaliando 60 artigos elegidos da literatura, encontrou maior prevalência de HPV16 e em segundo lugar de HPV18 (KREIMER et al., 2005). A alta prevalência de HPV18 encontrada em nosso estudo poderia significar uma particularidade geográfica de distribuição observada no interior de São Paulo, demonstrada em estudo anterior, cujas lesões cervicais também apresentaram maior prevalência de HPV18 (GUIMARÃES et al., 2005).

De maneira intrigante, algumas lesões orais apresentaram infecção por múltiplos tipos de vírus e isso ocorreu especialmente nas lesões pré-malignas e no câncer oral. Não há dúvida de que certas leucoplasias evoluem para o carcinoma espinocelular (REGEZI e SCIUBA, 2000). A freqüência de transformação maligna da leucoplasia oral varia entre 0 e

20% e aproximadamente 5% de todas as leucoplasias se transformarão em câncer em um período médio de 5 anos (SCHEPMAN, 1998) . Com base em estudos de taxa de transformação maligna, os pacientes com leucoplasia possuem um risco cinco vezes maior de desenvolver câncer oral do que pacientes sem este tipo de lesão (VAN DER WAAL, 1997). Considerando estudos prévios, o presente estudo resolveu avaliar os tipos de HPV mais prevalentes na mucosa oral e portanto foram utilizados *primers* para a identificação dos tipos de HPV6, 11, 16, 18, 31 e 33. Não foi possível identificar 9(30%) lesões orais que apresentaram-se positivas utilizando *primer* GP5+/6+. Entretanto, outros tipos de HPV menos comuns (JIMENEZ et al., 2001) deverão ser avaliados para melhor entendimento da associação entre o HPV, carcinogênese oral e resposta imunológica celular.

O papilomavírus humano (HPV) é encontrado nas lesões de cavidade oral e vem sendo considerado um dos fatores de risco para a carcinogênese oral por promover o descontrole do ciclo celular e algumas vezes o HPV é eliminado pela ativação do sistema imunológico. Entretanto, ocasionalmente as lesões não regridem e a progressão maligna da doença acontece sob condições apropriadas do micro-ambiente. A persistência da infecção viral parece ser necessária para a progressão neoplásica e a incapacidade de remover a infecção viral é atribuída á pobre resposta imunológica (O'BRIEN e CAMPO, 2002).

O sistema imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental no resultado clínico de lesões relacionadas ao HPV. Cerca de 70% a 90% dos indivíduos infectados eliminam o vírus entre 12 a 24 meses após a detecção da infecção inicial. A persistência viral nos 10% a 30% restantes está geralmente relacionada ao tipo viral infectante (oncogênicos) e com o quadro imunológico do paciente. Estudos demonstraram que, em pacientes imunossuprimidos, há um aumento da persistência viral e maior progressão de lesões neoplásicas (OZSARAN, 1999; HARWOOD, 2000; HEARD 2000). Já em indivíduos imunocompetentes, pode ocorrer a deficiência ou ausência da resposta imunológica,

permitindo assim que o vírus utilize estratégias para evadir-se da imunovigilância do hospedeiro. O HPV pode subverter a resposta imune do hospedeiro, atuando diretamente na resposta antiviral através da inibição da síntese de interferon tipo I e moléculas HLA de classe I envolvidas na apresentação de antígenos aos CTLs (FRAZER, 1996; RONCO, 1998 ; ALCAMI, 2000 ; O'BRIEN 2002; TINDLE, 2002). A infecção pelo HPV e a neoplasia cervical estão associados ao impedimento da imunidade celular e não especificamente à imunidade humoral, indicando que os efetores da imunidade celular são mais importantes que os anticorpos nesta doença. Existem evidências de que a imunidade celular, e não a humoral, tem um papel importante na destruição de células infectadas com vírus (ABBAS,2005).

O HPV pode escapar da defesa imunológica, modificando a polarização de células T, induzindo uma menor expressão de moléculas CHP de classe I e reduzindo a função das células apresentadoras de antígeno. Nas lesões pré-malignas e malignas ocorre um defeito na apresentação do antígeno, pois o vírus promove um decréscimo de moléculas MHC de classe I e de proteínas TAP, dificultando sua eliminação (KEATING et al., 1995).

Embora trofoblastos e tumores sejam ambos imunogênicos, eles são capazes de escapar da imunovigilância do hospedeiro. Os mecanismos exatos envolvidos neste processo são surpreendentemente similares em ambas as situações (WILCZYNSKI, 2006). No presente estudo o aumento da expressão de HLA-G e baixa expressão de HLA-E foram observados, sendo a expressão de HLA-G elevada nas lesões benignas e diminuindo nas lesões pré-malignas e no câncer oral. Ainda, alta expressão de HLA-G foi observada em associação estreita com a presença do DNA do HPV. Não parece surpresa que as lesões benignas e pré-malignas, as quais apresentam maiores níveis de expressão de HLA-G, sejam também as mesmas lesões com maior frequência da infecção pelo HPV. Existem cada vez mais relatos sobre o papel dos vírus na modulação da expressão do HLA-G. Seu efeito é dependente do tipo celular. A expressão de HLA-G por células neuronais foi observada após a infecção pelo

vírus da raiva em níveis de mRNA e na superfície celular (LEMAOULT, et al., 2003). HLA-G também foi altamente regulado em infecções de monócitos pelo citomegalovírus (CMV) humano após estimulação alogênica (ONNO et al., 2000). Em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – *human immunodeficiency virus*), foi observada uma alta expressão de HLA-G1 na superfície de todos os monócitos e em 10% das células T desses pacientes (LOZANO et al., 2002; CABELLO et al., 2003).

HLA-G é observado como uma molécula com caráter imunossupressivo e imunomodulatório no desenvolvimento do câncer (TRIPATHI eAGRAWAL, 2006). A molécula HLA-G pode inibir as funções de células T e células *natural killer* (NK) e a alta concentração dessa molécula poderia sistematicamente reduzir a imunovigilância contra o desenvolvimento do tumor e assim favorecer a progressão do câncer. A inibição de células NK promovidas pela elevada expressão de HLA-G ocorre pela interação direta da molécula – G com receptores inibitórios na superfície das células NK, denominado *killing immunoglobulin-like receptors* (KIRs) ou agindo indiretamente, estabilizando a expressão de HLA-E na superfície celular. *In vitro*, a expressão da molécula HLA-G apresenta-se intensamente aumentada por citocinas Th1, como IFN gama, enquanto as citocinas Th2 (IL-4, IL-10) promovem menores efeitos sobre a molécula HLA-G (REBMANN et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2005). Células T CD4+ secretam IL-10 em resposta a proteínas de capsídeo de diversos vírus, estas proteínas são apresentadas pelas células dendríticas e desviam a resposta de células T CD8+ associadas a epítomos restritos pela molécula CHP de classe I. Essa associação, reduz a produção de IFN-gama, resultando na baixa resposta de células T CD8 contra células tumorais e/ou infectadas por vírus (LIU et al, 2006).

O presente estudo observou uma correlação inversa entre a alta expressão de molécula HLA-G e a baixa expressão de molécula HLA-E na maioria das lesões infectadas pelo HPV. A regulação positiva da molécula HLA-G permite a estabilidade da molécula HLA-E na

superfície e poderia potencializar a resposta imunossupressora da molécula –G (ROUAS-FREISS et al., 2005). Entretanto, alterações genéticas e moleculares acumulativas nas células tumorais levariam ao aparecimento das moléculas HLA-E em um número limitado de linhagens celulares tumorais e estaria relacionada com a regulação negativa da molécula HLA de classe I ou mutação em subunidades da molécula de classe I (MARIN et al., 2003). Recente estudo demonstrou que a expressão de HLA-E na superfície das células de melanoma diminui a sua susceptibilidade à lise pelos linfócitos T citotóxicos (CTL) (DERRE et al., 2006). No presente estudo, o HPV esteve presente com maior frequência em lesões orais com alta expressão de ambas as moléculas não clássicas (G+/E+) e em diferentes níveis de expressão com HLA-G elevado e HLA-E baixo (G+/E-) ou HLA-G baixo e HLA-E alto (G-/E+). A elevada expressão de HLA-E foi observada em um pequeno número de lesões orais, algumas delas infectadas pelo HPV. A expressão aberrante de HLA-E pode ser de particular relevância biológica quando comparada à inibição da citotoxicidade das células NK devido a interação com o receptor CD94/NKG2A. (MARIN, 2003. Assim, a expressão aberrante de HLA-G e a baixa expressão de HLA-E em associação com as lesões proliferativas e malignas de mucosa oral infectadas pelo HPV sugerem que diferentes níveis de ambas as moléculas não clássicas poderia ser uma estratégia do HPV para escapar da imunovigilância do hospedeiro realizadas pela ação lítica das células NK e linfócitos T citotóxicos.

A análise quantitativa de CD4, CD25 e CD28 e o diagnóstico histológico das lesões orais demonstrou uma menor expressão de CD4 e CD25, bem como maior expressão de CD28 nos carcinomas de mucosa oral. Células T CD4+ produzem IL-2, que é considerado um fator de crescimento crítico de células T devido à habilidade de crescimento e expansão dessas células em cultura sob estímulo de IL-2 (ANTONY et al., 2006). Da mesma forma, a ação autócrina e parácrina da produção de IL-2 resulta na expressão de CD25 (receptor de IL-2) que está relacionada à sobrevivência e mecanismo supressivo de células T regulatórias,

(Treg) (WANG e CHEN, 2004). Adicionalmente, dentre as várias citocinas, os níveis de IL-2 também ativam células *natural killer* (NK), resultando na lise de células tumorais e/ou infectadas por vírus (RALAINIRINA et al., 2006). Por outro lado, a maior expressão de CD28 observada nesse estudo poderia indicar a ativação do segundo sinal para a proliferação de células T. Quanto ao CD28 estar expresso em altos níveis, foi também encontrada baixa expressão de CD4 e CD25, podendo indicar que os sinais co-estimulatórios promovidos pela expressão de CD28 poderiam não ser eficientes, impedindo o aumento de produção de IL-2 e CD25. Entretanto, a alta expressão de CD28 no infiltrado linfocítico pode corresponder a uma diminuição ou ausência de expressão de CD28 nas células epiteliais (BECKER et al., 2000). Na mucosa cervical, o decréscimo de células de Langerhans na zona de transformação apresentando lesões intraepiteliais tem sido associado à redução *in vivo* da proliferação de células T e produção de IL-2 (GONCALVES e DONADI, 2004). Com a progressão para lesões intra-epiteliais de alto grau (HG-SIL), ocorre o aumento de células de Langerhans imaturas com função deficiente observada nesse epitélio quando comparado com a zona de transformação (GONCALVES e DONADI, 2004).

A expressão de IL-2 e INF-gama (INF- γ) é freqüentemente observada nos estágios recentes dos tumores de mucosa oral. Estudos prévios demonstram que as oncoproteínas do HPV inibem a indução da resposta imune ativada por INF- γ , interferindo na efetiva eliminação do vírus (BARNARD e MCMILLAN, 1999). A resposta ao tratamento com INF- γ é fraca em lesões com HPV16 e HPV18 quando comparadas às lesões infectadas por HPV6/11 (SCHNEIDER, 1987). Lesões pouco diferenciadas e aquelas com potencial metastático expressam mais IL-4 e IL-10 e suprimem a expressão de IL-2 e INF- γ (BARNARD e MCMILLAN, 1999).

Embora a resposta imunológica ao HPV seja ainda pouco compreendida, tem sido postulado que a resposta imune principalmente celular (Th1), em oposição à resposta humoral

(Th2), seja fundamental para a eliminação do vírus (GONCALVES e DONADI, 2004). Ao avaliar a expressão de receptores de células T regulatórias ou efectoras (CD4, CD25 e CD28), foi observado no presente estudo a menor expressão desses receptores no infiltrado linfocitário das lesões orais e associação positiva com a presença de malignidade e infecção pelos tipos de HPV de alto risco. Nossos resultados se opõem aos observados em alguns estudos, nos quais o aumento da expressão de IL-2R tem sido documentado em neoplasias malignas humanas e nas linhagens celulares derivadas de câncer (ROCHA-ZAVALETA, et al., 2004). No câncer cervical, o aumento da expressão de IL-2R é observado em lesões intra-epiteliais de alto grau (HGSIL) que evoluem para o câncer (UNG, et al., 1999). No presente estudo, observou-se uma menor população de linfócitos CD4+ CD25+ progressivamente entre as lesões benignas, pré-malignas e malignas de mucosa oral, possivelmente indicando menor resposta de células T associada com o câncer oral e a infecção pelo HPV. Baixa ou perda de expressão de células T CD4 e CD25 poderia resultar na resposta imune celular deficiente ao tumor e/ou às células infectadas por vírus (ALCOCER-GONZALEZ et al., 2006, DELONG et al., 2005). A progressão do câncer parece relacionada à diminuição de produção de IL-2 e outras citocinas nos linfócitos infiltrantes no tumor, bem como em defeitos na via de CLTs, contribuindo para a inabilidade do sistema imune em eliminar as células neoplásicas e, em especial, as células malignas de tumores de cabeça e pescoço (KERREBIJN et al., 1999). A presença de células T CD4+ CD25+ poderia ser responsável pela resposta ao antígeno tumor-específico, resultando na tolerância imunológica e evasão das células tumorais da imunovigilância do tumor hospedeiro. Resposta imune celular ineficiente poderia contribuir para a permanência das células com defeitos acumulativos em genes específicos que regulam a morte celular, sendo considerado um mecanismo de sobrevivência (OZSARAN et al., 1999). A persistência da infecção pelo HPV parece ocorrer em 10 a 30% das pessoas infectadas, principalmente associada à infecção pelos tipos de HPV de alto risco,

associada à menor resposta imune e à progressão tumoral em pacientes imunossuprimidos. (HARWOOD et al., 2000; HEARD et al., 2000). Por outro lado, em indivíduos normais, a ausência ou deficiência de resposta imunológica poderia ser uma estratégia do HPV para se evadir da imunovigilância do hospedeiro (O'BRIEN e SAVERIA, 2002).

Finalmente, o presente estudo traz resultados inéditos sobre a inter-relação de moléculas não clássicas e carcinogênese de mucosa oral, bem como a resposta imune celular. Ainda, a presença do HPV tem sido observada nesse e em outros trabalhos conduzidos em nosso laboratório, especialmente encontrados em lesões benignas e pré-malignas. Esse fato leva à reflexão de que não existe protocolo no Brasil para diagnóstico precoce da infecção por HPV em cavidade oral. Sendo assim, com infecção por um vírus carcinogênico e associado à deficiência de resposta imunológica, certamente as lesões benignas de hoje serão o câncer de amanhã.

CONCLUSÕES

1. Verificou-se a presença do HPV em lesões orais benignas, premalignas e malignas, predominantemente com tipo de HPV de alto risco, o que poderia indicar que o HPV possivelmente seja um fator de risco para o desenvolvimento do câncer oral.
2. Observou-se o aumento na expressão quantitativa de HLA-G nas lesões benignas e essa expressão diminuiu progressivamente entre as lesões pré-malignas e malignas, isto poderia indicar que a desregulação de HLA-G ocorre precocemente, em lesões proliferativas e precursoras do câncer oral .
3. Observou-se a menor expressão quantitativa de HLA-E igualmente entre as lesões benignas, pré-malignas e malignas, não evidenciando a associação da expressão dessa molécula e a carcinogênese de mucosa oral.
4. Observou-se uma correlação inversa entre a maior expressão de HLA-G e a menor expressão de HLA-E nas lesões infectadas pelo HPV, aparentemente isto indicaria que a desregulação dessas moléculas não clássicas possivelmente contribue para a persistência da infecção viral e progressão maligna das lesões orais.
5. Verificou-se a menor expressão das moléculas de células T , CD4, CD25 e CD28, apresentando concomitante baixa de expressão de CD4/CD25 e CD25/CD28, indicando que aparentemente a deficiência de resposta imune celular mediada por células T possibilitaria a persistência da infecção pelo HPV e transformação maligna celular da cavidade oral.

ABBAS, A.K. *Imunologia celular e molecular*.5. Rio de Janeiro: Elsevier,2005.

AGARWAL, A.; RANI, M.; SAHA, G. K.; VALARMATHI, T. M.; BAHADUR, S.; MOHANTI, B. K.; DAS, S. N. Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. **Immunol Invest**, v.32, n.1-2, Feb, p.17-30. 2003.

ALCAMI, A.; KOSZINOWSKI, U.H. Viral mechanisms of immune evasion. **Immunol Today**, v.21, n.9, Sep; p.447-55. 2000

ALCOCER-GONZALEZ, J.M.; BERUMEN, J.; TAMEZ-GUERRA, R.; BERMUDEZ-MORALES, V.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; HERNANDEZ-PANDO, R.; MORENO, J.; GARIGLIO, P.; MADRID-MARINA, V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunol**. v.19,n.3,p.481-91, 2006.

ALGARRA, I.; GARCIA-LORA, A.; CABRERA, T.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. **Cancer Immunol Immunother**. v.53, n.10, p.904-1010, 2004.

ALLISON, R. T.; BEST, E. T. p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: the vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry. **J Oral Pathol Med**, v.27, n.9, Oct, p.434-440. 1998.

ANTONY, P.A.; PAULOS, C.M.; AHMADZADEH, M.; AKPINARLI, A.; PALMER, D.C.; SATO, N.; KAISER, A.; HINRICHS, C.S.; KLEBANOFF, C.A.; TAGAYA, Y.; RESTIFO,

N.P. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. **J Immunol.** v.176,n.9,p.5255-5266, 2006.

AXELL, T.;PINDBORG, J. J.;SMITH, C. J.;VAN DER WAAL, I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. **J Oral Pathol Med,** v.25, n.2, Feb, p.49-54. 1996.

BARNARD, P.; MCMILLAN, E. N. A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. **Virology,** v.259, n.2, Jul 5, p.305-313. 1999.

BECKER, J.C.; BRABLETZ, T.; CZERNY, C.; TERMEER, C.; BROCKER, E.B. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. **Int Immunol.**;v. 5,n.12,p.1501-1508, 1993.

BECKER J.C.; VETTER, C.S.; SCHRAMA, D.; BROCKER, E.B.; THOR STRATEN, P. Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node. **Eur J Immunol.** v.30,n12,p.3699-706, 2000.

BETTINI, J.S.; SOARES,E.G.; DUARTE, G.; SIMOES, R.T.; SIMOES,A.L.PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. **Acta Cytol.** v.47,p.545-549, 2003.

BIRNER, P.; BACHTIARY, B.;DREIER, B.;SCHINDL, M.;JOURA, E. A.;BREITENECKER, G.;OBERHUBER, G.;Signal-amplified colorimetric in situ

hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. **Mod Pathol**, v.14, n.7, Jul, p.702-709. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estatísticas de câncer oral. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/> Acesso em: 25/06/2006.

BROUHA, X. D.;TROMP, D. M.;HORDIJK, G. J.;WINNUBST, J. A.;DE LEEUW, J. R.Oral and pharyngeal cancer : analysis of patient delay at different tumour stages. **Head Neck**, v.27, p.939-945, 2005.

BUNDGAARD, T.;BENTZEN, S. M.;WILDT, J.The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v.30B, n.5, Sep, p.323-328, 1994.

BURKHARDT, A.; Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. **J. Oral Pathol.**, v.14, p.751-778. 1985.

CABELLO, A.;RIVERO, A.;GARCIA, M. J.;LOZANO, J. M.;TORRE-CISNEROS, J.;GONZALEZ, R.;DUENAS, G.;GALIANI, M. D.;CAMACHO, A.;SANTAMARIA, M.;SOLANA, R.;MONTERO, C.;KINDELAN, J. M.;PENA, J.HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. **Hum Immunol**, v.64, n.11, Nov, p.1045-9. 2003.

CHANG, F.;SYRJANEN, S.;TERVAHAUTA, A.;SYRJANEN, K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. **Br J Cancer**, v.68, n.4, Oct, p.653-61. 1993.

COGLIANO, V. J. Current criteria to establish human carcinogens. **Semin Cancer Biol**, v.14, n.6, Dec, p.407-12. 2004.

COLETTA, R.D.;GRANER, E.;LOPES, M.A.;VARGAS, P.A.;JORGE, J.JR.;ALMEIDA, O.P. Os avanços da biologia molecular e o câncer bucal. . **Rev. APCD**, v.56, p.62-66. 2002.

CRISSMAN, J.D. & ZARBO, R.J. Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. **Am. J. Surg. Pathol**, v.13(suppl), p..5-16. 1989.

CROMME, F. V.;SNIJDERS, P. J.;VAN DEN BRULE, A. J.;KENEMANS, P.;MEIJER, C. J.;WALBOOMERS, J. M. MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. **Oncogene**, v.8, n.11, Nov, p.2969-75. 1993.

D’COSTA, J.; SARANATH, D.; DEDHIA, P.; SANGHVI, V.; MEHTA, A.R. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. **Oral Oncol**,v.34,p.413-420, 1998.

DELONG, P.; CARROLL, R.G.; HENRY, A.C.; TANAKA, T.; AHMAD, S.; LEIBOWITZ, M.S.; STERMAN, D.H.; JUNE, C.H.; ALBELDA, S.M.; VONDERHEIDE, R.H. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. **Cancer Biol Ther**,v. 4,n.3,p.342-346, 2005.

DERRE, L.;CORVAISIER, M.;CHARREAU, B.;MOREAU, A.;GODEFROY, E.; MOREAU-AUBRY, A.;JOTEREAU, F.;GERVOIS N.; Expression and release of HLA-E by

melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. **J Immunol.**,v.177,n.5,p.3100-3107, 2006.

DE VILLIERS, E. M. Papillomavirus and HPV typing. **Clin Dermatol**, v.15, n.2, Mar-Apr, p.199-206, 1997.

DONADI, E. A. Aspectos moleculares do complexo principal de Histocompatibilidade: com entender a associação entre o sistema HLA e as doenças reumáticas. **Rev Bras Reumat**, v.41, n. 2, p.225-236, 2001.

FEINMESSER, M.;OKON, E.;SCHWARTZ, A.;KAGANOVSKY, E.;HARDY, B.;AMINOV, E.;NAGERIS, B.;SULKES, J.;FEINMESSER, R. Histologic and immunohistochemical characterization of tumor and inflammatory infiltrates in oral squamous cell carcinomas treated with local multikine immunotherapy: the macrophage at the front line. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.261, n.7, Aug, p.359-368, 2004.

FORTE, P.;BAUMANN, B.C;WEISS, E.H.; SEEBACH, J.D.HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading. **Am J Transplant.** 5(9):2085-93, 2005.

FRANCO, E. L.;KOWALSKI, L. P.;OLIVEIRA, B. V.;CURADO, M. P.;PEREIRA, R. N.;SILVA, M. E.;FAVA, A. S.;TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**, v.43, n.6, Jun 15, p.992-1000, 1989.

FRAZER, I. H. Immunology of papillomavirus infection. **Curr Opin Immunol**, v.8, n.4, Aug, p.484-491, 1996.

FREGONESI, P. A.;TERESA, D. B.;DUARTE, R. A.;NETO, C. B.;DE OLIVEIRA, M. R.;SOARES, C. P.p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. **J Histochem Cytochem**, v.51, n.10, Oct, p.1291-1297. 2003.

GERVASIO, O. L.;DUTRA, R. A.;TARTAGLIA, S. M.;VASCONCELLOS, W. A.;BARBOSA, A. A.;AGUIAR, M. C. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Braz Dent J**, v.12, n.1, p.57-61. 2001.

GIOVANNELLI, L.;CAMPISI, G.;LAMA, A.;GIAMBALVO, O.;OSBORN, J.;MARGIOTTA, V.;AMMATUNA, P. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. **J Infect Dis**, v.185, n.6, Mar 15, p.833-836, 2002.

GONCALVES, M. A.;DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: current concepts. **Braz J Infect Dis**, v.8, n.1, Feb, p.1-9, 2004.

GUIMARAES, M.C.; GONCALVES, M.A.;SOARES, C.P.;BETTINI, J.S.;DUARTE, R.A.;SOARES, E.G.;Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. **J Histochem Cytochem**, v.53,n.4,p.509-516, 2005.

HA , P.K.; CALIFANO, J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 188-196, 2004.

HABERLAND-CARRODEGUAS, C.;FORNATORA, M.L.;REICH, R.F.;FREEDMAN, P.D.; Detection of human papillomavirus DNA in oral inverted ductal papillomas. **J Clin Pathol**,v.56,n.12,p.910-913, 2003.

HANSEN, L.S.; OLSON, J.A.; SILVERMAN JUNIOR, S. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 60, n. 3, p. 285-298, 1985.

HANSEL, D.E.;RAHMAN, A.;WILENTZ, R.E.;SHIH, I.E.M.;MCMASTER, M.T.;YEO, C.J.;MAITRA, A. HLA-G upregulation in pre-malignant and malignant lesions of the gastrointestinal tract. **Int J Gastrointest Cancer**.v.35,n.1,p.15-23,2005.

HARWOOD, C.A.; SURENTERAN, T.; MCGREGOR, J.M.; SPINK, P.J.; LEIGH, I.M.; BREUER, J.; PROBY, C.M. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. **J Med Virol**, v. 61, n, 3, p. 289-297, 2000.

HEARD, I.T.J.;SCHMITZ, V.;MANDELBROT, L.;KAZATCHKINE, M.D.;ORTH, G. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load. n.1, p.289-297, 2000.

HEARD, I.;TASSIE, J.M.;SCHMITZ, V.;MANDELBROT, L.;KAZATCHKINE, M.D.;ORTH, G. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load(1).**Obstet Gynecol**.Sep,v.96, n.3, p.403-409, 2000.

HEISE, A. The clinical significance of HPV. **Nurse Pract**, v.28, n.10, Oct, p.8-19; quiz 20-21. 2003.

HODGKINSON, A. D.;MILLWARD, B. A.;DEMAINE, A. G. The HLA-E locus is associated with age at onset and susceptibility to type 1 diabetes mellitus. **Hum Immunol**, v.61, n.3, Mar, p.290-295, 2000.

HOWLEY, P. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, *et al* (Ed.). **Fields Virology**_LIPPINCOTT-RAVEN, 1994. Papillomavirinae: The viruses and their replication, p.2045-2076

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.**Human Papillomaviruses**. Lyon: IARC,1995.415p. (IARC Monographs on the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol.(64) disponível em: <http://www.who.int/entity/cancer/media/en/415.pdf> Acesso em : 25/07/2006.

IBRAHIM, S. O.;LILLEHAUG, J. R.;JOHANNESSEN, A. C.;LIAVAAG, P. G.;NILSEN, R.;VASSTRAND, E. N.Expression of biomarkers (p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erbB-2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v.35, n.3, May, p.302-313. 1999.

JANEWAY, C. A. O. T., PAUL Imunobiologia _o Sistema Imune na Saúde e na Doença: **ARTMED**. 2002

JIMENEZ, C.;CORRENTI, M.;SALMA, N.;CAVAZZA, M.E.;PERRONE, M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. **J Oral Pathol Med**. v.30,n.7,p.385-388, 2001.

JURISICOVA, A.;CASPER, R. F.;MACLUSKY, N. J.;MILLS, G. B.;LIBRACH, C. L. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.1, Jan 9, p.161-5. 1996.

KIESSLING, R.;WASSERMAN, K.;HORIGUCHI, S.;KONO, K.;SJOBERG, J.;PISA, P.;PETERSSON, M.;Tumor-induced immune dysfunction. **Cancer Immunol Immunother.** 1999;v.48,n.7,p.353-362

KREIMER, A.R.;CLIFFORD, G.M.; BOYLE, P.;FRANCESCHI, S.Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.14,n.2,p.467-475, 2005.

KEATING, P. J.;CROMME, F. V.;DUGGAN-KEEN, M.;SNIJDERS, P. J.;WALBOOMERS, J. M.;HUNTER, R. D.;DYER, P. A.;STERN, P. L. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. **Br J Cancer**, v.72, n.2, Aug, p.405-411,1995.

KERREBIJN, J. D.;BALM, A. J.;FREEMAN, J. L.;DOSCH, H. M.;DREXHAGE, H. A Who is in control of the immune system in head and neck cancer? **Crit Rev Oncol Hematol**, v.31, n.1, Jun, p.31-53. 1999.

KIM, J.;MODLIN, R. L.;MOY, R. L.;DUBINETT, S. M.;MCHUGH, T.;NICKOLOFF, B. J.;UYEMURA, K.IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. **J Immunol**, v.155, n.4, Aug 15, p.2240-2247. 1995.

KIRSZENBAUM, M.;MOREAU, P.;TEYSSIER, M.;LAFON, C.;GLUCKMAN, E.DAUSSET, J.;CAROSELLA, E.Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. **Hum Immunol**, v.43, n.3, Jul, p.237-241, 1995.

KOWALSKI, L. P.;CARVALHO, A. L. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. **Oral Oncol**, v.37, n.1, Jan, p.94-98, 2001.

KOWALSKI, L. P.;FRANCO, E. L.;TORLONI, H.;FAVA, A. S.;DE ANDRADE;SOBRINHO, J.;RAMOS, G.;OLIVEIRA, B. V.;CURADO, M. P.Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v.30B, n.3, May, p.167-173,1994.

KUFFER, R.;LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Oncol**, v.38, n.2, Feb, p.125-130, 2002.

LAFON, M.;PREHAUD, C.;MEGRET, F.;LAFAGE, M.;MOUILLOT, G.;ROA M,MOREAU, P.;ROUAS-FREISS, N.;CAROSELLA, E.D.Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. **J Virol**. v.79,n.4,p.226-237,2005.

LADANYI,A.;SOMLAI,B.;GILDE,K.;FEJOS,Z.;GAUDI,I.;TIMAR,J.T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. **Clin Cancer Res** . v.10,n.2,p.521-530,2004.

LAKSHMI, S.;AIR, S. A.;ILLAI, M. R.. Oral cancer and human papillomaviruses: is there a link? **J Surg Oncol**, v.52, n.3, Mar, p.193-196,1993.

LANE J.E.;PETERSON, C.M.;RATZ, J.L. Letter to the editor: modified mohs technique for Basal cell carcinomas of the head and neck. **Arch Facial Plast Surg**, v.5, n.1, p.116. 2003.

LAZO, P. A. Human papillomaviruses in oncogenesis. **Bioessays**, v.9, n.5, Nov, p.158-162,1988.

LE BOUTELLIER P. ,BLASCHITZ, A. The functionality of HLA-G is emerging. **Immunol Rev**, v.167, p.233-244,1999.

LEITE, I. C.;KOIFMAN, S.Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncol**, v.34, n.5, Sep, p.347-352,1998.

LEMAOULT, J.;LE DISCORDE, M.;ROUAS-FREISS, N.;MOREAU, P.;MENIER, C.;MCCLUSKEY, J.;CAROSELLA, E. D.; Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens**, v.62, n.4, Oct, p.273-284,2003.

LI, X., COFFINO, P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. **J Virol**, v.70, n.7, Jul, p.4509-4516,1996.

LIU, X.S.;DYER, J.;LEGGATT,G.R.;FERNANDO,G.J.;ZHONG, J.;THOMAS, R.;FRAZER,I.H.Overcoming original antigenic sin to generate new CD8 T cell IFN-gamma responses in an antigen-experienced host. **J Immunol**. v.77,n.5,p.2873-2879,2006.

LLEWELLYN, C. D.;JOHNSON, N. W.;WARNAKULASURIYA, K. A.Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. **Oral Oncol**, v.37, n.5, Jul, p.401-418,2001.

LOKE,P.;ALLISON,J. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. **Arthritis Res Ther** v.6,n.5,p.214-216,2004.

LOPEZ-BOTET, M.;LLANO, M.;NAVARRO, F.BELLON, T. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. **Semin Immunol**, v.12, n.2, Apr, p.109-119,2000.

LOZANO, J. M.;GONZALEZ, R.;KINDELAN, J. M.;ROUAS-FREISS, N.;CABALLOS, R.;DAUSSET, J.;CAROSELLA, E. D.;PENA, J. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. **Aids**, v.16, n.3, Feb 15, p.347-351,2002.

MANOS, M.M.;TING,Y.; WRIGHT,D.K.;LEWIS,A.J.; BROKER,T.R.; and WOLINSKY S.M.; The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *In* In Molecular Diagnostics of Human Cancer: Cancer Cells. Vol. 7. M. Furth and M. Greaves, editors. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 209-214,989.

MAJEWSKI, S.;JABLONSKA, S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. **Journ. Am. Acad. Derm.**, v.36, p.659-685. 1997.

MARIN,R.;RUIZCABELLO,F.;PEDRINACI,S.;MENDEZ,R.;JIMENEZ,P.;GERAGHTY,D. E.;GARRIDO,F.Analysis of HLA-E expression in human tumors. **Immunogenetics**. v.54,n11,p.767-775,2003.

MCDEVITT, H. O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. **Annu Rev Immunol**, v.18, p.1-17, 2000.

MCGLENNEN, R. C. Human papillomavirus oncogenesis. **Clin Lab Med**, v.20, n.2, Jun, p.383-406, 2000.

MIGUEL, R. E.;VILLA, L. L.;CORDEIRO, A. C.;PRADO, J. C.;SOBRINHO, J. S.;KOWALSKI, L. P.Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **Am J Surg**, v.176, n.5, Nov, p.428-429, 1998.

MILLER, C. S. Herpes simplex virus and human papillomavirus infections of the oral cavity. **Semin Dermatol**, v.13, n.2, Jun, p.108-117, 1994.

MILLER, C. S. E JOHNSTONE, B. M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.91, n.6, Jun, p.622-35, 2001.

MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT, W.; VAN DOORN, L. J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J Clin Virol**, v.32, n.1, Marc, p.43-51,2005

MORALES, P.; CORELL, A.; MARTINEZ-LASO, J.; MARTIN-VILLA, J.M.; VARELA, P.; PAZ-ARTAL, E.; ALLENDE, L.M. & ARNAIZ-VILLENA, A. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. **Immunogenetics**, v.38, p. 323-331, 1993.

MUNGER, K.; PHELPS, E W. C. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. **Biochim Biophys Acta**, v.1155, n.1, May 25, p.111-123, 1993.

NAGPAL, J. K. E DAS, B. R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncol**, v.39, n.3, Apr, p.213-221, 2003.

NEVILLE, B.W.;DAMM, D.D.;ALLEN, C.M.;BOUQUOT, J.E.; **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

NORTON, S. D.;ZUCKERMAN, L.;URDAHL, K. B.;SHEFNER, R.;MILLER, J.,JENKINS, M. K. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. **J Immunol**, v.149, n.5, Sep 1, p.1556-1561, 1992.

O'BRIEN, P. M.; SAVERIA CAMPO, M.Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins.**Virus Res.**, v.88, n.1-2, Sep; p.103-117, 2002.

ONNO, M.;PANGAULT, C.;LE FRIEC, G.;GUILLOUX, V.;ANDRE, P.;FAUCHET,R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. **J Immunol**, v.164, n.12, Jun 15, p.6426-6434, 2000.

OSTWALD, C.;RUTSATZ, K.;SCHWEDER, J.;SCHMIDT, W.;GUNDLACH, K.;BARTEN, M.Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions.**Med Microbiol Immunol. Berl**, v.192, p.145-148, 2003.

OZSARAN, A.A.;ATES, T.;DIKMEN, Y.;ZEYTIÑOGLU, A.;TEREK, C.;ERHAN, Y.;
OZACAR, T.;BILGIC, A.:(2): Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and
human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive
therapy. **Eur J Gynaecol Oncol**, v.20, n.2, p.127-130, 1999;.

PALMISANO, G.L.; PISTILLO, M.P.; FARDIN, P.; CAPANNI, P.; NICOLO, G.; SALVI,
S.;SPINA, B.;PASCIUCCO, G. & FERRARA; G.B. Analysis of HLA-G expression in breast
cancer tissues. **Hum Immunol**, v.63, 969-976,2002

PAPAROTTO LOPES, S.M.;MEEKS, V.I. Analysis of HPV 16 and 18 by in situ
hybridization in oral papilloma of HIV+ patients. **Gen Dent** ,v.49,p. 386-389, 2001.

PHILLIPS, D. H. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues.
Carcinogenesis, v.23, n.12, Dec, p.1979-2004, 2002.

RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, POOS L, ANDRES E, HENTGES F, ZIMMER J.
Control of natural killer (NK) cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Leukoc
Biol.** 2006 (in press)

REBMANN, V.; REGEL, J.; STOLKE, D.; GROSSE-WILDE, H. Secretion of sHLA-G
molecules in malignancies. **Semin Cancer Biol.** Oct;v.3,n.5,p.371-377,2003

REGEZI, J. A.;SCIUBA, J. J.Patologia Bucal: correlações clinicopatológicas. Rio de Janeiro:
Guanabara Koogan. 2000, 64-84 p.

REIBEL, J. Tobacco and oral diseases. Update on the evidence, with recommendations. **Med Princ Pract**, v.12 Suppl 1, p.22-32, 2003.

REYBURN, H. T.,MANDELBOIM, O.,VALES-GOMEZ, M.,DAVIS, D. M.,PAZMANY, L.,STROMINGER, J. L..The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. **Nature**, v.386, n.6624, Apr 3, p.514-517, 1997.

RITCHIE, J. M.,SMITH, E. M.,SUMMERSGILL, K. F.,HOFFMAN, H. T.,WANG, D.,KLUSSMANN, J. P.,TUREK, L. P.,HAUGEN, T. H..Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v.104, n.3, Apr 10, p.336-44, 2003.

ROCHA-ZAVALETA, L.;HUITRON, C.,CACERES-CORTES, J. R.;ALVARADO MORENO, J. A.;VALLE-MENDIOLA, A.;SOTO-CRUZ, I.;WEISS STEIDER, B.;RANGEL-CORONA, R.Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta/gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Cell Signal**, v.16, n.11, Nov, p.1239-1247, 2004.

RODRIGUES, V. C.;MOSS, S. M.;TUOMAINEN, H. Oral cancer in the UK: to screen or not to screen. **Oral Oncol**, v.34, n.6, Nov, p.454-465, 1998.

RODGERS, J.R.;COOK, R.G.;MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. **Nat Rev Immunol**,v. 5,n.6,p.459-471, 2005.

RONCO, L. V.; KARPOVA ,A.Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. .

Genes Dev., v.1, n.12-13, 2061-2072Jul, 1998

ROUAS-FREISS, N.;GONCALVES, R.M.;MENIER, C.;DAUSSET, J.;CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v. 94,n.21,p.11520-11525, 1997.

ROUAS-FREISS, N.;MOREAU, P.;FERRONE, S.;CAROSELLA, E.D. HLA-G Proteins in Cancer: Do They Provide Tumor Cells withan Escape Mechanism? **Cancer Res**,v.65,p.22, 2005.

RUIZ MENDEZ, A.;PASEIRO GARRIGA, M. A.;ESCALONA VELOZ, R.;MARCOS CORZO, L. [Prevalence of malignant oral neoplasms in the Celia Sanchez Clinicosurgical Hospital from 1982 to 1985]. **Rev Cubana Estomatol**, v.26, n.3, Jul-Sep, p.235-241, 1989.

SAND, L.;JALOULI, J.;LARSSON, P. A.;HIRSCH, J. M.Human papilloma viruses in oral lesions. **Anticancer Res**, v.20, n.2B, Mar-Apr, p.1183-1188, 2000.

SANDERS, S. K.;GIBLIN, P. A.;KAVATHAS, P. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class 1 molecule on cytotrophoblasts. **J Exp Med**, v.174, n.3, Sep 1, p.737-740, 1991.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; AND SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**,v. 17,p.914-921, 1994.

SARANATH, D.;TANDLE, A. T.;TENI, T. R.;DEDHIA, P. M.;BORGES, A. M.;PARIKH, D.;SANGHAVI, V.;MEHTA, A. R.p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. **Oral Oncol**, v.35, n.3, May, p.242-250, 1999.

SATO, N.;NABETA, Y.;KONDO, H.;SAHARA, H.;HIROHASHI, Y.;KASHIWAGI, K.;KANASEKI, T.;SATO, Y.;RONG, S.;HIRAI, I.;KAMIGUCHI, K.;TAMURA, Y.;MATSUURA, A.;TAKAHASHI, S.;TORIGOE, T.;IKEDA, H. Human CD8 and CD4 T cell epitopes of epithelial cancer antigens. *Cancer Chemother Pharmacol*,v.46,p.86-90,2000.

SCHEPMAN, K. P. V. M.;SMEELE, E.H.; VAN DER WAAL, L.E..Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. **Oral Oncol.**,v.34,p.270-275, 1998.

SCULLY, C.;FIELD, J. K.;TANZAWA, H.Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol**, v.36, n.3, May, p.256-263, 2000.

SCULLY, C.; PORTER, S. ABC of oral health. **Oral cancer**. BMJ, v.321, n.7253, p.97-100, 2000.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. **Tratado de Patologia Bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.508, p.723-727,1987.

SCHNEIDER, A.; PAPENDICK, U.; GISSMANN, L.; DE VILLIERS E.M. I. . Interferon treatment of human genital papillomavirusinfection: importance of viral type. **Int. J. Cancer**, Vol.40, p.610-614, 1987.

SILVERMAN, S. J. G., M.; LOZADA, F. Leucoplasia, dysplasia, and malignant transformation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.82, p.117, 1996.

SOARES, C. P.;BENATTI NETO, C.;FREGONEZI, P. A.;TERESA, D. B.;SANTOS, R. T.;LONGATTO FILHO, A.;MAEDA, M. Y.Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression in oral lesions infected with human papillomavirus. **Anal Quant Cytol Histol**, v.25, n.1, p.19-24, 2003.

SOARES, C.P.;DOS REIS, R.I.;KIMURA, S.S.;TERESA, D.B.;NETO, C.B.;LONGATTO-FILHO, A.;MAEDA, M.Y.S.;SANTOS, R.T.M.

Papilomavírus humano (HPV) em lesões benignas e malignas de mucosa oral pelos métodos de hibridização in situ e imunohistoquímica. **Rev. Cienc. Farm.**, v.23. 2002.

SOARES, C. P.;MALAVAZI, I.;DOS REIS, R. I.;NEVES, K. A.;ZUANON, J. A.;BENATTI NETO, C.;SPOLIDORIO, L. C.;DE OLIVEIRA, M. R. [Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, n.5, Sep-Oct, p.439-444. 2002.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS L.A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Semin Cancer Biol**, v.9, n.6, Jul-Aug; p.379-386, 1999.

SUGAMURA, K.;ASAO, H.;KONDO, M.;TANAKA, N.;ISHII, N.;NAKAMURA, M.;TAKESHITA, T.The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. **Adv Immunol**, v.59, p.225-277, 1995.

SUGIYAMA, M.;BHAWAL, U. K.;DOHMEN, T.;ONO, S.;MIYAUCHI, M.;ISHIKAWA, T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med* **Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.95, n.5, May, p.594-600, 2003.

SYRJANEN, F. C. T., A.; SYRJANEN, K. Tumorigenesis associated with p53 tumor suppressor gene. **Br. J. Cancer**, v..68, p.653-661, 1993.

SYRJANEN, S. M. E SYRJANEN, K. J.. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. **Ann Med**, v.31, n.3, Jun, p.175-87, 1999.

TANAKA, M.;NISHIZAWA, M.;INUZUKA, T.;BABA, H.;SATO, S.;MIYATAKE, T.
Human natural killer cell activity is reduced by treatment of anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) monoclonal mouse IgM antibody and complement. **J Neuroimmunol**, v.10, n.2, Dec, p.115-127, 1985.

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

TOMMASINO, M. E CRAWFORD, L.. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. **Bioessays**, v.17, n.6, Jun, p.509-518,1995.

TRIPATHI, P.;AGRAWAL, S.Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. **Cancer Invest**,v.24,n.2,p.178-186, 2006.

UNG, A.;KRAMER, T. R.;SCHIFFMAN, M.;HERRERO, R.;BRATTI, M. C.;BURK,R.D.SWANSON, C. A.;SHERMAN, M. E.;HUTCHINSON, M. L.;ALFARO, M.;MORALES, J.;BALMACEDA, I.;HILDESHEIM. A Soluble interleukin 2 receptor levels and cervical neoplasia: results from a population-based case-control study in Costa Rica. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.8, n.3, Mar, p.249-253. 1999.

UROSEVIC, M.;DUMMER, R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer-different stories with the same message. **Semin Cancer Biol**.13(5):337-42, 2003.

VAN DER WAAL, I.; AXELL, T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. **Oral Oncol**. Sep; v.38,n.6,p.521-526, 2002.

VAN DER WAAL, I.;SCHEPMAN, K. P.;VAN DER MEIJ, E. H.A modified classification and staging system for oral leukoplakia. **Oral Oncol**, v.36, n.3, May, p.264-266, 2000.

VAN DER WAAL, I. S.; VAN DER MEIJ K. P, E. H.,SMEELE, L. E. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol**, v.33, n.5, Sep, p.291-301, 1997.

WALKER, D. M.;BOEY, G.;MCDONALD, L. A. The pathology of oral cancer. **Pathology**, v.35, n.5, Oct, p.376-83, 2003.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS M.M.; BOSCH F.X., J.A.; KUMMER, SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; AND MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [see comments]. **J Pathol**, v.189,p.12-19, 1999

WANG, S. S.;SCHIFFMAN, M.;SHIELDS, T. S.;HERRERO, R.;HILDESHEIM, A.;BRATTI, M. C.;SHERMAN, M. E.;RODRIGUEZ, A. C.;CASTLE, P. E.;MORALES, J.;ALFARO, M.;WRIGHT, T.;CHEN, S.;CLAYMAN, B.;BURK, R. D.;VISCIDI, R. P. Seroprevalence of human papillomavirus-16, -18, -31, and -45 in a population-based cohort of 10000 women in Costa Rica. **Br J Cancer**, v.89, n.7, Oct 6, p.1248-1254, 2003.

WANG, S.;CHEN, L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cell Mol Immunol**,v. 1,n.1,p.37-42, 2004.

WARRENS-LECHLER. Mechanisms of HLA and disease associations. In: R. L. A. Warrens (Ed.). HLA in Health and Disease. San Diego: **Academic Press**, 2000. Mechanisms of HLA and disease associations, p.139-146

WILCZYNSKI, J.R. Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. **Chemotherapy**, v.52,n.3,p107-110, 2006.

WHO. World Health Organization. **WHO cancer control programme**. 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en>. Acesso em: 26/06/2006

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncol**, v.38, n.8, Dec, p.737-746, 2002.

XAVIER, S. D.;BUSSOLOTI FILHO, I.;LANCELLOTTI, C. L. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study. **Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)**, v.71, n.4, Jul-Aug, p.510-514. 2005.

ZHENG, Z. M.;BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front Biosci**, v.11, p.2286-2302, 2006.

ZUR HAUSEN, H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.122, n.1, p.3-13, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.9, May 3, p.690-698, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.5, May, p.342-350, 2002.

**QUANTITATIVE EXPRESSION OF NONCLASSIC HLA CLASS I MOLECULES,
HLA-G AND HLA-E, RELATED TO HPV-INFECTED ORAL LESIONS.**

Paula Andrea Gabrielli Fregonezi¹, Renata Toscano Simões², Philippe Moreau³, Edgardo D Carosella³, Carla Patrícia Martinelli Kläy⁴, Maria Alice Guimarães Gonçalves², Edson Garcia Soares⁴, Francisco Souto⁵, Eduardo Antonio Donadi², Christiane Pienna Soares¹.

¹ Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP, University of São Paulo State, Araraquara, São Paulo, Brazil.

² Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

⁵ CEA, Service de Recherche en Hémato-Immunologie, DSV/DRM, Hospital Saint Louis, Institut Universitaire d'Hématologie, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris (France).

⁴ Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

⁵ Department of Internal Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. Av. Fernando Corrêa, s/n zip code 78 060900, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

Correspondence and reprint requests to: Christiane Pienna Soares, School of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP, University of São Paulo State. Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Centro, 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel: +55 16 33016554; Fax: +55 16 3301 6559.

ABSTRACT

The understanding of the interactions between HPV-infected and tumor cells of the host immune system could lead to the conclusion which strategies that cells might develop to evade immune responses. The aim of the study was to verify if HLA-G and HLA-E overexpression were related to oral carcinogenesis and HPV infection. Fifty-one oral biopsies were stratified according to histological differentiation in benign lesion (hyperplasia and papilloma), premalignant lesions (lichen planus and leukoplakia with dysplasia) and malignant (squamous cell carcinoma). HLA-G and HLA-E expression were analysed by immunoperoxidase method (LSAB, DAKO, Glostrup Denmark) and the expression was quantified by computer-assisted image analysis equipment (Image Pro Plus, MD, USA). DNA HPV detection and typing was performed by PCR technique, using specific primer sequence to HPV 6, 11, 16, 18, 31 and 33. HLA-G over expression was observed in benign oral lesions ($p < 0.01$) and progressively decreased in premalignant to malignant oral lesions. No significant difference ($P = 0.9024$) was observed in HLA-E expression in benign, premalignant and malignant lesions. Twenty-five (49%) out of 51 oral lesions were HPV positive, of which 13 (52%) presented high HLA-G expression and 7 (28%) with HLA-E overexpression. Pearson correlation between HLA-G and HLA-E in oral biopsies HPV-infected demonstrated an inverse correlation ($r = -0.3944$, $p < 0.05$), indicating the HLA-G overexpression and HLA-E low expression in oral lesions infected with HPV. **Conclusion:** HPV infection seems to be related to up-regulation of HLA-G genes, resulting in overexpression of HLA-G protein and apparently resulting in immune response evasion of HPV-infected oral lesion and might contribute to HPV persistent infection and carcinogenesis.

Key Words: HLA-G, HLA-E, HPV, oral cancer, immune response.

INTRODUCTION

Immune response against virus-infected and/or tumor cells is dependent of classical Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules, HLA class I and II, T cell and Natural

Killer Cell (NK) responses. In early stages of oral cancer development, cellular or Th1 branch of immune response is triggered while in poorly differentiated tumors and with metastasis, the immune response is polarized to Th2 response (AGARWAL et al, 2003). Non-classical HLA molecules, HLA-G and HLA-E are usually expressed in extravillous cytotrophoblast cells and, together with the absence or low expression of classical HLA class I molecules, prevents the attack of natural killer (NK) and cytotoxic T cells, respectively, protecting the semi-allogenic fetus from maternal rejection (ROUAS-FREISS, 1997). Aberrant expression of non-classical molecules could represent a strategy to viral infection persistence and tumor progression in cancer patients; previous studies verified aberrant HLA-G expression in virus-infected and/or tumor cells (HANSEL et al., 2005; LAFON et al., 2005). A similar mechanism has been proposed to HLA-E molecule, although little information is available about the cell surface expression of HLA-E in human tumors. To reach the cell surface, HLA-E needs to bind to a leader peptide derived from HLA class I molecules, and the groove of HLA-E presents the highest affinity for the HLA-G leader peptide (RODGERS and COOK, 2005). Down-regulation of HLA class I seems to impair HLA-E to be delivered to cytoplasmatic membrane, allowing the virus and/or tumor cells to also escape NK immune surveillance (FORTE et al., 2005). In addition to down-regulation of HLA class I expression, IL-10 seems to be one of the responsible factors for the up-regulation of HLA-G and HLA-E itself it is possible promotes of Th2-skewing state and the production of IL-10, establishing a vicious circle of immune abrogation in cancer (UROSEVIC and DUMMER, 2003).

To evaluate the possible associations between HLA non-classical (G and E) molecules and cancer, as well as virus-infected cells, we assessed the expression of these molecules in oral biopsies stratified according to the severity of the lesion and the HPV infection.

MATERIAL AND METHODS

Specimens

Fifty-one formalin-fixed and paraffin-embedded oral biopsies were selected from the Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University (USP) archives, between 1992 and 2005, and their use was approved by the Brazilian Institutional Ethical Committee on Human Experimentation. Tumor grades were evaluated histologically by experienced pathologists in tissues stained with hematoxylin and eosin and all the samples were graded according to the criteria recently proposed by VAN DER WAAL e AXÉLL, (2002). The oral biopsies were stratified according to histological differentiation in benign lesion (hyperplasia and papilloma), premalignant lesions (lichen planus and leukoplakia with and without dysplasia) and malignant (squamous cell carcinoma). Of the 51 oral lesions, 14 (27%) out of were diagnosed as oral hyperplasia (OH), 4 (8%) were oral squamous papilloma (OSP). Out of 16 premalignant oral lesions, 5 (10%) were oral lichen planus, 11 (22%) were oral leukoplakia without and with dysplasia (mild to severe). In malignant group, 17 (33%) were oral squamous cell carcinoma. (OSCC).

Immunohistochemistry for HLA-G and HLA-E

The sections were dewaxed in hot xylene (100 °C) for 10 a 20 seconds, followed by three consecutive xilol baths (room temperature), rehydrated in graded alcohol ethanol (90%, 70% and 50%) and rinsed several times in distilled water. For antigen retrieval, the sections were immersed in 10 mM sodium citrate ($C_6H_5Na_3O_7$) buffer, pH 6.0, and submitted to steam heating for 40 minutes, at 95 °C. The sections were cooled at room temperature and were immersed in 2 changes of aqueous hydrogen peroxide 3% and methanol (v/v), for 15 min each change. The sections were rinsed with three consecutive PBS baths, for 5 minutes each one.

To unspecific blockage, the sections were incubated with skim milk 1%, for 30 minutes, and rinsed in distilled water. HLA-G and HLA-E expression were immunohistochemically assayed by immunoperoxidase method (LSAB, DAKO, Glostrup Denmark). The sections were incubated with primary monoclonal antibody raised against HLA-G, (diluted 1:500; clone 87G which recognizes both membrane-bound and soluble forms of HLA-G - HLA-G1 and HLA-G5) and HLA-E (diluted 1: 1000, clone MEM-E/02 specifically reacts with denaturated heavy chain of human HLA-E). Both primary antibodies were kindly provided by Dr Edgardo D Carosella, from Service de Recherche en Hémato-Immunologie, Hôpital Saint Louis, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, France. The slides were placed in a humidified chamber, at room temperature, overnight. After incubation with primary antibodies, immunoperoxidase staining was performed using biotinylated secondary antibody and streptavidin-peroxidase complex (LSAB, DAKO), at 37°C for 30 minutes, in accordance with the manufacturer's instructions. Between each stage of the above procedure, the sections were carefully rinsed with 3 times changes of 1M phosphate-saline buffered (KH_2PO_4 , PBS). Subsequently, the sections were incubated in solution containing 60mg of diaminobenzidine (GIBBICO, Gaithersburg, Maryland, USA), dissolved in 100ml of PBS and 2ml of peroxidase 6%, followed by distilled water rinses. After that, the sections were counterstained with Carrazzi's hematoxylin for 1 minute, following several rinses with distilled water. The sections were dehydrated in three absolute alcohol changes, followed by two immersion changes in xilol, allowed to dry air and assembled on Permount mounting medium (MERCK, Darmstadt, Germany). Two controls were included for each section: positive and negative. The positive control was a section of human extravillous cytotrophoblast. The negative control was also human extravillous cytotrophoblast, in which the primary antibody was omitted from the assay and replaced by PBS.

HLA-G and HLA-E image analysis quantification

Cytoplasm and plasmatic membrane (HLA-G) and cytoplasmic membrane (HLA-E) were automatically quantified by a computer-assisted system (Image-Pro Plus - Cybernetics, MD, USA), which includes a microscope, a digital camera and a software package. A mean of eight to ten random microscope fields was selected in order to analyze 1000 labeled nuclei per biopsy in all patients. The image acquisition of 51-oral-lesion sections was performed on an electronic photomicrograph and the image was processed and analyzed by the software. For each slide, the digitalized image segmentation was controlled interactively through the RGB color filter existent in the software program. The automatic count of positive nuclei was established and expressed as percentage and the classification of HLA-G and HLA-E immunohistochemistry expression was modified from PALMISANO et al. (2002): HLA-G and HLA-E expression was classified as negative when cytoplasm membrane labelling was absent to $\leq 25\%$, while the expression was considered positive when > 25 to 100% of the cells were labelled.

HPV detection and typing.

Genomic DNA was obtained from 2 sections paraffin blocks (10 μ m each), according to modified protocol proposed by BETTINI et al.(2003) amplified by PCR using the primers GP5+ and GP6+ (MANOS et al.,1989), which amplify a 150 bp DNA fragment, was used for generic HPV amplification. The amplification was made together with a set of primers for a beta globin (PCO3 and PCO4) gene (PCO3+ CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC e PCO4+ TCA CCA CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC), as an internal control of amplification. The generic HPV positive samples were amplified with specific primers for

HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV6 and HPV11 how described by WALBOOMERS et al.,(1999).

The amplification procedure for HPV detection and typing was carried out using a final volume of 25 μ l. The reaction mixture included 20 ng of genomic DNA, 0.20 mM deoxynucleoside triphosphate (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 0.6 μ M of each primer (IDT, IA, USA), 1.25 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Brazil), 3 mM MgCl₂, and 1x buffer (Invitrogen, Brazil). The cycling conditions to almost all generic and HPV types consisted of an initial denaturation step of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min and a final extension cycle of 72°C for 10 min. For amplification HPV11 was used an annealing temperature of 60°C. PCR products were separated by 10% nondenaturing polyacrylamide gels followed by a silver staining procedure how described by SANGUINETTI et al. (1994).

Statistical Analysis

To the association between HLA-G and HLA-E in oral lesions, Chi-squared test for Independence was used, considering a contingency table higher than 2 X 2. HLA- G and HLA-E expression *versus* oral lesions. The statistical test to compare –G and –E molecules and the presence of HPV infection was Fisher’s exact test. Since the data met the assumptions for parametric tests, variance One Way ANOVA with Bonferroni’s posttest to multiple comparison was applied to compare quantitative analysis of HLA-G and –E in association with oral lesions stratified according to histological diagnosis. Pearson correlation test was performed to compare quantitative expression of HLA-G and HLA-E in oral lesions infected with HPV. P values were two-sided and the level of significance was set at ≤ 0.05 . All data was analysed using the GraphPad Instant software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

The results of HLA-G and HLA-E quantitative immunohistochemistry expression in oral biopsies infected with HPV are demonstrated in Table 1 and 2, as well as Figures 1 to 3.

Table 1 shows the detection of HPV DNA in oral lesions, stratified according to histological diagnosis. Out of 51 oral lesions 24 (47%) were infected with HPV, 11 (58%) out of 18 benign lesions, 8 (47%) out of 16 premalignant lesions and 5 (28%) out of 17 oral squamous cell carcinoma (OSCC). Among benign lesions infected with HPV, 8 (44%) were diagnosed as oral hyperplasia, being 5 (42%) infected with HPV18, 1 (8%) with HPV11 and 1 (8%) HPV type not identified (NI) with the set of primers proposed in the present study. In addition, out of 18 benign lesions HPV-infected, 3 (17%) were oral squamous papilloma, being 2 (11%) HPV18/31/6 and 1 (6%) was NI. In premalignant group HPV-infected, 4 (25%) out of 16 were lichen planus, which 1 (6%) was HPV18, 1 (6%) HPV18/6 and 1 (6%) HPV was not identified. Moreover, among premalignant oral lesions, 4 (25%) were leukoplakia with severe dysplasia. In leukoplakia with dysplasia, 2 (13%) was HPV18, 1 (8%) and 2 (13%) HPV type not identified. Finally, among OSCC infected with HPV, 2 (12%) out of 17 were HPV18, 1 (6%) HPV31/6, 1 (6%) HPV18/31/6 and 1 (6%) HPV type not identified. HPV16 was not found in any oral lesions evaluated in the present study.

In Table 2 and Figure 1 to 3 are demonstrated HLA-G and HLA-E quantitative immunohistochemistry expression in comparison to oral lesions groups. HLA-G and HLA-E expression were stratified in high expression of both molecules (G+/E+), high and low expression (G+/E- or G-/E+) and low expression of HLA-G and HLA-E (G-/E-). Table 2 demonstrates deregulation of HLA-G and HLA-E (G+/E+, G+/E- and G-/E+), mainly verified in benign and premalignant lesions of oral lesions and was not frequently found in OSCC (Table 2, P = 0.007). The close association was observed between oral lesions HPV-infected

and HLA-G and HLA-E deregulation ($P = 0.0025$). The deregulation of non classical molecules was verified with more frequency in oral lesions infected with HPV18 than oral lesions presenting infection with two or three HPV types. The quantitative evaluation of HLA-G and HLA-E expression (Figure 1), demonstrates that the high expression of HLA-G was predominantly in benign lesions and steadily decreasing in premalignant and malignant oral lesions ($P=0.0196$). In contrast, no difference was observed in HLA-E and oral lesions from benign, premalignant and malignant groups. Interestingly, an inverse correlation (Figure 2; $r = - 0.3944$; $P = 0.0462$.) was observed between high HLA-G expression and low HLA-E expression in oral lesions HPV-infected, might indicate that HLA-G and HLA-E deregulation could be related to HPV infection more than cellular atypia or cancer.

Table 1 –HPV DNA detection in 51 patients with oral lesions stratified according to histological diagnosis in benign (Hyperplasia and papilloma), premalignant (lichen planus, leukoplakia with and without dysplasia) and malignant (OSCC).

	HPV Positive	HPV Negative	HPV11	HPV18	HPV18/31/6	HPV18/6	NI
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)	n (%)
Benign (n=18)	11(58)	7 (37)	1 (5)	5 (26)	2 (11)	0	3 (16)
Premalignant (n=16)	8 (47)	8 (47)	0	4 (24)	0	1 (6)	3 (18)
Malignant (n=17)	5 (28)	12 (67)	0	2 (11)	2 (11)	0	1 (6)
Total	24(47)	27 (53)	1 (4)	11 (46)	4 (17)	1 (4)	7 (29)

NI = HVP type not identified; OSCC = oral squamous cell carcinoma.

Table 2 – HLA-G and HLA-E quantitative immunohistochemistry expression in 51 patients with oral lesions stratified according to histological diagnosis in benign (Hyperplasia and papilloma), premalignant (lichen planus, leukoplakia with and without dysplasia) and malignant (OSCC).

	G(+)/E(+)	G(-)/E(-)	G(+)/ E(-)	G(-)/E(+)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n
Benign ^(a)	4 (21)	2 (11)	10 (53)	2 (11)	18
Premalignant	1 (12)	1 (6)	8 (47)	6 (35)	16
Malignant	3 (17)	8 (44)	4 (22)	2 (11)	17
Total n(%)	8 (16)	11 (22)	22 (43%)	10 (20)	51
HPV Positive ^(b)	5(21)	0	14(58)	5(21)	24
HPV Negative	3(11)	11(41)	8(30)	5(19)	27
HPV 11	0	0	1(100)	0	1
HPV18	4(36)	0	4(36)	3 (36)	11
HPV18/31/6	0	0	4(100)	0	4
HPV18/6	0	0	1 (100)	0	1
NI	1(14)	0	5 (71)	1(14)	7

HLA-G(+) and HLA-E(+) = $\geq 25\%$ of cells labelled, HLA-G (-) and HLA-E(-) = $<25\%$ of cells labelled. OSCC = oral squamous cell carcinoma.

^(a) HLA- G and HLA-E expression *versus* oral lesions. Chi-squared test for Independence, P = 0.007;

^(b) HLA- G and HLA-E expression *versus* HPV infection. Fisher's Exact Test, P = 0.0025.

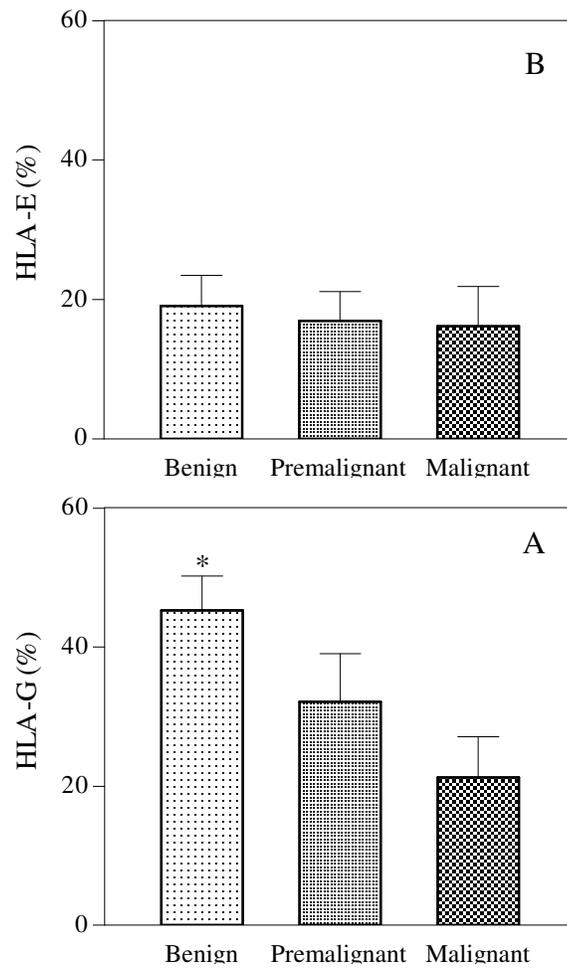


Figure 1 – Quantitative expression of non-classical molecules (HLA-G e HLA-E) in 51 oral lesions classified in benign (hyperplasia and papilloma), pré-malignant (lichen planus and leucoplakia) and malignant (oral squamous cell carcinoma). A) Quantitative expression of HLA-G, one way ANOVA ($P=0.0196$) with Bonferroni's multiple comparison posttest (*) benigna *versus* maligna; $p<0.05$. B) Quantitative expression of HLA-E, one way ANOVA ($P = 0.9024$).

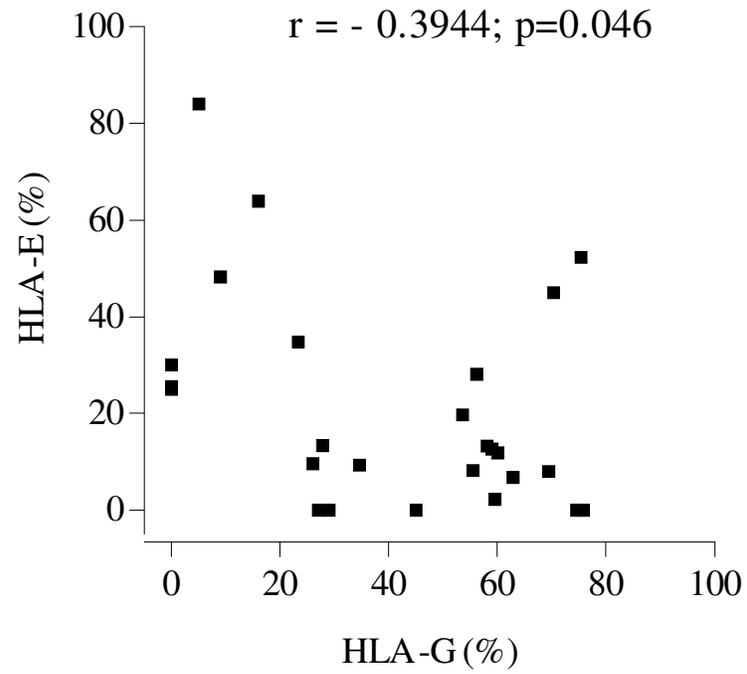


Figure 2 – Pearson correlation between HLA-G and HLA-E immunohistochemistry expression in oral lesions HPV- infected. $r = -0.3944$; $P = 0.0462$.

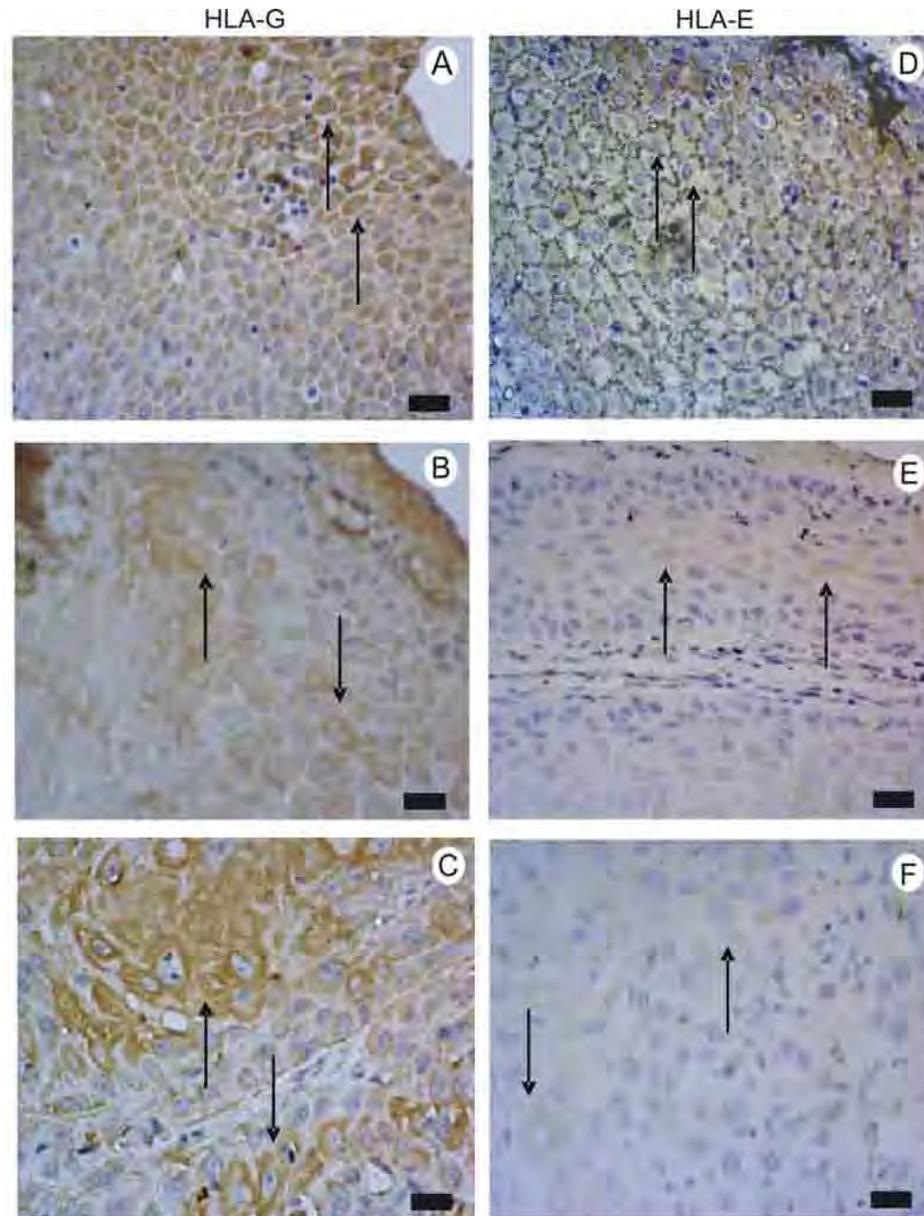


Figure 3 – Oral lesions HPV-infected presenting HLA-G and HLA-E immunolabelling in cytoplasmic membrane and cytosol (arrows). A) HLA-G expression in oral hyperplasia showing intense cytoplasmic immunolabelling; B) HLA-G expression in oral leukoplakia without dysplasia, showing moderate intensity of immunolabelling; C) HLA-G expression in oral squamous cell carcinoma showing intense cytoplasmic immunolabelling; D), E) and F) HLA-E expression showing discrete to moderate immunolabelling in, respectively, oral hyperplasia leukoplakia without dysplasia and oral squamous cell carcinoma. Scale bars equals to 25mm.

DISCUSSION

HPV has been found in oral lesions, being considered a risk factor to oral carcinogenesis by disrupting cellular control and, in almost all cases, virus infection is cleared followed by activation of the host immune response. However, occasionally the lesions do not regress and malignant progression of the disease can follow under appropriated environmental conditions. Persistent viral infection seems to be required for neoplastic progression and failure of virus clearance is attributed to a poor immunological response. (O'BRIEN and CAMPO, 2002).

Despite the fact that trophoblasts and cancer are both immunogenic, they are able to escape from host immunosurveillance, and the precise mechanisms involved in this process are surprisingly similar in both situations (WILCZYNSKI, 2006). In the present study we found high HLA-G and low HLA-E expression in benign, decreasing in premalignant and OSCC oral lesions. Moreover, HLA-G high expression was closed associated with the presence of HPV DNA. It does not seem to surprise that benign and premalignant oral lesions which presented high HLA-G levels, also presented more frequency of the HPV infection.

HLA-G, which has been found to have immunosuppressive and immunomodulatory roles in the cancer development (TRIPATHI e AGRAWAL, 2006). As HLA-G can inhibit the functions of T and NK cells high concentration of these molecules, should systemically or at the tumor site reduce the immune surveillance and thus favour the progression of cancer. HLA-G is responsible for the escape of tumor cells from NK lysis, interacting directly with inhibitor receptors like killing immunoglobulin-like receptors (KIRs) or indirectly by stabilising the surface expression of HLA-E molecules. In vitro, the HLA-G tumor cells strongly enhance by TH1 cytokines like IFN- gamma whereas TH2 cytokines (e.g. IL-4, IL-10) had minor effects (REBMANN et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2005). CD4+ T cells secrete IL-10 in response to virus capsid protein presented by dendritic cells, and deviate

CD8+ T cells responding to a linked MHC class I-restricted epitope to reduce IFN-gamma production, resulting in low response of CD8 T cells against virus-infected tumor cells (LIU et al, 2006). We found an inverse correlation between high HLA-G expression and low HLA-E in the majority of the oral lesions infected with HPV. Up-regulation of HLA-G allows the stabilization of HLA-E in cell surface and may be potentializing immunosuppressive response (ROUAS-FREISS et al., 2005). However, cumulative genetic and molecular changes in tumor cells lead to the appearance of HLA-E in a limited number of tumor cell lines, related to HLA class I down-regulation or mutation in subunits of class I subunits (MARIN et al., 2003). Recent study demonstrated that HLA-E expression at the cell surface of melanoma cells decreased their susceptibility to CTL lysis (DERRE et al., 2006). In our study, HPV virus was present more frequently in oral lesions with high expression of both non-classical molecules (G+/E+) and in different level expression with HLA-G high and HLA-E low (G+/E-) or HLA-G low and HLA-E high (G-/E+). HLA-E high expression was observed in few oral biopsies, some infected with HPV. The aberrant HLA-E expression might be of particular biological relevance in those HLA tumor phenotypes that express a single HLA-A allele when NK inhibition is markedly reduced due to the down-regulation of HLA-B and -C alleles (ALGARRA et al., 2004). We can conclude that aberrant HLA-G and low or absence of HLA-E expression is closely associated to oral proliferative and malignant oral HPV-related, suggesting that different levels of both non-classical molecules could be a strategy of HPV to escape from immunosurveillance mediated by NK and CTLs lysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was financially supported by CAPES, a Brazilian research funding organization. We wish to thank Ana Maria Rocha for excellent technical assistance.

REFERENCES

- AGARWAL, A.; RANI, M.; SAHA, G. K.; VALARMATHI, T. M.; BAHADUR, S.; MOHANTI, B. K.; DAS, S. N. Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. **Immunol Invest**, v.32, n.1-2, Feb, p.17-30. 2003.
- ALGARRA, I.; GARCIA-LORA, A.; CABRERA, T.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. **Cancer Immunol Immunother.** v.53, n.10, p.904-1010, 2004.
- DERRE, L.; CORVAISIER, M.; CHARREAU, B.; MOREAU, A.; GODEFROY, E.; MOREAU-AUBRY, A.; JOTEREAU, F.; GERVOIS N.; Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. **J Immunol.**, v.177, n.5, p.3100-3107, 2006.
- FORTE, P.; BAUMANN, B.C.; WEISS, E.H.; SEEBACH, J.D. HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading. **Am J Transplant.** 5(9):2085-93, 2005.
- HANSEL, D.E.; RAHMAN, A.; WILENTZ, R.E.; SHIH, I.E.M.; MCMASTER, M.T.; YEO, C.J.; MAITRA, A. HLA-G upregulation in pre-malignant and malignant lesions of the gastrointestinal tract. **Int J Gastrointest Cancer.** v.35, n.1, p.15-23, 2005.
- LAFON, M.; PREHAUD, C.; MEGRET, F.; LAFAGE, M.; MOUILLOT, G.; ROA M, MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. **J Virol.** v.79, n.4, p.226-237, 2005.

LIU, X.S.;DYER , J.;LEGGATT,G.R.;FERNANDO,G.J.;ZHONG, J.;THOMAS , R.;FRAZER,I.H.Overcoming original antigenic sin to generate new CD8 T cell IFN-gamma responses in an antigen-experienced host. **J Immunol.** v.77,n.5,p.2873-2879,2006.

MARIN,R.;RUIZCABELLO,F.;PEDRINACI,S.;MENDEZ,R.;JIMENEZ,P.;GERAGHTY,D. E.;GARRIDO,F.Analysis of HLA-E expression in human tumors. **Immunogenetics.** v.54,n11,p.767-775,2003.

REBMANN, V.; REGEL, J.; STOLKE, D.; GROSSE-WILDE, H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. **Semin Cancer Biol.** Oct;v.3,n.5,p.371-377,2003

RODGERS JR, COOK RG. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. **Nat Rev Immunol.** 5(6):459-71, 2005.

ROUAS-FREISS, N.;GONCALVES, R.M.;MENIER, C.;DAUSSET, J.;CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v. 94,n.21,p.11520-11525, 1997.

ROUAS-FREISS, N.;MOREAU, P.;FERRONE, S.;CAROSELLA, E.D. HLA-G Proteins in Cancer: Do They Provide Tumor Cells withan Escape Mechanism? **Cancer Res**,v.65,p.22, 2005.

TRIPATHI, P.;AGRAWAL, S.Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. **Cancer Invest**,v.24,n.2,p.178-186, 2006.

UROSEVIC M, DUMMER R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer-different stories with the same message. **Semin Cancer Biol.**13(5):337-42, 2003.

WILCZYNSKI JR. Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. **Chemotherapy**; 52(3):107-10. 2006.

CD4, CD25 AND CD28 QUANTITATIVE EXPRESSION IN ORAL LESIONS
INFECTED WITH THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS

Paula Andrea Gabrielli Fregonezi¹, Renata Toscano Simões², Renata Casellato Mazon¹,
Edson Garcia Soares³, Carla Patrícia Martinelli Kläy³, Eduardo Antonio Donadi², Christiane
Pienna Soares¹.

¹ Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Araraquara,
UNESP, University of São Paulo State, Araraquara, São Paulo, Brazil.

² Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão
Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo
(USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Correspondence and reprint requests to: Christiane Pienna Soares, School of
Pharmaceutical Sciences of Araraquara, UNESP, University of São Paulo State. Rua
Expedicionarios do Brasil, 1621, Centro, 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel: +55
16 33016554; Fax: +55 16 3301 6559.

ABSTRACT

The central role of T cells in antitumor immunity is well established. However, tumor progression, often frequent by seen in the presence of substantial lymphocytic infiltration, suggests that these cells are not capable of mounting an effective immune response to modulate proliferative activity of benign cells and neither to modulate tumor growth. Considering that HPV infection could deregulate the host immune response, permitting the persistence of viral infection as well as contributing to malignant cell transformation, the present study aimed to investigate tissue expression of T cell receptors CD4, CD25 and CD28 in lymphocyte infiltrate of oral lesions HPV-infected. Seventy-nine formalin-fixed and paraffin-embedded oral biopsies were retrospectively selected and CD4, CD25 and CD28 immunoperoxidase expression were quantitatively evaluated by computer-assisted image analyze method. Out of 79 oral lesions 30 (38%) were infected with HPV and 49 (62%) were not infected, being mainly found HPV18, followed by HPV18/31/6, HPV31/6 and HPV6/11. Thus, 2 HPV types (HPV31/6, n=2) or 3 types (HPV18/31/6, n=5). Downregulation of CD4/CD25 and CD25/CD28 ($P=0.037$) was observed in malignant oral lesions and in all oral lesions groups HPV-infected. The analysis of the T cell receptors individually, evaluated in comparison with histological grades, demonstrated lower expression of CD4 and higher expression of CD28 was observed in malignant oral lesions, when compared with benign lesions ($P=0.005$). In conclusion, the downregulation of T cell receptors seems to be a way to HPV infections persistence, which could represent a risk factor to oral malignant cell transformation.

Key Words: T cell, CD4, CD25, CD28, HPV and oral cancer.

INTRODUCTION

Despite the presence of lymphocyte infiltration at the tumor site, immune response is apparently incapable of controlling tumor growth (LADANYI et al., 2004). Several potential mechanisms may explain the lack of effectiveness of antitumor response, including insufficient peptide presentation, production of immunosuppressive factors by cells in the tumor microenvironment or lack of costimulatory response (KIESSLING et al., 1999). Accumulated evidence has indicated that T lymphocytes infiltrating human neoplasm may be functionally defective, incompletely activated or anergic (BECKER et al., 1993). High risk human papillomavirus (HPV) types are strongly associated with HPV persistence and cancer development, especially in the absence of a lymphoproliferative response against the virus (TINDLE, 2002). Previous studies have demonstrated that HPV may subvert host immune response, deregulating antigen presentation to cytotoxic T cells (ALCAMI, 2000). Besides, tumor cell evasion from the immunological surveillance has been considered essential to cancer development and progression. Human solid tumors are often infiltrated by lymphocytes, mostly cytotoxic T cells, which are capable of specific lysis of autologous tumor cells. In addition, tumor-specific CD4+ T cells could be isolated from lymphocytes infiltrating human neoplasms, which may induce cytokine production that permits tumor cell lysis (LOKE and ALLISON, 2004). The production of interleukin-2 (IL-2) and the expression of the IL-2R (CD25) and costimulatory molecules like CD28 on CD4 T cells are important to trigger cellular signals to T cell stimulation (WANG and CHEN, 2004). Considering that the absence of CD28 and CD25 molecules on CD4 cells may prevent an efficient T cell immune response against viral infection and tumor cells, the present work aimed to investigate the quantitative expression of CD4, CD25 and CD28 molecules in oral lesions associated with HPV-infection, stratified according to the severity of the lesion.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

Seventy-nine formalin-fixed paraffin-embedded oral biopsies were selected from the Department of Pathology archives, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), between 1992 and 2005. The study was approved by the local Institutional Ethics Committee on human experimentation. Tumor grade was histologically evaluated by experienced pathologists in tissues stained with hematoxylin and eosin. Lesion severity was classified according to the criteria recently proposed by Van der Waal and Axell, 2002. Oral biopsy lesions were stratified according to the histological differentiation into benign (hyperplasia and papilloma), premalignant (lichen planus and leukoplakia presenting or not dysplasia) and malignant (squamous cell carcinoma). Of the 79 oral lesions, 19 (61%) out of 31 benign lesions were diagnosed as oral hyperplasia (OH), 12 (39%) were oral squamous papilloma (OSP). Out of 25 premalignant oral lesions, 21 (84%) were oral leukoplakia without and with dysplasia and 4(16%) were oral lichen planus. Out of 21 oral leukoplakia, 3 (14%) did not present dysplasia (LK) and 18 (86%) were diagnosed as leukoplakia with displasia (DLK), 9 (43%) mild and 9 (43%) moderate to severe cellular atypia. In malignant group, 24 (100%) were oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Immunohistochemistry for CD4, CD25 and CD28

The sections were dewaxed in hot xylene (100 °C) for 10 a 20 seconds, followed by three consecutives xilol baths (room temperature), rehydrated in graded alcohol (90%, 70% and 50%) and rinsed several times in distilled water. For antigen retrieval, the sections were immersed in 1 mM EDTA buffer, pH 8.0, and submitted to steam heating for 40 minutos, at 95 °C. The sections were cooled at room temperature and were immersed in 2 changes of aqueous hydrogen peroxide 3% and methanol (v/v), for 15 min each change. The sections

were rinsed with three consecutive PBS bath, for 5 minutos each one. To inespecific blockage, the sections were incubated with skim milk 1%, for 30 minutes seguir, and rinsed several times in distilled water. T cell receptors CD4, CD25 and CD28 expression, localized at cytoplasmatic membrane, were immunohistochemically assayed by immunoperoxidase method (LSAB, DAKO, and Glostrup Denmark). The sections were incubated with primary monoclonal antibody raised against monoclonal antibodies anti-CD4 (diluted 1:60, Santa Cruz Biotechnology, Newcastle, UK), anti-CD25 (diluted 1:300, Santa Cruz Biotechnology) and anti-CD28 (diluted 1:300, Santa Cruz Biotechnology). The slides were incubated in a humidified chamber, at room temperature, overnight. After incubation with primary antibodies, immunoperoxidase staining was performed using biotinylated secondary antibody and streptavidin-peroxidase complex (LSAB, DAKO), at 37°C for 30 minutes, in accordance with the manufacturer's instructions. After, the sections were carefully rinsed with 3 times changes of 1M phospate-saline buffered (KH_2PO_4 , PBS). Subsequently, the sections were incubated in solution containing 60mg of diaminobenzidine (GIBICO, Gaithersburg, Maryland, USA), dissolved in 100ml of PBS and 2ml of peroxidase 6%, and followed by distilled water rinses. After that, the sections were counterstained with Carrazzi's hematoxylin for 1 minute, following several rinses with distilled water. The sections were dehydrated in three absolute alcohol changes, followed by two immersion changes in xilol, allowed to air dry and mounted on Permount mounting medium (MERCK, Darmstadt, Germany). Two controls were included for each section: positive and negative. The positive control to CD25 and CD28 was sections of human tonsil while to CD4 were sections of human lymphonodes. The negative control was the same sections used in positive control, in which the primary antibody was omitted from the assay and replaced by PBS.

CD4, CD25 and CD28 image acquisition and computer assisted quantification

Cytoplasm membrane (CD4, CD25 and CD28) were automatically quantified by a computer-assisted system (Image-Pro Plus - Cybernetics, MD, USA) which includes a microscope, a digital camera and a software package. A mean of eight to ten random microscope fields were selected in order to analyze 1000 cells with cytoplasmatic membrane labelling per biopsy in 79 patients. The image acquisition of all oral lesions sections was performed on an electronic photomicrograph and the image was processed and analyzed by the software. For each slide, the digitalized image segmentation was controlled interactively through the RGB color filter existent in the software program. The automatic count of positive cytoplasmatic membrane was established and expressed as percentage and the classification of CD4, CD25 and CD28 immunohistochemistry expression was modified from FEINMESSER et al., (2004) CD4, CD25 and CD28 expression was classified as negative when cytoplasm membrane labelling was absent to $\leq 15\%$ while the expression were considered positive when > 15 to 100% of the cells were labelled.

HPV detection and typing.

Genomic DNA was obtained from 2 sections paraffin blocks (10 μ m each), according to modified protocol proposed by (BETTINI et al., 2003) amplified by PCR using the primers GP5+ and GP6+ (MANOS et al., 1989), which amplify a 150 bp DNA fragment, were used for generic HPV amplification. The amplification was made together with a set of primers for a beta globin (PCO3 and PCO4) gene (PCO3+ CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC e PCO4+ TCA CCA CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC). as an internal control of amplification. The generic HPV positive samples was amplified with specific primers for HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV6 and HPV11 how described to WALBOOMERS et al., (1999).

The amplification procedure for HPV detection and typing was carried out using a final volume of 25 μ l. The reaction mixture included 20 ng of genomic DNA, 0.20 mM deoxynucleoside triphosphate (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 0.6 μ M of each primer (IDT, IA, USA), 1.25 U *Taq* polymerase (Invitrogen, Brazil), 3 mM MgCl₂, and 1x buffer (Invitrogen, Brazil). The cycling conditions to almost all generic and HPV types consisted of an initial denaturation step of 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min and a final extension cycle of 72°C for 10 min. For amplification HPV11 was use an annealing tempetrature of 60°C. PCR products were separated by 10% nondenaturing polyacrylamide gels follow of a silver staining procedure how described by SANGUINETTI et al, (2004).

Statistical Analysis

To the association between CD4, CD25 and CD28 expression and oral lesions groups, stratified according histological diagnosis, as well as, the presence of HPV infection, Chi-squared for independence test was used, considering a contingency table higher than 2 X 2. HLA- G and HLA-E expression *versus* oral lesions. Since the data met the assumptions for nonparametric tests, Kruskal Wallis test with Dunn's posttest to multiple comparison was applied to compare quantitative analyse of CD4, CD25 and CD28 quantitative expression and oral lesions grouped in benign, premalignant and malignant lesions. P values were two-sided and the level of significance was set at ≤ 0.05 . All data were analysed using the GraphPad Instat software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Considering all oral lesions, HPV DNA was detected in 30 out of 79 (38%) specimens, and in 12 out of 31 (40%) of benign lesions, 13 out of 25 (43%) premalignant lesions and in 5 out of 23 (17%) oral squamous cell carcinoma (OSCC). Among benign lesions infected with HPV, 8 (67%) were diagnosed as oral hyperplasia, being 5 (42%) infected with HPV18 and 1 (8%) with HPV11. Among HPV-infected benign lesions, 4 out of 12 (33%) were oral squamous papilloma, of whom 2 (17%) harbored a triplet HPV infection (HPV18/31/6) and in 2 (17%) the HPV type was not identified with the set of primers used in this study. In premalignant HPV-infected lesions, 3 out of 13 (23%) were lichen planus, harboring HPV18, HPV18/31/6 and an unidentified HPV type, respectively. Among premalignant lesions, 3 (23%) exhibited leukoplakia without dysplasia and 7 (54%) leukoplakia with mild to severe dysplasia. Leukoplakia without dysplasia harbored HPV18, HPV18/31/6 and HPV31/6 (1 case each of). In contrast, in leukoplakia with dysplasia 1(8%) harbored HPV18, 2 (15%) the triplet HPV18/31/6 and in 4 cases (31%) the HPV type was not identified. Finally, among OSCC infected with HPV, 2 out of 5 (40%) were HPV18, 1HPV31/6 (20%), 1(20%) HPV18/31/6 and 1(20%) the HPV type not identified. HPV16 was not found in oral lesions evaluated in the present study (Table 1).

Although few macrophages and dendritic cells were labeled with CD4 and CD25, the majority of cells labeled with these markers were lymphocytes (Figure 2). The comparisons of the quantitative expression of CD4, CD25 and CD28 in oral lesions were performed considering the expression of the three molecules, combinations of two molecules and single ones, as shown in Table 2 and Figure 1. Overall, oral lesions exhibited low or absent immunohistochemistry expression of these molecules (<15% of labeled cells). Considering the expression of three molecules in the same patient, absence or low expression decreased from benign to malignant lesions, i. e., as far as the lesion progressed the co-expression of

these molecules increased. When the combinations CD4/CD25 and CD4/CD28 were considered, absence or low expression increased from benign to malignant lesions, meaning that as far as the lesion progressed the co-expression of these molecules decreased (Table 2). When the expression of these molecules was considered individually, CD4 expression was significantly decreased in patients presenting malignant lesions when compared to patients with benign or premalignant lesions ($p < 0.005$). The expression of CD25 was closely similar for all oral lesions. CD28 was increased in malignant lesions when compared to benign and premalignant lesions ($p < 0.001$). (Figure 1). When the expression of CD4, CD25 and CD28 molecules in several combinations was associated the presence or not of the HPV infection no significant differences were observed; however, patients harboring HPV18 infection exhibited non-significant decreased expression of these molecules in relation to patients harboring other HPV types.

Table 1 – HPV DNA detection observed in 79 oral lesions stratified according to the histological diagnosis into benign (hyperplasia and papilloma), premalignant (lichen planus, leukoplakia presenting or not dysplasia) and malignant (oral squamous cell carcinoma).

	HPV	HPV	HPV18	HPV18/31/6	HPV31/6	HPV6/11	NI	Total
	Positive	Negative						
	N (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n(%)	N(%)
Benign (n=31)	12 (40)	19 (39)	5 (17)	2 (7)	0	2 (3)	3(10)	12 (40)
Pre-malignant (n=25)	13 (43)	12 (24)	3 (10)	4 (13)	1 (3)	0	5(17)	13 (43)
Malignant (n=23)	5 (17)	18 (37)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0	1(3)	5 (17)
Total (n=79)	30 (38)	49 (62)	10 (33)	7 (23)	2 (6)	2 (6)	9(30)	79(100)

NI = non-identified HPV type

Table 2 – Absent and low immunohistochemistry expression (positivity index = zero to < 15%) of CD4, CD25 and CD28 molecules observed in 79 oral lesions, stratified according to the histological diagnosis into benign (hyperplasia and papilloma), premalignant (lichen planus, leukoplakia presenting or not dysplasia) and malign (oral squamous cell carcinoma).

	CD4/25/28	CD4/CD25	CD4/CD28	CD25/CD28
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Benign (n=31)	18 (58)	4 (13)	3 (10)	3 (10)
Premalignant (n=25)	12 (48)	3 (12)	1 (4)	4 (16)
Malignant (n=23)	7 (30)	12 (52)	1 (4)	2 (9)
Total (n=79)	37 (47)	19 (24)	4 (5)	9 (11)

Chi-squared test for Independence, P=0.0347.

Table 3 - Absent and low immunohistochemistry expression of CD4, CD25 and CD28 molecules observed in 79 patients presenting with oral lesions, stratified according the presence or not of the HPV DNA type.

	CD4/25/28	CD4/CD25	CD4/CD28	CD25/CD28	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
HPV positive (n=30)	13 (43)	4 (13)	2 (7)	4 (13)	23 (77)
HPV negative (n=49)	12 (24)	4 (8)	1 (2)	3 (6)	20 (41)
HPV 18 (n=8)	3	1	1	2	7 (88)
HPV 18/31/33 (n=5)	3	0	0	0	3 (60)
HPV 31/6 (n=2)	1	1	0	0	2 (100)
HPV 6 (n=1)	1	0	0	0	1 (100)
NI (n=10)	6	2	0	2	9 (90)

Chi-squared test for independence, p<0.0001.

NI= non-identified HPV type

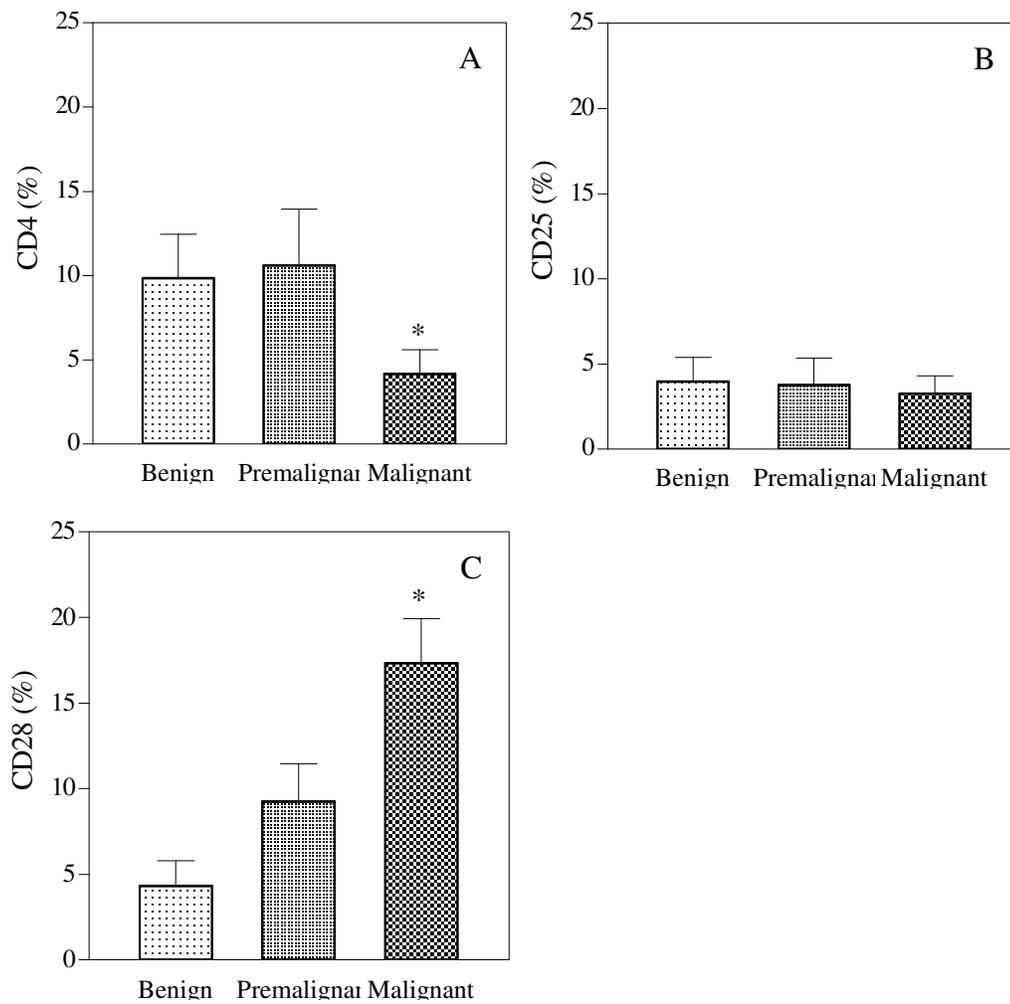


Figure 1 – Quantitative immunoperoxidase expression of CD4, CD25 and CD28 as assessed by a computer image analysis system observed in 79 oral lesions, stratified according to the histological diagnosis in benign (oral hyperplasia and squamous papilloma), premalignant (lichen planus, leukoplakia presenting or not dysplasia) and malignant (OSCC). * P = 0.005; Dunn's post test to multiple comparison benign *versus* malignant, $p < 0.001$

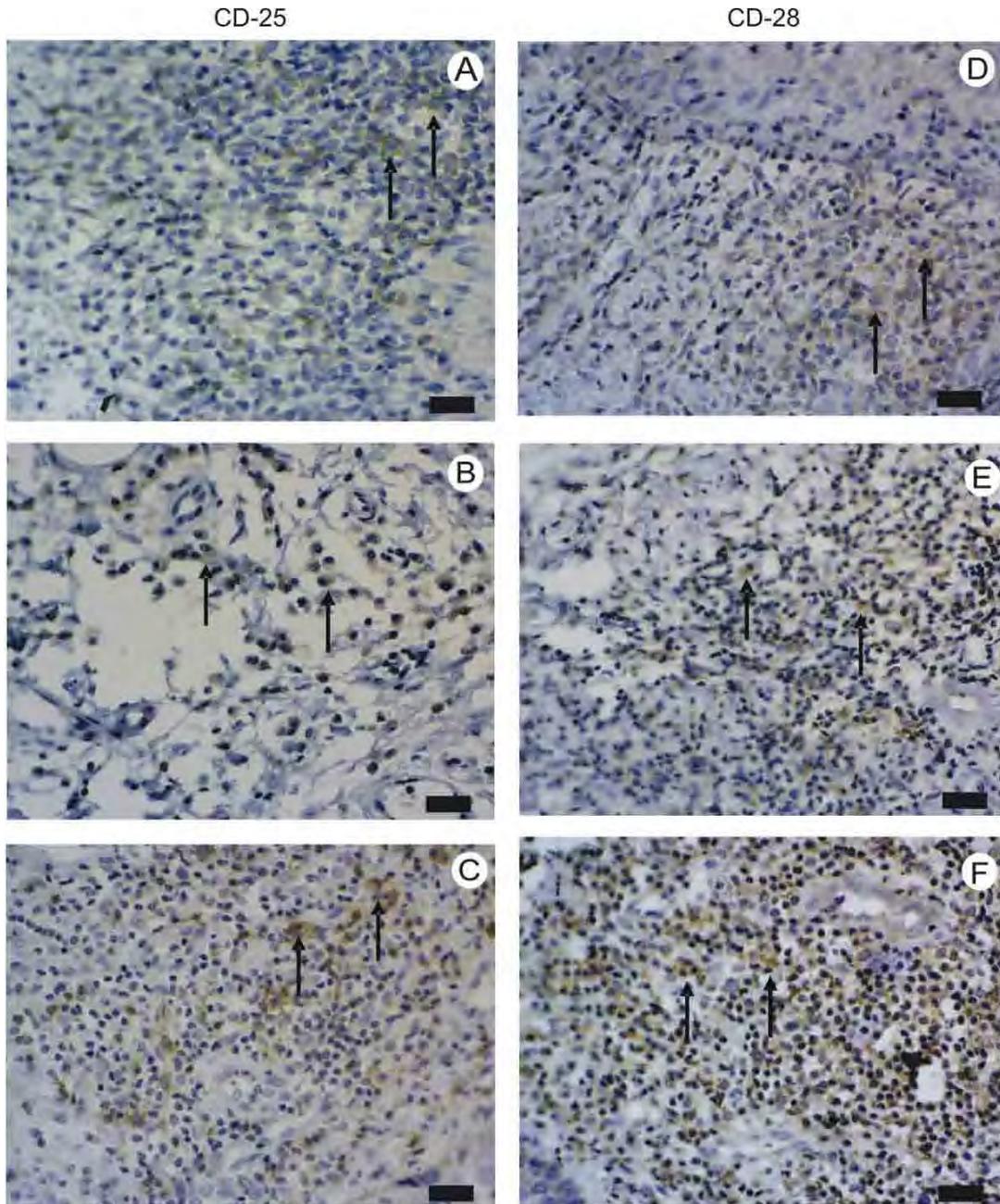


Figure 2 – CD25 (panels A to C) and CD28 (panels D to F) immunolabeling in lymphocytic infiltrates (arrows) of HPV-infected oral lesions, stratified according to the histological diagnosis. A and D oral hyperplasia (moderate labeling), Leukoplakia without dysplasia (discrete intensity) and oral squamous cell carcinoma (high intensity); D) to F) CD28 expression in respectively, oral hyperplasia (moderate intensity), Leukoplakia without dysplasia (discrete intensity) and oral squamous cell carcinoma (high intensity). Scale bars equals to 25 μ m.

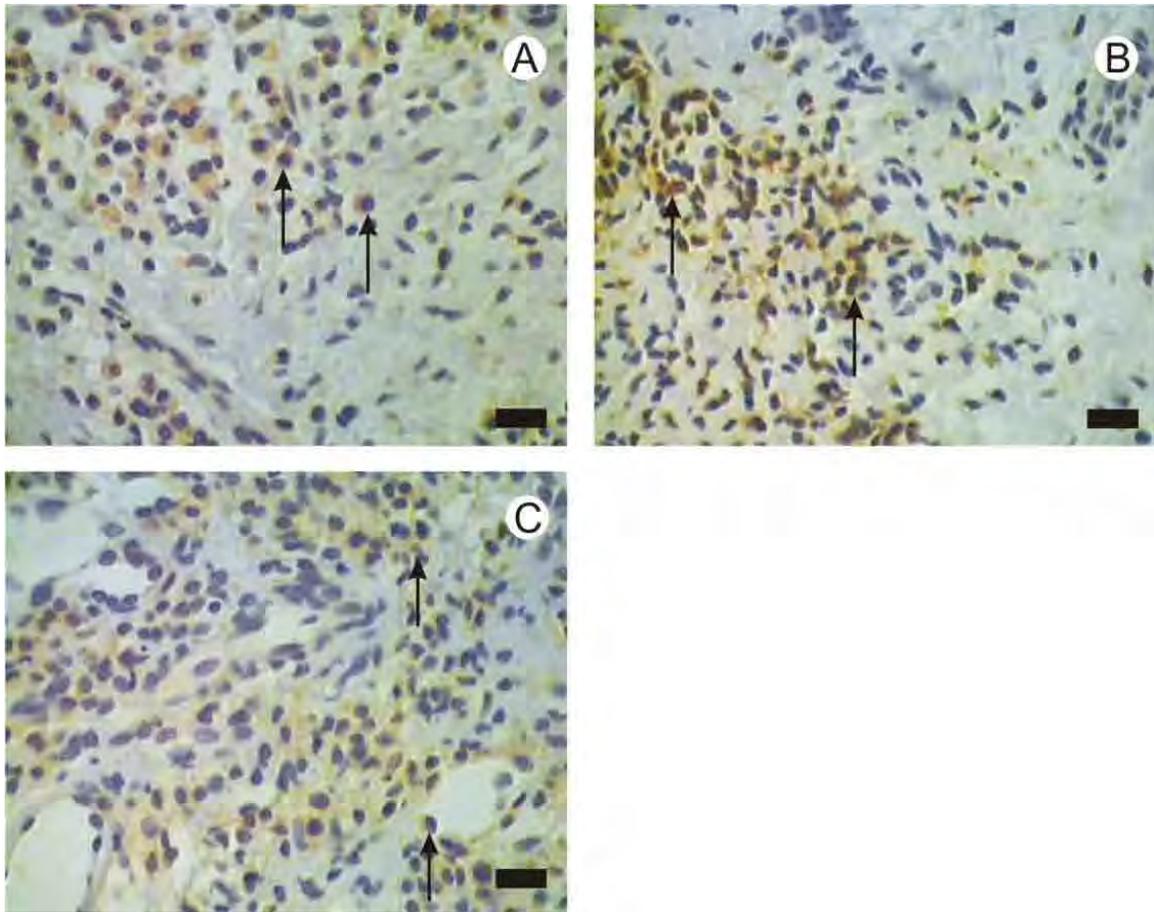


Figure 3– CD4 immunolabelling in lymphocyte infiltrates (arrows) of HPV-infected oral lesions, stratified according to the histological diagnosis. A) oral hyperplasia (moderate labeling), B) leukoplakia without dysplasia (intense labeling) and C) oral squamous cell carcinoma (moderate labeling).

Scale bars = 25 μm .

DISCUSSION

High-risk HPV types have been recognized as a potential risk factor to oral tumorigenesis (HA and CALIFANO, 2004). In the present study, HPV DNA was observed in 38% of all oral lesions, a frequency which is similar to those described by us in other studies as well as by other authors (D’COSTA et al., 1998; MIGUEL et al., 1998, SOARES et al., 2003). Among patients harboring the HPV infection, a high frequency of high-risk HPV types was observed in benign and premalignant oral lesions. Although previous studies have associated high-risk HPV with oral cancer (SAND et al., 2000) we found few OSCC lesions infected with HPV (17%). Moreover, a higher prevalence of HPV18 was observed and, surprisingly HPV16 was absent in this series, contrasting with a recent study that demonstrated HPV16 as the most prevalent type in oral lesions, followed by HPV18 (KREIMER et al., 2005). The high prevalence of HPV18 type in the present study may indicate a particular geographic distribution in the São Paulo State region, since this HPV type has been previously reported in cervical lesions (GUIMARAES et al., 2005). In addition, high risk HPV types have also been observed in benign oral lesions, indicating viral infection in early stages of proliferative oral lesions (PAPAROTTO LOPES and MEEKS, 2001, HABERLAND-CARRODEGUAS et al., 2003). Thus, early detection of HPV in these lesions should be recommended for oral cancer prevention and therapy. It is also worthy to observe that some oral lesions were infected with multiple HPV types, especially in premalignant group and OSCC.

Samples of patients with benign or premalignant oral lesions exhibited closely similar expression of CD4 and CD25; however, samples from patients with OSCC presented low expression of CD4 and high expression of CD28. On the other hand, the expression of CD25 was closely similar irrespective of lesion severity. CD4/CD25 cells may be correspond either

to stimulated T cells or regulatory T cells. CD4+ T cells produce IL-2, which is a critical T cell growth factor because its ability to grow and expand T cells in culture (ANTONY et al., 2006). Likewise, the paracrine action of IL-2 production results in CD25 (IL-2 receptor) expression and it is related to T regulatory survival and the suppressive mechanism (WANG and CHEN, 2004). In addition, among several cytokines IL-2 levels also activates natural killer (NK) cells, resulting in lysis of tumor and infected (RALAINIRINA et al., 2006). In contrast, at first side CD28 higher expression in oral cancer in our study seems to indicate activation of second signal to T cells proliferation. While CD28 T cell expression were in high levels, we found T CD4, TCD25 were in low levels, might indicating that co-stimulatory signals provided by CD28 T cells could not be efficient. However, CD28 present high levels in tumor lymphocytic infiltrate could be found low or absent expression in tumor cells (BECKER et al., 2000).

Although the host immune response to HPV is poorly understood, it has been postulated that the cellular, or Th1 branch of immune response, as opposed to the Th2 or humoral response, plays a crucial role in eliminating the virus (GONCALVES e DONADI, 2004). Evaluating the expression of T cell receptors, we verified a downregulation of those receptors in tumor lymphocyte infiltrate in close association with oral cancer and high-risk HPV infection. We verified a lower CD4+ CD25+ lymphocytes population expression progressively among benign, premalignant and malignant lesions, may indicate less T cell response associated with oral cancer HPV-infected. Low expression or lack of CD4 and CD25 T cell receptors results in defficient T cells responses and tumor and/or virus-infected cells are protected from immune response (ALCOCER-GONZALEZ et al., 2006, DELONG et al., 2005). Presence of CD4+ CD25+ T cells could be response to tumor-specific antigen, resulting to immunological tolerance and evasion of tumor cells from host immune surveillance. Deffective cellular response could contribute to stepwise accumulation of

defects in specific genes regulating cell death and survival mechanisms (OZSARAN et al., 1999). The HPV infection persistence seems to occur in 10% to 30%, mainly associated with high-risk HPV types, tumor progression and a poor immune response, such as observed in the immunosuppressed patients. (HARWOOD et al., 2000; HEARD et al., 2000). Otherwise, in normal individuals, the absent or deficient immune response suggests a HPV strategy to evade from host immunosurveillance (O'BRIEN and SAVERIA, 2002). In conclusion, the downregulation of T cell regulatory receptors, with low expression of CD4/CD25 and CD25/CD28 seems to be a way to HPV infections persistence, which could represent a risk factor to oral malignant cell transformation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was financially supported by CAPES, a Brazilian research funding organization. We wish to thank Ana Maria Rocha, from Pathology Department of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (USP) for excellent technical assistance.

REFERENCES

ALCAMI, A., KOSZINOWSKI, U.H. Viral mechanisms of immune evasion. **Immunol Today**, v.21, n.9, Sep;, p.447-55. 2000

ALCOCER-GONZALEZ, J.M.; BERUMEN, J.; TAMEZ-GUERRA, R.; BERMUDEZ-MORALES, V.; PERALTA-ZARAGOZA, O.;HERNANDEZ-PANDO, R.; MORENO, J.; GARIGLIO, P.; MADRID-MARINA, V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunol.** v.19,n.3,p.481-91, 2006.

ANTONY, P.A.; PAULO, C.M.; AHMADZADEH, M.; AKPINARLI, A.; PALMER, D.C.; SATO, N.; KAISER, A.; HINRICHS, C.S.; KLEBANOFF, C.A.; TAGAYA, Y.; RESTIFO, N.P. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. **J Immunol.** v.176,n.9,p.5255-5266, 2006.

BECKER, J.C.; BRABLETZ, T.; CZERNY, C.; TERMEER, C.; BROCKER, E.B. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. **Int Immunol.**;v. 5,n.12,p.1501-1508. 1993

BECKER J.C.; VETTER, C.S.; SCHRAMA, D.; BROCKER, E.B.; THOR STRATEN, P. Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node. **Eur J Immunol.** v.30,n12,p.3699-706, 2000.

D'COSTA, J.; SARANATH, D.; DEDHIA, P.; SANGHVI, V.; MEHTA, A.R. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. **Oral Oncol**,v.34,p.413-420, 1998.

DELONG, P.; CARROLL, R.G.; HENRY, A.C.; TANAKA, T.; AHMAD, S.; LEIBOWITZ, M.S.; STERMAN, D.H.; JUNE, C.H.; ALBELDA, S.M.; VONDERHEIDE, R.H. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. **Cancer Biol Ther**,v. 4,n.3,p.342-346, 2005.

GONCALVES, M. A. e DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: current concepts. **Braz J Infect Dis**, v.8, n.1, p.1-9. 2004.

GUIMARAES, M.C.; GONCALVES, M.A.;SOARES, C.P.;BETTINI, J.S.;DUARTE, R.A.;SOARES, E.G.;Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. **J Histochem Cytochem**, v.53,n.4,p.509-516, 2005.

HA , P.K.; CALIFANO, J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 188-196, 2004.

HABERLAND-CARRODEGUAS, C.;FORNATORA, M.L.;REICH, R.F.;FREEDMAN, P.D.; Detection of human papillomavirus DNA in oral inverted ductal papillomas. **J Clin Pathol**.,v.56,n.12,p.910-913, 2003.

HARWOOD, C.A.; SURENTERAN, T.; MCGREGOR, J.M.; SPINK, P.J.; LEIGH, I.M.; BREUER, J.; PROBY, C.M. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer

in immunosuppressed and immunocompetent individuals. **J Med Virol**, v. 61, n, 3, p. 289-297, 2000.

HEARD, I.T.J.;SCHMITZ, V.;MANDELBRÖT, L.;KAZATCHKINE, M.D.;ORTH, G. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load. n.1, p.289-297, 2000.

JIMENEZ, C.;CORRENTI, M.;SALMA, N.;CAVAZZA, M.E.;PERRONE, M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. **J Oral Pathol Med**. v.30,n.7,p.385-388, 2001.

KIESSLING, R.;WASSERMAN, K.;HORIGUCHI, S.;KONO, K.;SJOBERG, J.;PISA, P.;PETERSSON, M.;Tumor-induced immune dysfunction. **Cancer Immunol Immunother**.;v.48,n.7,p.353-362,1999.

KREIMER, A.R.;CLIFFORD, G.M.; BOYLE, P.;FRANCESCHI, S.Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.14,n.2,p.467-475, 2005.

LADANYI,A.;SOMLAI,B.;GILDE,K.;FEJOS,Z.;GAUDI,I.;TIMAR,J.T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. **Clin Cancer Res** . v.10,n.2,p.521-530,2004.

LOKE,P.;ALLISON,J. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. **Arthritis Res Ther** v.6,n.5,p.214-216,2004.

MIGUEL, R. E.;VILLA, L. L.;CORDEIRO, A. C.;PRADO, J. C.;SOBRINHO, J. S.;KOWALSKI, L. P.Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **Am J Surg**, v.176, n.5, Nov, p.428-429, 1998.

O'BRIEN, P. M.; SAVERIA CAMPO, M.Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins.**Virus Res**, v.88, n.1-2, Sep; p.103-117, 2002.

OZSARAN, A.A.;ATES, T.;DIKMEN, Y.;ZEYTINOGLU, A.;TEREK, C.;ERHAN, Y.; OZACAR, T.;BILGIC, A.:(2): Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. **Eur J Gynaecol Oncol**, v.20, n.2, p.127-130, 1999;.

PAPAROTTO LOPES, S.M.;MEEKS, V.I. Analysis of HPV 16 and 18 by in situ hybridization in oral papilloma of HIV+ patients. **Gen Dent** ,v.49,p. 386-389, 2001.

RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, POOS L, ANDRES E, HENTGES F, ZIMMER J. Control of natural killer (NK) cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Leukoc Biol**. 2006 (in press).

SAND, L.;JALOULI, J.;LARSSON, P. A.;HIRSCH, J. M.Human papilloma viruses in oral lesions. **Anticancer Res**, v.20, n.2B, Mar-Apr, p.1183-1188, 2000.

SOARES, C. P.;BENATTI NETO, C.;FREGONEZI, P. A.;TERESA, D. B.;SANTOS, R. T.;LONGATTO FILHO, A.;MAEDA, M. Y.Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression in oral lesions infected with human papillomavirus. **Anal Quant Cytol Histol**, v.25, n.1, p.19-24, 2003.

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

VAN DER WAAL, I.; AXELL, T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. **Oral Oncol.** Sep; v.38,n.6,p.521-526, 2002.

WANG, S.;CHEN, L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cell Mol Immunol**,v. 1,n.1,p.37-42, 2004.