

R13829222/04

R48,30

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA



Emília Tomé de Sousa

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL NAS LESÕES DE
BAIXO, ALTO GRAU E DE CARCINOMA DE COLO
UTERINO: Estudo Imunohistoquímico de Leucócitos
Mononucleares Residentes**

616.99266
56962
2000
ex.2

Fortaleza – Ceará

2000

EMÍLIA TOMÉ DE SOUSA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL NAS LESÕES DE
BAIXO, ALTO GRAU E DE CARCINOMA DE COLO
UTERINO: Estudo Imunohistoquímico de Leucócitos
Mononucleares Residentes**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia Tropical do
Departamento de Patologia e Medicina
Legal da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará para
obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira
Orientador

Fortaleza – Ceará
2000



ATA DE DEFESA PÚBLICA DA TESE DE
MESTRADO DE **EMÍLIA TOMÉ DE SOUSA**,
REALIZADA NO DIA 15 DE SETEMBRO DE
2000, NO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E
MEDICINA LEGAL, DA FACULDADE DE ME-
DICINA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ.

Aos quinze dias do mês de setembro do ano de dois mil, foi realizada na Sala de Reunião do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, a defesa Pública da Tese de Mestrado de **EMÍLIA TOMÉ DE SOUSA**, intitulada: “**RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL NAS LESÕES DE BAIXO GRAU, DE ALTO GRAU E DE CARCINOMA INVASORES DO COLO UTERINO: Estudo Imunohistoquímico de Leucócitos Mononucleares Residentes**”, para obtenção do título de Mestre em Patologia. A Banca Examinadora foi composta pelos professores: Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira (Presidente), Dr. Albino Verçosa de Magalhães (UNB), Dr. Eilson Goes de Oliveira (UECE) e Dr. Talapala Govindaswamy Naidu. Após apresentação e arguição da referida Tese, a mestranda obteve o conceito **APROVADO COM LOUVOR**. Nas formas do Art. 54 das normas vigentes da Resolução nº 14/CEPE/97; a candidata faz jus ao Grau de Mestre em Patologia Tropical.

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. FRANCISCO VALDECI DE ALMEIDA FERREIRA
ORIENTADOR, PRESIDENTE

PROF. DR. ALBINO VERÇOSA DE MAGALHÃES

PROF. TITULAR EILSON GOES DE OLIVEIRA

PROF. DR. TALAPALA GOVINDASWAMY NAIDU

DEDICATÓRIA

- Ao **José Roberto** por me amar tanto e fazer das nossas vidas algo tão harmonioso.
- A meus lindos e amados filhos, **Rebeca, Débora, Gabriel e Mateus**, para que entendam que o tempo que eu dediquei a este trabalho, ficando longe deles, valeu a pena.
- A meus pais, duas pessoas maravilhosas, por terem dado aos filhos livre arbítrio em suas escolhas profissionais, pelo companheirismo, amor e paciência que têm com todos nós e que com o exemplo constante de leitura e estudo me inspiraram a ter empenho neste trabalho.
- A **Rodolfo da Rocha Tomé** meu querido sobrinho, que tão cedo deixou nossa companhia, mas que ampara e protege de onde está, toda a nossa família.
- A meus irmãos que como eu têm essa vocação à docência para que não desfaleçam e permaneçam firmes nos propósitos de pós-graduação, de ensino e de pesquisa.
- A todas as mulheres cearenses que carentes de um sistema de saúde que as respeitem são vítimas do câncer de colo uterino avançado.
- A todos nós conscientes dos problemas que atingem nossos irmãos, nossos semelhantes, para que tenhamos coragem para denunciar as injustiças e o desrespeito a eles.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

- À **DEUS**, por me amar e ter me dado a graça de ter força e coragem, apesar das dificuldades, para vencer os obstáculos surgidos durante o percurso deste trabalho. “O Senhor fez em mim maravilhas, Santo é o Seu nome!”

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira pela paciência e orientações e por ter-me lançado um desafio, o que permitiu minha maior dedicação neste trabalho.
- Ao Prof. Talapala Govindaswamy Naidu pelas orientações no item da imunologia e pela generosidade de ter aceito participar da banca examinadora.
- Ao Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães pela disponibilidade de se deslocar de tão longe para participar da banca examinadora.
- À Dra. Ana Virgínia Medeiros Frota Ribeiro, que com seu espírito científico e disciplina me conduziu gentilmente em cada etapa deste trabalho.
- Aos professores do Curso de Mestrado, que contribuíram para minha formação científica e profissional em especial ao Prof. José Júlio Costa Sidrim que contribuiu para o desenvolvimento em mim de um senso crítico científico e da responsabilidade em pesquisar.
- À Universidade Federal do Ceará e em especial ao Departamento de Patologia e Medicina Legal que ofereceu suas instalações para o meu aprendizado.
- Ao CNPq que aprovou e financiou este trabalho através do processo nº 520.623/98.
- Aos estimados amigos e colegas do curso, Jeanne Mércia, José Maria, Eleutério Jr., Maria do Perpétuo Socorro (Petty) e em especial à Germana que me animou em momento difíceis e de indecisão, mostrando-se sempre companheira e prestativa.

- À equipe técnica do Laboratório de Técnicas Especiais e de Imunohistoquímica (LABTECH), os Srs. João Carlos Silva e Francisco José Oliveira Queiroz que com muita disponibilidade e bom humor me auxiliaram na execução das técnicas de imunohistoquímica, e na produção do material fotográfico.
- À Dra. Selma Nogueira Holanda Ferreira pela concessão de utilizar o material por ela selecionado do Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará.
- À Francileide Paiva de Oliveira pelo belíssimo trabalho de formatação da dissertação.
- A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação das classificações das lesões pré-malignas e malignas do colo uterino (adaptado de Gompel e Koss, 1977)	15
Quadro 2	Valores descritivos e percentuais do CD20, CD43, CD68, em relação ao epitélio normal e às lesões escamosas do colo uterino	41
Quadro 3	Teste Kruskal-Wallis para comparação do número médio de células CD20+ entre os tipos de lesões	42
Quadro 4	Teste de sub-hipóteses Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%, das comparações do número médio de células CD20 os tipo de lesões	43
Quadro 5	Quadro resumo das comparações, nível de significância de 5% duas a duas as médias do número de células CD20+ para cada tipo de lesões	43
Quadro 6	Teste Kruskal-Wallis para a comparação do número médio de células CD43 entre os tipo de lesões	45
Quadro 7	Teste de sub-hipóteses Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%, das comparações do número médio de células CD43 entre os tipo de lesões	46
Quadro 8	Quadro resumo das conclusões, nível de significância de 5%, da comparação duas a duas das médias do número de células CD43+ para cada tipo de lesões.	46
Quadro 9	Quadro da análise de variância para a comparação do número médio de células CD68+ entre os tipo de lesões	48
Quadro 10	Teste de Tuckey para a comparação dois a dois do número de células CD68+ entre os tipo de lesões	49
Quadro 11	Quadro resumo das conclusões duas a duas das médias do número de células CD68+ para cada tipo de lesões	49
Quadro 12	Quadro da análise de variância para a comparação das médias do % de células CD20+ por lâmina entre os tipo de lesões	52

Quadro 13	Teste de Games-Howell para comparação duas a duas a média da variável transformada do % de células CD20+ por lâmina entre os tipo de lesões	52
Quadro 14	Quadro resumo das conclusões, da comparação duas a duas das médias do % do número de células CD20+ por lâmina para cada tipo de lesão	53
Quadro 15	Quadro da análise de variância para a comparação das médias do % de células CD43+ por lâmina entre os tipo de lesões	54
Quadro 16	Quadro da análise de variância para a comparação das médias do % de células CD68+ por lâmina entre os tipos de lesões	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seqüência de eventos no protótipo de uma reação imunológica	21
Figura 2	Tubos porta lâminas de plástico com orifícios na base para ir ao microondas dentro do becker	36
Figura 3	Lâminas em solução de tampão citrato (fase de ebulição)	37
Figura 4	Bloqueio da peroxidase em câmara escura (becker envolvido em papel alumínio)	37
Figura 5	Incubação	38
Figura 6	Lavagem com aspiração	38
Figura 7	Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD20 (PAP- 100x) caso n° 6624/96	58
Figura 8	Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD20 (PAP- 400x) caso n° 6624/96	58
Figura 9	Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau (CD20 (PAP- 100x) caso n° 6458/96	60
Figura 10	Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD20 (PAP-400x) caso n° 6458/96	60
Figura 11	Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-100x) CD20 caso n° 6013/96	61
Figura 12	Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-400x) CD20 caso n° 6013/96	61
Figura 13	Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD43 (PAP-100x) caso n° 6624/96	62
Figura 14	Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD43 (PAP-100x) caso n° 1063/96	64
Figura 15	Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD43 (PAP-400x) caso n° 1063/96	64
Figura 16	Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-100x) CD43 caso n° 6633/96	65
Figura 17	Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-400x) CD43 caso n° 6633/96	65
Figura 18	Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD68 (PAP-100x) caso n° 6624/96	67

Figura 19	Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD68 (PAP-400x) caso n° 6624/96	67
Figura 20	Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD68 (PAP-100x) caso n° 1314/96	68
Figura 21	Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD68 (PAP-400x) caso n° 1314/96	68
Figura 22	Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-100x) CD68 caso n° 6633/96	69
Figura 23	Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-400x) CD68 caso n° 6633/96	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Média mais ou menos erro padrão do número de células CD20+ por lâmina em função do tipo de lesão	44
Gráfico 2	Média mais ou menos erro padrão do número de células CD43+ por lâmina em função do tipo de lesão	47
Gráfico 3	Média mais ou menos erro padrão do número de células CD68+ por lâmina em função do tipo de lesão	50
Gráfico 4	Média dos resultados dos imunomarcadores (CD20, CD43 e CD68) segundo distribuição do normal e das lesões de baixo grau, alto grau e carcinomas cervicais	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AGUS	Atipia Glandular de Significado Indeterminado
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ASCUS	Atipia Escamosa de Significado Indeterminado
BCDF	Fatores de Crescimento para Células B
BCGF	Fatores de Diferenciação para Células B
BSA	Albumina Sérica Bovina
C3b	Proteína do Sistema Complemento
CCAD	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
CD	Moléculas de diferenciação
CD20	Marcador para Linfócitos B.
CD4	Linfócito T helper
CD43	Marcador para Linfócitos T
CD68	Marcador para macrófagos
CD8	Linfócito T citotóxico
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
CIS	Carcinoma “ <i>in situ</i> ”
DAB	Diaminobenzidia
DIU	Dispositivo Intra-uterino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Região early do genoma do HPV
EBV	Vírus de Epstein-Barr
GF	Fator de Crescimento
GM-CSF	Fator estimulador de colônia para granulócitos macrófagos
HE	Coloração por Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSIL	Lesão Escamosa Intra-epitelial de Alto Grau
HTLV	Vírus do Linfócito T Humano
HVS	Vírus do Herpes Simples
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

IL-1RA	Receptor antagonista para interleucina 1
KDa	Kilodalton
LABTECH	Laboratório para colorações especiais e imunohistoquímica
LIMAG	Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau
LIMBG	Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau
LNK	Linfócitos Citotóxicos Naturais (Natural Killer)
LSIL	Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau
MAGE	Gene Humano Isolado de Células do Melanoma Maligno
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MP	Sistema mononuclear fagocitário
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
NK	Células Assassinas
p53	Proteína de Kd codificada pelo anti-oncogene p53 no braço curto do cromossomo 17
PAP	Técnica de Peroxidase anti Peroxidase Avidina Biotina
RNA	Ácido ribonucléico
TBS	Tris Buffered Salina – Solução Salina à base de Tris (Hidroximetil-aminometano)
TBS	Sistema Bethesda
TCR	Receptor de Células T
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TIL	Linfócitos Infiltrantes de Tumor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSA	Antígeno específico do tumor

RESUMO

O câncer de colo uterino trata-se de uma neoplasia cuja prevenção, com o diagnóstico precoce das lesões intra-epiteliais precursoras, ofereceu uma diminuição significativa na sua incidência. Atualmente os estudos têm se concentrado na infecção pelo HPV, considerando como o mais importante cofator na gênese dessas lesões. Este trabalho se concentra no estudo da resposta imunológica local nas diversas lesões escamosas proliferativas do colo uterino correlacionando-a com a gravidade da lesão e sua apresentação no epitélio normal. Avaliamos 61 casos do serviço de ginecologia do Instituto de Prevenção do Câncer do Estado do Ceará no período de 1996 a 1997; destes 7 casos exibiam áreas de epitélio normal, 15 casos de lesões intra-epiteliais malpighianas (LIMBG) de baixo grau, 12 de lesões intra-epiteliais malpighiana de alto grau (LIMAG) e 27 de carcinomas invasores (Ca invasor). Tipificamos as populações leucocitárias mononucleares residentes, especialmente as de macrófagos e linfócitos, mediante o uso de anticorpos monoclonais pela técnica imunohistoquímica da Peroxidase anti peroxidase. Para esse fim utilizamos os marcadores de CD20, CD43 e CD68, para linfócitos B, linfócitos T e macrófagos/histiócitos respectivamente. Encontramos diferença significativa da média do percentual de células CD20+ entre as LIMBG e as LIMAG ($p=0,0001$) e entre as LIMAG e os Ca invasores ($p=0,0001$) e entre as LIMAG e o epitélio normal ($p<0,0001$), denotando haver uma supressão da resposta humoral nas LIMAG. Vimos que houve um aumento progressivo de células CD43+ à medida da gravidade das lesões representando a atividade dos linfócitos T em todos os níveis de lesões e que o seu número no epitélio normal foi o menor. Houve ainda uma expressiva marcação de células em todas as lesões pelo CD68 com significativa diferença entre as médias percentuais das LIMAG e os Ca invasores ($p=0,04$) e entre os Ca invasores e os epitélios normais ($p=0,0178$). Concluimos com a análise dos marcadores que, em relação ao epitélio normal e às três lesões avaliadas há uma queda da resposta humoral nas LIMAG representada por um reduzido número de células CD20+, com nítido predomínio das células CD43+ nestas lesões, indicando seu maior

envolvimento com a reposta celular; e um aumento significativo da resposta celular nos Ca invasores representada pela presença de grande quantidade de células CD43+, quando comparada com as LIMBG ($p= 0,01$).

ABSTRACT

The cancer of is a neoplasia whose prevention, with previous diagnosis of pre-malignant intraepithelial lesions, presented a relevant decrease in occurrence. The researches have concentrated on infection by means of HPV, considered the most important co-factor in the genesis of lesions. There is still a lot to be learned about interection between HPV and the individual. This research concentrates on the study of local immunologic response of several cervical proliferatives lesions, and is correlation whit the lesion intensity. 61 cases in ginecology service of cancer Prevention Institute of the State of Ceará (Brazil) were assessed between 1996 and 1997. 15 of the patients presented low grade intraepithelial lesions (LGIL); 12 presented high grade intraepithelial lesions (HGIL) and 27 presented invaders carcinomas (Ca). The leukocytes populations, most specifically the macrophages and lymphocytes, were classified by means of monoclonals antibories the use of through tecnique of immunohistoquemistry. For this purpose, tracers CD20, CD43 and CD68 were used to identify, respectively, B cells, T cells and macrophages. A considerable difference between the average percent of CD20+ cell in LGIL and CD20+ cell in HGIL was found ($p=0.0001$), as well as HGIL and Ca invaders ($p=0.0001$). This observation suggests that the humoral respnse decreases in HGIL. I was observed that a progressive increase of CD43+ cell occurred with the increase of the lesions's grade. There was also a relevant occurence of CD68+ cells in all lesions with considerable difference between the average percent of HGIL and Ca invaders ($p=0.04$). It was concluded that, according to the tracers analysis, in relation with the three lesions assessed, there is a decrease in the humoral response of HGIL represent by a reduced number of CD20+ cells, with the clear prevalence of CD43+ cells. It indicates higher involvement of HGIL with celullar response; and a significant enhancement of celullar response in the Ca invaders represented by the presence of grest amount of CD43+ cells, when compared to LGIL ($p=0.01$).

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer de Colo Uterino	01
1.1.1 Histórico	01
1.2 Epidemiologia do Câncer do Colo Uterino	05
1.2.1 Incidência	05
1.2.2 Fatores de Risco	07
1.2.3 Papel do Comportamento Sexual	08
1.2.3.1 Herpes Vírus Tipo II (HVS)	09
1.2.3.2 Vírus do Papiloma Humano (HPV)	10
1.3 Patologia do Câncer de Colo Uterino	12
1.3.1 Classificações das Lesões Intra-epiteliais e da Neoplasia Invasiva	12
1.4 Imunologia do Câncer de Colo Uterino	17
1.4.1 Aspectos Gerais	17
1.4.2 Resposta Imune Geral	18
• Célula T/Linfócito T	18
• Célula B/Linfócito B	22
• Macrófago	24
• Resposta Imune às Neoplasias	25
• Resposta Imune à Infecção Viral	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Gerais	31
2.2 Específicos	31

3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Materiais (Amostra)	32
3.1.1 Critério de Escolha da Amostra	32
3.1.2 Tratamento das Amostras	33
3.2. Métodos	33
3.2.1. Processamento dos Cortes Histológicos	33
3.2.2. Imunohistoquímica (CD-20, CD-43 e CD-68)	34
3.2.2.1. Imunomarcadores Empregados	34
• CD20	34
• CD43	35
• CD68	35
3.2.3 Técnica da Imunoperoxidase	36
3.2.4 Protocolo para Análise e Leitura das Secções (CD-20, CD-43 e CD-68)	39
3.2.5 Do Examinador e Controle de Qualidade	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Análise do CD20	42
4.2 Análise do CD43	45
4.3 Análise do CD68	48
4.4 Análise da Percentagem do CD20	52
4.5 Análise da Percentagem do CD43	54
4.6 Análise da Percentagem do CD68	55
5 DISCUSSÃO	56
5.1 A expressão do Imunomarcador CD20	57
• Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau (LIMBG)	57
• Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau (LIMAG)	58
• No Carcinoma Invasor	60
5.2 A Expressão do Imunomarcador CD43	61
• Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau (LIMBG)	61
• Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau (LIMAG)	62
• No Carcinoma Invasor	64
5.3 A expressão do Imunomarcador CD68	65
• Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau (LIMBG)	65
• Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau (LIMAG)	67
• No Carcinoma Invasor	68

6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer do Colo Uterino

1.1.1 Histórico

O câncer não se trata de patologia da modernidade, há relatos desta enfermidade na antiga civilização egípcia (FRANKS, 1990). Até o século XVIII, onde poucas mulheres atingiam a idade de 40 anos, devido às doenças infecciosas e a grande mortalidade materna, o câncer cervical, por incidir mais na faixa etária de 40 a 45 anos de idade (COTRAN *et al.*, 1999), não se tratava de problema de saúde pública.

À medida que as populações aumentavam sua expectativa de vida, o câncer de colo do útero ganhou importância clínica e epidemiológica. Esse fato é explicado, pela própria essência do câncer, uma desordem celular que demora anos para se manifestar histologicamente e dar manifestações clínicas (FRANKS, 1990).

Portanto, os primeiros trabalhos publicados sobre esse mal nos remetem ao final do século XVIII e início do século XIX, quando, com o avanço das práticas sanitárias e a maior produção e distribuição de alimentos, registra-se o maior salto em termos de expectativa de vida das populações (DONNANGELO & PEREIRA, 1976). E o apogeu dos estudos tem início no início do século XX, com os avanços dos métodos de diagnósticos cito e histopatológicos.

Embora desde 1590 já se tenha conhecimento dos primeiros instrumentos de microscopia com Janssen, o marco histórico para a compreensão dos cânceres remonta aos estudos de Schleiden (1838) e

Schwann (1839) - sobre a teoria celular - e os estudos de Virchow (1858) que ampliou esta teoria para a patologia ao sustentar que todas as células se originam de células preexistentes (DE ROBERTIS & DE ROBERTIS JR., 1993). Esta concepção se estendeu à patologia, com a conceituação da patologia celular.

Em termos de combate ao câncer de colo uterino, os primeiros tratados nos remetem ao tratamento das lesões cancerosas invasoras, inicialmente com as primeiras amputações de colo uterino para o tratamento das ulcerações malignas da cérvix em 1850 e, com as histerectomias, em 1895, com Freund. Convém salientar, contudo, que, só a mortalidade cirúrgica atingia mais de 50% dos casos (MATTINGLY & THOMPSON, 1988).

Certamente o mau prognóstico das lesões avançadas incentivou os estudos para o diagnóstico precoce desse tipo de câncer. Especificamente os clássicos trabalhos de Cullen (1900) - o primeiro a relatar sobre as células neoplásicas adjacentes ao carcinoma invasivo -, os trabalhos de Schausenstein (1908) e Rubin (1910), os quais concluíram que o epitélio neoplásico superficial representaria o estágio inicial do carcinoma escamoso da cérvix (KREBS, 1994), vieram abrir uma nova era no diagnóstico e tratamento do câncer cervical.

Importante também foram os estudos bioquímicos de Schiller sobre a bioquímica das lesões (1928), quando demonstraram a captação irregular do iodo pelo epitélio escamoso anormal, fato justificado pela ausência de glicogênio no epitélio neoplásico devido à falta de transformação da glicose em glicogênio mas em ácidos pirúvico e láctico, por meio de um processo glicolítico de degradação (LLADÓ, 1971).

Até o início da década de 30 não havia sido proposta nenhuma classificação para os achados histológicos ou citológicos. Sentindo esta lacuna Broders (1932) utilizou pela primeira vez o termo "*Carcinoma in situ*" (CIS) para descrever, a condição de lesão maligna limitada ao epitélio,

permanecendo obscura a natureza exata do CIS e sua distinção de alterações epiteliais menos graves (LLADÓ, 1971).

As bases do diagnóstico e prevenção do câncer de colo uterino se solidificaram e ganharam significância epidemiológica a partir de dois fatos principais:

1. O advento da colposcopia desenvolvida por Hinselmann (1925) na Alemanha. Com o colposcópio pôde-se ampliar as lesões demasiado pequenas e possibilitou uma observação mais acurada da cérvix uterina. Apesar do nome (colpos = vagina) o aparelho se prestava principalmente ao exame da cérvix uterina. Posteriormente com a introdução da aplicação do ácido acético (1938), pelo mesmo autor, houve uma maior capacidade diagnóstica, por causa das mais claras imagens conseguidas com o seu uso. Este método foi rapidamente aceito na Europa e América do Sul, e nos Estados Unidos somente a partir de 1960 (KREBS, 1994).

2. O exame de células esfoliadas da vagina, idealizado por George Papanicolaou (1943) para a revelação de lesões iniciais em escala de massa, publicando sua monografia *“Diagnosis of Uterine Cancer by Vaginal Smear”*, o qual não foi aceito de imediato pela comunidade científica mas, após cinco anos, a Sociedade Americana para o estudo do Câncer reconheceu a importância do método e recomendou a criação de centros especializados para promover este diagnóstico precoce (Pap-test).

Com os trabalhos de Papanicolaou (1927 e 1943) pensava-se que o problema das lesões malignas do colo uterino teria sido superado. A identificação das lesões precursoras do câncer cervical, a partir desses estudos, sem dúvida alguma foi de extrema importância na prevenção e tratamento do câncer do colo uterino. Em 1950, a propagação dos programas de *“screening”* para câncer de colo uterino já se mostrava efetiva (MATTINGLY & THOMPSON, 1988).

No entanto, alguns autores questionaram parte dos conceitos, utilizados principalmente em relação à natureza das lesões pré-neoplásicas e da malignidade do carcinoma pré-invasor.

Ulm em 1954, analisando as controvérsias sobre o carcinoma pré-invasor, apresentou uma argumentação contundente que, além de motivar o estudo sobre o assunto, incentivou uma abertura da discussão sobre ele levando em conta, além da especificidade clinicopatológica, a repercussão epidemiológica do tema, quando afirmou que, se não existisse o conceito de carcinoma pré-invasor seria preciso criá-lo já que, à parte do seu valor doutrinário, ele constituía de acordo com os critérios atuais, a única forma válida de melhorar os resultados terapêuticos (LLADÓ, 1971).

Em decorrência desses estudos, o exame de prevenção do câncer do colo uterino já se consagrou como modelo que melhor contempla a descoberta precoce de lesões malignas bem como o diagnóstico e tratamento de lesões pré-malignas neste sítio. (OPS, 1990; JABLONSKA, 1982; CRUM, 1999; MAIMAN *et al.* 1998).

No entanto, as diversas formas clínicas de apresentação do carcinoma da cérvix uterina, demonstram também que muito estudo precisa ser realizado sobre a natureza e os fatores relacionados ao desenvolvimento dessa entidade, conhecimentos estes que poderão ainda mais melhorar a eficácia de um modelo consolidado de prevenção.

1.2. Epidemiologia do Câncer de Colo Uterino

O trabalho de Rigoni-Stern, em 1842, constitui o mais antigo e completo estudo epidemiológico de grande porte sobre câncer de colo uterino (ILADÓ, 1971; KREBS, 1993). Esse pesquisador estudou as causas de mortes ocorridas em Veron, na Itália, de 1760 a 1839 e fez uma análise das mortes por câncer do colo uterino, numa época em que não se conhecia bem as bases cito-histopatológicas do câncer, dando origem ao surgimento a várias teorias para sua carcinogênese. Basicamente foram duas as observações mais significativas proposto por esse autor: 1) a de que câncer do colo era freqüente em mulheres casadas e viúvas; 2) e que este tipo de câncer era bastante raro entre mulheres solteiras e monjas.

Outro trabalho epidemiológico de grande proporção estatística que ratificou as conclusões de Rigoni-Stern foi o de Gagnon, em 1950, no qual durante 20 anos estudou nada menos que 13.000 religiosas de Quebec, não tendo encontrado um único caso de câncer de colo uterino (LLADÓ, 1971).

1.2.1. Incidência

O registro de câncer de base populacional não são tão antigos, os primeiros relatos oficiais tiveram início em Hamburgo, na Alemanha, em 1926, seguido pelo de Massachusetts, nos Estados Unidos, em 1927 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

Até 1940, o câncer de colo uterino era a causa principal de mortes por neoplasia maligna entre as mulheres norte-americanas (KREBS, 1993).

A partir de 1947 já se tem relatos da redução da incidência dessa patologia, principalmente nos países ricos, devido ao uso rotineiro dos exames anuais de Papanicolaou (MATTINGLY & THOMPSON, 1988).

De 1962 a 1977 a mortalidade nos EUA foi reduzida de 21,8 para 11,5 por 100.000 da população (SABISTON, 1977).

De 1954 a 1994 estima-se que nos EUA houve uma redução de mais de 70% das mortes por câncer de colo uterino (KREBS, 1993, CRUM, 1999, BAUER *et al.*, 1991).

Atualmente o câncer do colo uterino representa a segunda causa de morte por câncer em mulheres e em cada ano no mundo, estima-se que cerca de 500.000 novos casos são diagnosticados nos Estados Unidos (SCHOELL *et al.*, 1999, SCHIFFMAN, 1992).

Entretanto, estes dados vistos em países desenvolvidos, não são reproduzidos em outros menos abastados ou com maiores desigualdades sociais. No Brasil, por exemplo, continuam taxas altíssimas de mortalidade por câncer de colo uterino. Pesquisa realizada no Estado de São Paulo no período de 1970 a 1992 demonstrou que a taxa de mortalidade por câncer de colo uterino praticamente vem se mantendo constante, situando-se em cerca de 5,0 óbitos/100.000 habitantes (FONSECA, 1998).

Essa situação existente no Brasil piora dependendo da região estudada: quanto mais pobre o Estado, maior a taxa de mortalidade por câncer de colo uterino. Em 1986, por exemplo, a mortalidade por esse câncer nas regiões Norte e Nordeste chegou a ser quase o dobro da apresentada nas regiões Sul e Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1991). Desde antes de 1970, enquanto em São Paulo o câncer de colo uterino representava a segunda causa de óbitos por câncer em mulheres, em Fortaleza era a primeira (FONSECA, 1995).

Dados mais recentes (1991) apontam a cidade de Goiânia como a detentora de maior incidência de câncer da cérvix no Brasil (PARKIN *et al.*, 1992).

1.2.2 Fatores de Risco

Os primeiros trabalhos remontam a década de 1820, Broussais em 1826 já especulava uma possível relação entre o câncer de colo uterino e a sua irritação crônica ou o seu traumatismo. Essa teoria foi reforçada pelo clássico trabalho de Rigoni-Stern, publicado em Roma (1842), baseado na existência de alta prevalência de carcinoma da cérvix em prostitutas e sua virtual ausência em mulheres sem atividade sexual, tendo postulado então que deveria haver algum agente sexualmente transmissível que causava este tipo de câncer (LLADÓ, 1971). As pesquisas neste campo vieram a confirmar este postulado após cerca de 150 anos, com as atuais evidências sobre o papel do vírus do papiloma humano (HPV) na carcinogênese cérvico-uterina (REID *et al.* 1987; LORINCZ *et al.* 1987; MACNAB *et al.* 1986; NGELANGEL *et al.*, 1998; REEVES *et al.*, 1989).

Em 1919, Vineberg verificou que o câncer de colo uterino era 20 vezes mais freqüente nas mulheres não judias da cidade de Nova Iorque (KREBS, 1993).

Gagnon, em 1950, revelou não ter encontrado nenhum câncer de colo uterino entre as monjas estudadas da comunidade de Quebec.

A causalidade virótica para o carcinoma da cérvix é cogitada pela primeira vez por Oberling (1954) o qual diante de inúmeras críticas afirmou: “*Submetida à prova a teoria vírica do câncer, não tem por que temer o juízo do futuro*” (LLADÓ, 1971).

Outros trabalhos, já na década de 60, demonstram uma baixa incidência de câncer de colo uterino ligada às práticas sexuais monogâmicas (exclusivas), entre adeptos de algumas religiões, reforçando a hipótese da doença venérea como fator de risco para o câncer de colo (KREBS, 1993).

Mas só em 1964 Epstein e Barr, comunicaram a identificação, em cultivos de linfoblastos do tumor de Burkitt, descrito pouco antes por este autor em crianças africanas (1961), partículas víricas parecidas com as do vírus do Epstein-Barr - EBV (LLADÓ, 1971).

Atualmente está bem estabelecido que o câncer de colo uterino encontra-se intimamente relacionado à conduta sexual ou que sua gênese está amplamente ligada a agentes de transmissão sexual (REID *et al.*, 1987; REEVES *et al.*, 1989; LEY *et al.*, 1991).

1.2.3 Papel do Comportamento Sexual

Em relação ao câncer do colo uterino há cerca de 10 anos havia nove fatores de riscos, quais sejam raça, fumo, uso de anticoncepcionais orais, gravidez e partos, múltiplos parceiros, infecções genitais, lesões displásicas prévias, baixo nível sócio-econômico, circuncisão masculina precoce; atualmente, apesar de alguns ainda permanecerem aceitos, outros estão sendo melhor interpretados e reunidos em grandes grupos (MAIMAN *et al.*, 1997; BARRASSO, 1990; Bauer *et al.*, 1991).

Hoje são aceitos:

1. A idade precoce na primeira relação sexual;
2. Múltiplos parceiros sexuais;
3. Um parceiro com várias parceiras sexuais anteriores.

Ou seja, todos os outros fatores de riscos estariam subordinados a estes, pela possibilidade aumentada nas três situações descritas ocorrer contaminação pelo vírus do papiloma humano agente sexualmente transmissível imputado como principal cofator na oncogênese cervical (FUCHS *et al.*, 1988; MCCANCE *et al.*, 1988; VILLA *et al.*, 1988).

1.2.3.1 Herpes Vírus Tipo II (HSV II)

A partir de 1968 diversos pesquisadores desenvolveram estudos na tentativa de relacionar o carcinoma do colo uterino com a infecção pelo *herpes virus hominis*, tipo 2. Alguns com achados da presença praticamente constante de infecção herpética em mulheres acometidas por carcinoma de colo uterino: 88% em um grupo de 25 pacientes com câncer, em comparação a 16% encontrado no grupo controle composto de mulheres sãs da mesma idade, status procriativo e condição socio-econômica (Rawls, 1969 apud LLADÓ, 1971). Posteriormente comprovou-se a presença simultânea de seqüências gênicas de herpes simples e HPV em tumores genitais humanos (DI LUCA, 1987).

Em estudo randomizado Kjaer (1988) concluiu que a observação dos índices de infecção por HPV 16/18 na Groelândia e na Dinamarca não confirmaram o papel destas viroses como determinantes da incidência de câncer cervical. Mas, em contraste, a infecção por HSV-II e a prevalência de fatores de riscos já estabelecidos para o câncer cérvico-uterino, dariam suporte à idéia de que o comportamento sexual e o estilo de vida determinavam diferenças nos índices de incidências entre esses dois países (KJAER *et al.*, 1988).

1.3 Patologia do Câncer de Colo Uterino

1.3.1 Classificações das Lesões Intra-epiteliais e da Neoplasia Invasiva

George Papanicolaou (1943) apresentou a técnica para colheita do material, fixação, coloração e estabeleceu, baseado nos critérios de normalidade e malignidade, a primeira classificação para os esfregaços vaginais, disposta numa escala de malignidade crescente:

Grupo I - Negativo: Só contém células normais.

Grupo II - Negativo: Inclui os esfregaços com ligeiras anormalidades celulares (no núcleo e no citoplasma) de cunho certamente benigno, como as encontradas em certos processos inflamatórios.

Grupo III - Duvidoso: Presença de células evidentemente anormais, às vezes com imagens de grande atipismo, que não podem ser classificadas com segurança nem como benignas, nem como malignas.

Grupo IV - Positivo: Altamente suspeito de malignidade, por conter limitado número de células tumorais atípicas.

Grupo V - Positivo: Conclusivo de malignidade, com múltiplas células atípicas, dispostas isoladamente e em grupos.

Em 1961 quando houve a realização do I Congresso Internacional de Citologia (LLADÓ, 1971, KREBS, 1993), realizado em Viena, o Comitê sobre Terminologia Histológica definiu:

- Carcinoma *in situ* (CIS): Lesão do epitélio na qual, em toda sua espessura, não se verifica nenhuma diferenciação. Podendo o

processo estender-se às glândulas endocervicais, sem configurar por isso um novo grupo.

- Displasias: Todos os distúrbios da diferenciação do epitélio pavimentoso de menor grau que o carcinoma *in situ*.

Poucos anos depois um grupo de Paris definiu o carcinoma *in situ*, sendo esta a definição até hoje aceita como:

uma modificação da camada epitelial da cérvix constituída por um espessamento da mesma, que encerra elementos, desordenados e sem guardar entre si polaridade alguma, células anaplásicas, com elevado número de mitoses, freqüentemente atípicas e dispostas irregularmente em toda a espessura do epitélio, cuja membrana basal (e este é o caráter próprio e morfológicamente definidor do processo) permanece íntegra (LLADÓ, 1971).

Reagan em 1953 introduziu o termo hiperplasia e, em seguida, displasia para descrever as alterações do epitélio escamoso ou metaplásico distinguindo três graus de intensidade; leve, moderada e acentuada. Sendo displasia uma lesão constituída por células atípicas situadas no epitélio e que preservava um certo grau de estratificação no sentido das camadas mais superficiais. A displasia leve afetaria o terço basal do epitélio, a moderada os dois terços da espessura e a acentuada afetaria toda a espessura do mesmo (GOMPEL, 1997).

Em meio a tantas sugestões de classificação, Richart (1967) considerando que carcinoma *in situ* e displasia só representavam etapas do mesmo processo criou a expressão “neoplasia intra-epitelial cervical” (NIC). As lesões foram identificadas de 1 a 3, como NIC I - correspondendo à displasia leve - NIC II - correspondendo à displasia moderada - e NIC III - correspondendo à displasia acentuada ou carcinoma *in situ* (KREBS, 1993).

Esta classificação permaneceu e ainda é aceita, mas em 1988 um encontro promovido e patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) na cidade de Bethesda propôs uma nova terminologia para melhorar e uniformizar a comunicação entre clínicos e patologistas, foi o chamado Sistema Bethesda – TBS (KURMAN et al., 1997) até hoje a única classificação que atende às múltiplas variações encontradas nos esfregaços cérvico-vaginais como, descreveremos sumariamente a seguir.

Inicialmente o TBS qualifica a adequabilidade da amostra considerando como amostra adequada aquela em que existe identificação correta, informação clínica aplicável sendo passível de interpretação técnica e tendo composição celular tanto de células escamosas e endocervicais como de células escamosas metaplásicas. Estes elementos validariam a hipótese de que a zona de transformação estaria representada.

Em seguida este sistema define os critérios que limitariam a amostra que poderia ser satisfatória, mas limitada pela presença de elementos como sangue, inflamação intensa, áreas muito densas, ausência de células da zona de transição escamo-colunar, contaminação, identificação inadequada da lâmina, entre outras. Define, ainda, alterações celulares benignas, relacionadas com infecções, alterações reativas, associadas com inflamações (reparo típico), atrofia (com ou sem inflamação), radiação, dispositivo intra-uterino (DIU) e outras.

Classifica, enfim, as células epiteliais escamosas anormais dentro dos seguintes grupos: 1. Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). 2. Lesões escamosas intra-epiteliais de baixo grau (LSIL), abrangendo os casos de infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV)/displasia leve/Neoplasia cervical intra-epitelial (NIC 1). 3. Lesões intra-epiteliais de alto grau (HSIL) incluindo displasia moderada, displasia acentuada e carcinoma *in situ*/NIC 2 e NIC 3. 4. Carcinoma invasivo de células escamosas.

As células glandulares seriam enquadradas, neste sistema, como: Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS), como adenocarcinoma endocervical, como adenocarcinoma endometrial, como adenocarcinoma extra-uterino e como adenocarcinoma não especificado - NOS.

Este sistema de classificação foi, mais recentemente, modificado em 1992 e 1998 sem contudo perder sua identidade original e essas mudanças diziam respeito, principalmente, às modificações referentes as condições identificadas com ASCUS e AGUS.

Em 1991 um grupo de patologistas e citopatologistas reuniu-se em Paris na tentativa de estabelecer uma nomenclatura, a mais uniforme possível e foi chamado Consenso “Neoplasias do colo uterino” Paris Tolbiac, baseado nas idéias do Sistema Bethesda, dando ênfase entretanto, alguns outros aspectos tais como: tendência a reduzir o número de grupos de lesões, levar em conta os dados biológicos modernos, oferecer uma mensagem clara aos clínicos, estabelecer uma relação entre a morfologia e a terapêutica, permitir a comparação internacional dos dados estatísticos (GOMPEL & KOSS, 1997).

Quadro1: Comparação das classificações das lesões pré-malignas e malignas do colo uterino (adaptado de Gompel e Koss, 1997).

	I	II	III	IV	V
Papanicolaou 1943	Benigno		Suspeito ou atípico	Maligno	
	Displasias				
Reagan 1953	Leve		Moderada	Acentuada	Ca <i>in situ</i>
Richart 1967	NIC I		NICII	NICIII	
Sistema de Bethesda 1988	Atipias não especificadas		Lesão Malpighiana de Baixo Grau	Lesão Malpighiana de Alto Grau	

Com os trabalhos de Papanicolaou (1927 e 1943) pensava-se que o problema das lesões malignas do colo uterino teria sido superado. A identificação das lesões precursoras do câncer cervical, a partir desses

estudos, sem dúvida alguma, foi de extrema importância na prevenção e tratamento do câncer do colo uterino. Foi obtida uma modificação marcante no perfil de mortalidade por essa patologia, deixando de representar a causa mais freqüente de morte por câncer entre as mulheres com um decréscimo marcante na incidência e mortalidade por esta doença de 1947 a 1977, chegando a representar um declínio de até 3 a 4% por ano (MATTINGLY & THOMPSON, 1988). Havia a esperança de que, com a tendência apresentada, em pouco tempo haveria o desaparecimento dessa pandemia

No entanto, a diminuição da velocidade do declínio dessa patologia, a partir de 1980 (FRANCO, 1996) a diversidade de sua evolução bem como as respostas insuficientes ao tratamento convencional, vêm despertando o interesse dos pesquisadores. Acredita-se, atualmente, que só o reconhecimento das lesões precursoras ou mesmo das lesões cancerosas por si não sejam suficientes para definir o prognóstico e o tratamento de tais patologias, tornando-se de suma importância o melhor conhecimento das respostas imunológicas (humoral e celular) locais e sistêmicas a esta patologia.

Estas observações fazem com que este tema permaneça na agenda das organizações de saúde do mundo inteiro. Ainda hoje as lesões malignas do colo uterino despontam como segunda causa de morte por câncer em mulheres (WOODWORTH & SIMPSON, 1993).

No Ceará, dados da Secretaria de Saúde (1996), revelaram 7,5% do total de óbitos por câncer registrados (1953/25.819) pelo Estado, 967 são de mulheres e 83 são por câncer do colo uterino, números alarmantes comparados a outros tipos de câncer cuja prevenção é pouco acessível, como por exemplo o câncer de estômago, que contribuiu com 88 óbitos (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 1996).

O presente trabalho busca a compreensão da resposta imunológica local, relacionada às lesões de colo uterino de baixo grau, de alto grau (0) e nos carcinomas invasores; e sua estreita relação com o *Papilomavirus*

humanus -HPV (FUKUDA et al., 1993; DAVIDSON, et al. 1997; GIANNINI et al., 1998).

1.4 Imunologia do Câncer do Colo Uterino

1.4.1 Aspectos Gerais

Contribuem para a resposta imunológica aos tumores diversos elementos, uns de ordem local entre os quais destacar-se a própria célula do tecido que o alberga, como por exemplo as células epiteliais que produzem fatores de crescimento (GF), citocinas e vários outros fatores que parecem ter papel relevante na imunidade local (WATANABE *et al.*, 1983; WOODWORTH & SIMPSON, 1993; FICHOROVA *et al.*, 1999).

Este estudo teve início com uma revisão da resposta imune geral, seguido dos mecanismos antitumorais disponíveis promovidos pela imunidade humoral e celular, tanto local quanto sistêmica e das respostas relacionadas às viroses, com especial atenção aos efeitos sobre o *Papillomavirus humanus* (HPV).

1.4.2 Resposta Imune Geral

- **Células T/Linfócito T**

Constituem cerca de 60 a 70% dos linfócitos circulantes periféricos mas, também, são encontrados na área paracortical dos linfonodos e nas regiões periarteriolas dos folículos linfóides do baço.

Cada célula T sendo geneticamente programada para reconhecer um determinante antigênico específico (epítipo), através do acoplamento ao Receptor de Célula T (complexo TCR-CD3) exclusivo para aquele epítipo. Expressaria, também, em sua superfície durante o período de maturação intratímica, moléculas de diferenciação (CD = cluster of differentiation), que seriam caracterizadas por vários anticorpos monoclonais específicos e desempenham importantes papéis auxiliares na ativação dos linfócitos T que reconhecem os antígenos. A maturação funcional, que é a capacidade de executar as funções "helper" ou citolítica, ocorre simultaneamente com a expressão destas moléculas de superfície da célula T e em grande parte, depende delas (MOSMANN & MOORE, 1991).

A progênie de linfócitos T diferencia-se em duas linhagens principais funcionalmente distintas: as células T "helpers" CD4⁺ (auxiliares) que expressam e reconhecem em suas superfícies moléculas da classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC/CPH) e as células T citotóxicas (CD8⁺) que reconhecem peptídeos conjugados às moléculas da classe I do MHC, em membranas de células infectadas por vírus, células neoplásicas ou tecidos alogênicos transplantados. Adicionalmente, os Linfócitos T conservam algumas moléculas que aparecem relativamente cedo durante o processo de diferenciação, dentre elas CD2, CD5, CD11, CD40 - todas estas desempenham papéis auxiliares de alguma relevância na ativação de células. Merecem destaque duas outras moléculas de

diferenciação, consideradas mais diretamente participantes do processo de ativação das duas subpopulações de linfócitos T: São as CD28 e CD43; a primeira é hoje reconhecida como a molécula de “co-estimulação” e a segunda, também conhecida como sialoforina, relaciona-se com o estágio de ativação dos linfócitos T, em fase de interação com as células apresentadoras de antígeno (MOSMANN & MOORE, 1991, MOSMANN & SAD, 1996).

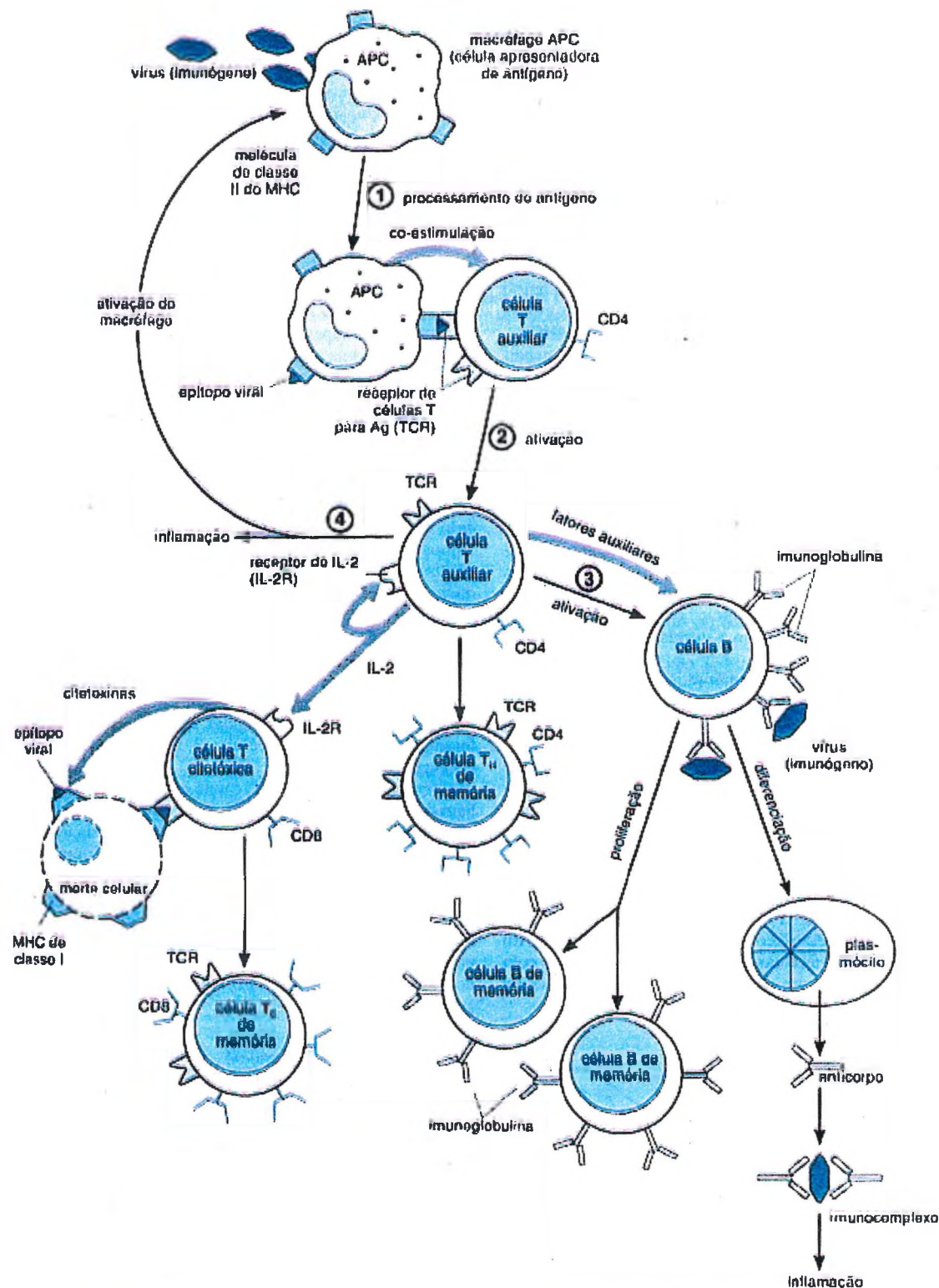
A molécula CD4 expressa-se em 60% das células T, enquanto a CD8 em cerca de 30% das mesmas.

O Linfócito CD4+ pode ser reconhecido como o principal articulador, da resposta imunológica algo como um “Mestre de Cerimônia” da referida resposta, pela sua secreção de citocinas, que influenciam, virtualmente, todas as células imunológicas na diferenciação e funcionamento, incluindo outras células T, células B, macrófagos, células citotóxicas naturais (“Natural Killers” - NK); como também dos demais leucócitos.

A ativação do linfócito T CD4+ pelo antígeno requer, obrigatoriamente, o “processamento” e a “apresentação” do mesmo por uma célula auxiliar, conhecida como “Célula Apresentadora de Antígeno” (APC). Geralmente, um macrófago, célula dendrítica ou linfócito B capta o antígeno da circulação, degrada a molécula à condição de peptídeo imunogénico por meio da digestão enzimática, e acopla um dos peptídeos à molécula da classe II (DR) de histocompatibilidade, gerada pela própria célula. O complexo peptídeo+MHC II é apresentado na membrana da APC, possibilitando o seu encaixe no TCR de um clone específico de linfócitos T. Além dessa ligação específica do antígeno-TCR (“Sinal 1”), precisa ser efetuada, imprescindivelmente, uma ligação entre o CD28 (do Linfócito T) e B7 da APC (ligação entre as moléculas de co-estimulação - “Sinal 2”); como também ligações entre as várias moléculas de adesão entre as duas células. Adicionalmente, os linfócitos ativados pelos antígenos, precisam da interleucina 1 (IL-1) como um fator de crescimento e diferenciação funcional. Juntos, esses sinais induzem a célula T auxiliar em questão a liberar IL-2 que, por sua vez, desencadeia a liberação de uma sequência de citocinas que

são importantes para ativar células B, células T citotóxicas (CD8+), NK, macrófagos e outras células inflamatórias (MOSMANN, 1996).

A ativação da célula T citotóxica (CD8+) requer também tais condições; sendo o sinal-1 fornecido pela ligação do seu TCR ao complexo antígenomolécula de classe I do MHC, que está presente em praticamente todas as células somáticas as quais podem estar infectadas por vírus, serem neoplásicas, enxertos de tecidos estranhos (célula alvo) ou estar infectadas por vírus. O sinal para crescimento e diferenciação é fornecido pela IL-2 produzida previamente pela célula T CD4+ já ativada. O linfócito T citotóxico, então ativado, libera citotoxinas que desencadeiam o processo apoptótico de morte celular.



Mais recentemente foram identificadas duas populações de células T “helper” funcionalmente distintas; as células T “helper” 1(Th1) que sintetiza e secreta interleucina 2(IL-2) e interferon γ (IFN- γ) e linfoquinas; e as células T “helper” 2(Th2) que produzem predominantemente interleucinas do grupo 4, 5 e 10(IL-4, IL-5 e IL-10). As células T CD8+, como as CD4+, também podem secretar algumas citocinas próprias das células Th1, mas especializam-se principalmente como células citotóxicas (MOSMANN & MOORE, 1991).

- **Célula B/Linfócito B**

Eles constituem cerca de 10 a 20% dos linfócitos circulantes. Estão presentes também na medula óssea e nos tecidos linfóides periféricos como o dos linfonodos, baço, tonsilas e em acúmulos linfóides associados às mucosas (ex: placas de Peyer).

A célula B reconhece o antígeno mediante o seu receptor de Imunoglobulina. As imunoglobulinas IgM e IgD, presentes na superfície das células B, funcionam como componentes de ligação antigênica. Como nas células T, cada receptor de célula B tem especificidade para um epítopo antigênico (MOSMANN & SAD, 1996).

Por ocasião da estimulação antigênica as células B diferenciam-se em células plasmáticas (os plasmócitos), as quais secretam imunoglobulinas que são os mediadores da resposta imune humoral; ou tornam-se células de memória, prontas para um segundo desafio antigênico. Durante o processo de ativação das células B que expressam inicialmente IgM, ocorre a mudança de isótipo, podendo passar a expressar novas imunoglobulinas como IgG, IgA e IgE, e ocorre também a maturação de afinidade, ou seja, o desenvolvimento de linfócito B com receptor de alta afinidade, e ainda a evolução para células de memória (ABBAS, 1999).

Essa diferenciação de células B em plasmócitos é grandemente influenciada por citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares, como as IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

Os principais estímulos (antígenos/imunogênicos), que desencadeiam a ativação dos linfócitos B em repouso, são imunogênicos procedentes de células tumorais, bactérias, partículas virais ou agentes químicos. Esta ativação é precedida pela ativação da célula T auxiliar CD4+, juntamente com os sinais do complexo antígeno-receptor ligado à superfície da célula B. A célula T CD4+ ativada libera citocinas como a IL-2 que induz a mitose dos linfócitos B e os Fatores de Crescimento da Célula B (BCGF/IL-4) e o Fator de Diferenciação da Célula B (BCDF/IL-5). Destas, algumas progridem para o estágio de plasmócitos e secretam anticorpos, e outras, formam uma linhagem de linfócitos B de memória (STITES, 2000).

Outra peculiaridade do linfócito B é ser uma célula apresentadora de antígeno (APC) para o linfócito CD4+, por captar, processar e expressar em sua superfície moléculas antigênicas de classe II do MHC, o que é comum a todas as APCs (COTRAN *et al.*, 1999).

O linfócito B expressa ainda outras moléculas em sua superfície: como receptores para o C3 do sistema do complemento; Imunoglobulinas e CD40 (membro da família do Fator de Necrose Tumoral), que tem um papel importante na interação entre células T CD4+ e células B.

É importante ressaltar que a célula B tem um receptor (CR2/CD21) para o C3b do sistema do complemento que também é usado como porta-de-entrada pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e, conseqüentemente, estas células são prontamente infectadas na presença deste vírus (AHMED, 1999).

- **Macrófagos**

Pertencem ao sistema mononuclear fagocitário (MP). Uma vez que os monócitos do sangue saiam da circulação e entrem nos tecidos, eles se diferenciam em macrófagos.

Os macrófagos desempenham importantes papéis na inflamação, e na resposta imunológica celular apresentando o antígeno ao linfócito T CD4+; que se dá pela sua capacidade de fagocitar antígenos e processá-los nas cisternas do seu retículo endoplasmático rugoso e expressá-los na sua membrana através de fragmentos antigênicos inseridos nas moléculas de classe II do MHC (BEZERRA, 1999).

A ativação dos macrófagos é facilitada por citocinas, tais como o IFN- γ , GM-CSF, produzidas pelos próprios linfócitos T CD4+/subtipo 1(Th1), o qual aumenta sua capacidade microbicida. Os macrófagos também possuem em sua membrana receptores para as imunoglobulinas IgG, IgM e IgE, principalmente para IgG, as quais respaldam sua habilidade para destruir células tumorais revestidas por anticorpo IgG (CCAD-Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ABBAS,1998, CONTRAN *et al.*, 1999).

Macrófagos ativados são a principal fonte de produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF), que, como o nome indica, pode destruir células tumorais, sem atingir os tecidos sadios circunjacentes (HACHISUGA, 1989)

A resposta imune é, então, um complexo de interações primariamente entre três principais tipos de células: os macrófagos, linfócitos modulados pelo timo (células T) e linfócitos derivados e modulados na medula óssea (células B); além da participação de citocinas. Adicionalmente, o sistema imune está integralmente conectado com os sistemas do complemento, das cininas, da coagulação e fibrinolítico, os quais são todos participantes da inflamação (STITES, 1991).

• **Resposta Imune às Neoplasias**

As neoplasias malignas crescem de maneira descontrolada, invadem tecidos sadios e costumam dar metástases. Em geral, o tumor se origina de uma única células guardando uma característica que lhe é peculiar: A da monoclonalidade. Elas passam por alterações gênicas (fatores etiopatogênicos das neoplasias) e em consequência passam a expressar moléculas protéicas na superfície que podem até contribuir para a disseminação metastática das neoplasias (COTRAN *et al.*, 1999).

As respostas imunes aos tumores têm sido demonstradas contra neoplasias imunogênicas, as quais podem se revelar tanto de natureza celular como humoral, ambas na dependência do antígeno expressado pelas mesmas (CRUM & ROCHE, 1999, BRUNDA *et al.*, 1993).

Estas respostas inativariam as células reconhecidas como estranhas ou não próprias, antes que elas se organizassem como tumores constituídos ou destruiriam um tumor que tivesse tido a oportunidade de se desenvolver. Nestes casos, o organismo vivo teria mecanismos de vigilância imunológica natural contra tumores, os quais, em algum momento, falhariam e a permitiriam a evolução da neoplasia. As observações que convalidam e sustentam este conceito são as feitas em indivíduos imunodeficientes ou imunocomprometidos que apresentam uma alta incidência de neoplasias malignas ligadas a diversas etiologias (BARBERIS *et al.*, 1998).

Outra evidência que possibilita tal inferência é o achado de infiltrados de células mononucleares em certos tumores, como carcinoma medular de mama e os melanomas malignos, conferindo aos portadores um melhor prognóstico, quando comparados a tumores semelhantes sem os mesmos infiltrados (GHOSH & MOORE, 1992).

Todas as células efectoras imunes participam do processo de combate ao tumor.

Há grande variedade de antígenos tumorais reconhecidos pelos linfócitos T que podem ser proteínas celulares e virais. Alguns destes antígenos são codificados por genes que normalmente são expressos apenas no início do desenvolvimento do indivíduo, para em seguida permanecerem silenciosos, mas que por ocasião de alguma mutação maligna passam a ser novamente expressos na superfície de células tumorais (ABBAS *et al.*, 1998).

Tais moléculas são denominados de “Antígenos Oncofetais”, proteínas fetais normalmente expressas nos tecidos em desenvolvimento, que podem servir de auxiliares no diagnóstico e no seguimento de tumores que os expressam. Os antígenos oncofetais mais detalhadamente estudados, até hoje, são a α -fetoproteína do carcinoma hepático e o Antígeno carcinoembrionário (CEA) do carcinoma de cólon (COTRAN *et al.*, 1999).

É, também, o caso do gene humano chamado MAGE-1 que foi isolado de células do melanoma maligno. Este gene codifica um antígeno que é reconhecido por um clone de linfócitos T citotóxicos melanoma-específicos, derivados de paciente portador de melanoma. A proteína MAGE-1 é expressa em 50% dos melanomas e em 25% dos carcinomas de mama, mas não é detectável na maioria dos tecidos normais, o que significa que o gene é silencioso. Deste modo, fica claro que os pacientes com melanoma têm linfócitos T citotóxicos de memória específicos para MAGE-1 e poderiam então desenvolver uma resposta de rejeição tumoral (ABBAS *et al.*, 1998).

Existem genes responsáveis pela supressão de tumores, através de proteínas como a p53; ou seja, genes que codificam o crescimento e desenvolvimento normais das células. Quando ocorre algum tipo de mutação destes genes nas transformações malignas as formas celulares alteradas podem desencadear respostas imunes do hospedeiro. Nesses casos, as suas proteínas são processadas e apresentadas pelas próprias células tumorais integradas às moléculas de classe I do MHC, para serem reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos. Na eventualidade de liberação desses antígenos específicos por tumores, eles serão processados e apresentados ao linfócito T CD4+ pelas APC's profissionais (CRUM & ROCHE, 1999).

Alguns vírus, tanto de RNA como de DNA são imputados no desenvolvimento neoplásico, em animais e no homem. Estes vírus têm a propriedade de integrarem seu genoma aos das células alterando-lhe, inclusive, sua síntese protéica. Tais proteínas são então processadas e podem ser expressas na superfície das células associadas às moléculas de classe I do MHC. Como exemplo do vírus de DNA temos: o vírus do Epstein-Barr (EBV) o qual associa-se a linfomas de Burkitt de linfócitos B e ao carcinoma rinofaríngeo. O vírus do papiloma humano (HPV), também um vírus de DNA, associa-se a carcinomas do colo uterino; enquanto que o vírus de RNA HTLV-1 (Vírus do Linfócito T Humano), encontra-se implicado na leucemia crônica humana (AMAS *et al.*, 1998; YOSHINO, 1989).

Será dado especial destaque à integração do HPV e aos seus efeitos sobre as células escamosas do epitélio cervical que potencialmente sofrem malignização.

A infecção da camada basal do epitélio cervical via, exposição a microlesões, resulta num defeito de diferenciação (citomaturação), levando a uma proliferação/expansão lateral do clone de células infectadas. Os genes ou tipos E6 e E7 e, possivelmente o E5 do HPV, parecem participar então prioritariamente, deste processo, com o potencial oncogênico do HPV; os genes E1 e E8 são responsáveis pela replicação viral e pela transformação celular. A região E ("early") do genoma, sede dos genes E1, E2, E5, E6, E7 e E8, representa cerca 45% do genoma desses vírus (Zur HAUSEN & VILLIERS, 1994; LE BUANEC *et al.*, 1999; CASON & KHAN, 1993; CUZICK *et al.*, 1994).

Durante a fase proliferativa da camada basal do epitélio, a síntese protéica estrutural do vírus pode ser lenta ou até manter-se parada, para depois voltar à atividade na fase de diferenciação celular; na qual a replicação do DNA, a síntese proteica e uma grande carga de partículas virais predominam (Zur HAUSEN & VILLIERS, 1994).

Há várias suposições quanto à clonalidade das células infectadas pelo HPV. Alguns consideram que apenas um clone de células é envolvido, enquanto outros acham que pode haver mais de um. Na verdade, a natureza clonal das células infectadas pelo HPV vai depender do número de células proliferativas expostas à infecção e da carga viral recebida pelo hospedeiro; ou seja, se uma grande área da camada basal foi exposta à infecção, a neoplasia envolverá vários clones de células que competirão entre si durante a expansão lateral da lesão. Tal comportamento corrobora a policlonalidade observada nas lesões iniciais (Zur HAUSEN & VILLIERS, 1994).

Diante de tantos antígenos, como seriam as reações do hospedeiro? Os linfócitos T citotóxicos CD8+ têm a capacidade de efetuar uma vigilância imunológica por reconhecerem e destruírem células potencialmente malignas, portadoras de proteínas de superfície mutantes que são apresentadas associadas a moléculas de classe I do MHC. Além deste mecanismo, células mononucleares isoladas de tumores, os chamados Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TIL), também incluem as células T citotóxicas com a capacidade de lisar células do tumor do qual foram isoladas (GHOSH & MOORE, 1992, BELL *et al.*, 1995, MOTA *et al.*, 1999).

Embora a minoria dos tumores expressem moléculas de classe II do MHC, os linfócitos T auxiliares CD4+ também participam da resposta anti-tumoral, fornecendo citocinas para o desenvolvimento dos linfócitos T citotóxicos efetivos e das células LNK (células citotóxicas naturais), e ainda secretando TNF e IFN- γ que podem favorecer a expressão de moléculas de classe I do MHC, permitindo a ação dos linfócitos T citotóxicos sobre as mesmas (AL-SALEH *et al.*, 1998, GEMIGNANI *et al.*, 1995).

Os macrófagos ativados *in vitro* podem realizar a lise de células tumorais sem lesar células normais. Eles também podem efetuar lise de células neoplásicas, na presença de IgG. A ação dos macrófagos sobre as células-alvo tumorais é a mesma que ocorre frente aos microorganismos; podendo incluir até a fagocitose, em casos de células neoplásicas soltas, com liberação de enzimas lisossômicas e metabólitos do oxigênio (superóxido).

Macrófagos ativados secretam também o TNF que promove necrose das células neoplásicas (NAKANO *et al.*, 1992).

Quanto aos anticorpos, eles podem ser produzidos nos hospedeiros portadores de tumores, mas não representam a resposta principal antitumor, por não ser a mais eficaz em destruição de tumores (ABBAS *et al.*, 1998).

• **Resposta Imune à Infecção Viral**

Os vírus são microorganismos intracelulares obrigatórios que exercem um parasitismo sobre as células infectadas, interferindo na sua biologia, síntese protéica e outras atividades funcionais. Alguns entram em células utilizando-se de moléculas normalmente expressas na superfície celular como é o caso do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que entra no linfócito T acoplando-se à molécula de CD4 e às quimoquinas ou o Vírus do Epstein-Barr (EBV) que se liga ao receptor para C3b do complemento (CR2/CD 21) dos linfócitos B. Sobre o HPV, não é conhecido ainda, por qual mecanismo ele penetra na célula; porém sabe-se que ele atinge epitélios com microlesões e acomete preferencialmente camadas epiteliais indiferenciadas (basal e parabasal) (Zur HAUSEN & VILLIERS, 1994; TINDLE & FRAZER, 1994; ZINKERNAGEL, 1993).

Representando a resposta imune natural a vírus, ocorre a produção pela célula infectada de interferon do tipo I (IFN- α ou IFN- β), que interfere na replicação viral, e as células citotóxicas naturais (LNL/NK) que lisam uma ampla variedade de células infectadas por vírus. Esses mecanismos agem no início da infecção viral, antes que os eventos da imunidade específica entrem em cena (TINDLE & FRAZER, 1994).

A resposta imune específica à infecção viral pode envolver mecanismos humorais e celulares, sendo o componente celular predominante e essencial, para um efetivo controle dos tecidos neoplásicos (GISSMANN, 1996).

Também, anticorpos podem ser produzidos contra glicoproteínas virais existentes nas células infectadas, expressas no capsídeo viral ou na membrana da célula. Nesta situação há a participação ativa do sistema complemento ao lado do anticorpo, que pode danificar o envoltório viral. O processo é chamado de viriólise. Alguns vírus também podem ativar a via clássica e a via alternativa do complemento, podendo desencadear a ação direta do sistema do complemento, sem precisar do anticorpo (ZINKERNAGEL, 1993).

Há síntese de anticorpos anti-virais no início da infecção que se ligam a proteínas do capsídeo viral, impedindo sua fixação e penetração nas células; mas, como já foi mencionado, os vírus são parasitos intracelulares obrigatórios e, por conseguinte, as células infectadas são reconhecidas como alvos a serem atingidos. Neste contexto, a participação dos linfócitos T citotóxicos vírus-específicos torna-se imprescindível. Esta ação dá-se principalmente através da lise de células infectadas, da estimulação de enzimas intracelulares que degradam o genoma viral e, até um certo ponto, da secreção de citocinas com atividade de interferon (WINDHAGEN *et al.*, 1996, ROITT *et al.*, 1997).

Mas os vírus podem burlar o sistema imune, escapando dos mecanismos imunológicos do hospedeiro. Uns, silenciosamente, permanecem vários anos no hospedeiro para então se manifestar; muitos (vírus têm a capacidade de serem muito mutagênicos, o que dificulta a vigilância imunológica e outros podem infectar células do sistema imune comprometendo suas funções (AHMED & BIRON, 1999; ROCHE, 1991).

2 OBJETIVOS

Em nosso país dados indicam que cerca de 50.664 mulheres morrem por ano de câncer sendo que 3.639 (7,18%) são de colo uterino, e Fortaleza é a 2ª capital brasileira em incidência deste tipo de tumor. Fatos alarmantes comparados a outros tipos de câncer cuja prevenção é pouco acessível (FERREIRA, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

2.1 Gerais

- ↳ Determinar o padrão de resposta imunológica local, estatisticamente mais significativa, nas diversas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.
- ↳ Correlacionar o índice de proliferação celular com o tipo e a gravidade da lesão.
- ↳ Estabelecer parâmetros morfométricos, baseado na quantificação das populações linfocitárias e de macrófagos, que possam estimar o prognóstico de uma lesão de baixo ou alto grau.

2.2 Específicos

- ↳ Tipificar mediante o uso de anticorpos monoclonais (estudo imunohistoquímico) as populações leucocitárias, especialmente as de macrófagos e linfócitos.
- ↳ Avaliação da resposta imunológica local nas diversas lesões proliferativas do colo uterino correlacionando-a com a gravidade da lesão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais (Amostra)

O material utilizado para este estudo retrospectivo foi selecionado de um total de 96 biópsias, que por sua vez já haviam sido selecionadas de um universo de 1.112 pacientes para um estudo também retrospectivo do perfil epidemiológico, clínico e anátomopatológico das lesões malpighianas de baixo e alto grau e lesões malpighianas invasoras - carcinoma escamoso infiltrante (Crum, 1999) de pacientes provenientes do Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará (IPCC) no período de 1996 e 1997, sendo escolhidas 61 amostras.

3.1.1 Critério de Escolha da Amostra

Para a escolha das amostras a serem estudadas utilizou-se como critério a condição do material constante do bloco de parafina ser suficiente para a realização de mais três secções histopatológicas para a realização das técnicas de imunohistoquímica.

As secções histopatológicas com espessura de 5µm e coradas pela HE foram analisadas em microscópio óptico Nikon por dois patologistas, separadamente, sendo seguidos apenas os casos em que houve concordância diagnóstica entre eles.

3.1.2 Tratamento das Amostras

As 61 amostras seleccionadas para este trabalho foram agrupadas segundo a classificação histológica do Consenso Paris Tobiac de 1991 (Gompel & Koss, 1997) sendo assim classificadas: 7 lâminas com epitélio normal, 15 lâminas como lesão malpighiana de baixo grau, destas, em 7 lâminas coexistiam áreas de epitélio normal, 12 lâminas como lesão malpighiana de alto grau e 27 lâminas como lesão malpighiana invasora, destas, em 6 lâminas coexistiam áreas de lesão invasora e áreas de lesão de alto grau.

As lesões invasoras epidermóides, foram agrupadas de acordo com a classificação estabelecida pelo Comitê Internacional de Terminologia para Câncer da Cérvix Uterina: - carcinoma epidermóide de grande células; - carcinoma epidermóide de pequenas células e carcinoma ceratinizante.

Nas secções coradas pela HE, foram também pesquisados os indícios de infecção celular pelo HPV, como coilocitose, binucleação, disceratose e papilomatose.

3.2 Métodos

3.2.1. Processamento dos Cortes Histológicos

As secções histopatológicas foram realizadas com espessuras de 4µm e aplicadas em lâminas pré-tratadas com organo-silano (3-aminopropiltriethoxysilano-APTS), previamente secas em estufa por 2 horas. Em alguns painéis imunohistoquímicos houve indisponibilidade de lâminas

de qualidade o que não conferiu adesividade adequada aos cortes, sendo necessária a reintrodução da lâmina inicialmente utilizada.

Inicialmente as secções seguiram uma rotina de hidratação consistindo de desparafinação em banhos em xilol seguida de tratamento das secções em séries de álcoois, com teor crescente de água até os banhos em água destilada, terminado por imersão das secções em solução de tampão Tris com pH 7,6 (Anexo 1).

3.2.2 Imunohistoquímica (CD-20, CD-43 e CD-68)

A identificação das células mononucleares foi realizada usando-se a técnica da Peroxidase antiperoxidase avidina-biotina (PAP) (Anexo 02) em secções de blocos incluídos em parafina (método de identificação fenotípica), com a utilização de anticorpos monoclonais específicos para proteínas da membrana celular de cada célula estudada.

3.2.2.1 Imunomarcadores Empregados

- **CD20**

CD20 é uma proteína não glicosilada com massa molecular de 33, 35 e 37 KDa presente na maioria das células B. O marcador utilizado é um anticorpo monoclonal de camudongo direcionado contra o antígeno (proteína) presente na membrana da célula B, pertencente ao clone L26, Codigo Nº M0755, Lote 107 (DAKO®, Dinamarca). O anticorpo utilizado é resistente à fixação pelo formol e reage contra um epítopo

intracitoplasmático localizado sob o CD20 da maioria das células B do sangue periférico, do tecido linfóide e dos imunoblastos B que são particularmente bem corados. Nenhuma reação deste anticorpo tem sido demonstrada em outras linhagens celulares hematopoéticas. Ele ainda reage com células de Linfomas de células B, sendo utilizado para fenotipificação destas neoplasias.

- **CD43**

CD43 é uma proteína glicosilada transmembranosa de alto peso molecular que é expressa em células T e nas células da linhagem mielóide. Esta proteína também é conhecida como leucosialina ou sialoforina. Tem um peso molecular variável com 140 e 130 KDa nas células promielocíticas, 110 KDa nas células mieloblásticas e 115 KDa nos linfócitos T do sangue periférico. O marcador utilizado é um anticorpo monoclonal de camundongo direcionado contra células T humanas, do Clone DF-T1, Código Nº M0786, Lote 066 (DAKO®, Dinamarca). Este anticorpo identifica células T normais e neoplásicas, é resistente à fixação pelo formol e ao processo de inclusão em parafina. Um pequeno número de Leucemias de células B e linfomas usualmente os do tipo de pequenas células (Leucemia crônica linfocítica de células B ou linfoma centrocítico) podem expressar esse antígeno (proteína CD43).

- **CD68**

O CD68 é uma proteína intracelular com fraca expressão superficial altamente glicosilada com peso molecular de 110 KDa que se localiza prioritariamente nos lisossomos, sua função ainda não é conhecida. O

marcador utilizado é um anticorpo de camudongo direcionado contra macrófagos, pertence ao clone KP1, Código N° M 0814, Lote 117 (DAKO®, Dinamarca). Este anticorpo pode identificar além dos macrófagos da polpa vermelha do baço, os do pulmão, os da medula óssea, uma grande variedade de outras células, como células apresentadoras de antígenos (APC), células de Kupffer e células de Langerhans. Monócitos e granulócitos do sangue periférico e precursores mielóides também são reativos a esse marcador. O anticorpo reage ainda com as chamadas células T ou B plasmocitóides presentes em muitos linfonodos reacionais as quais, acredita-se, serem de origem monocítica ou macrofágica.

3.2.3 Técnica da Imunoperoxidase

Lâminas hidratadas imersas em tampão Tris são colocadas em porta-lâminas (tipo borrel) de plástico (nunca de vidro) e são colocados dentro de um becker de vidro refratário (Pyrex®) (adaptação do LABTECH - Fig. 2), com solução de tampão citrato 10 μ mM, pH 6,0 (Anexo 01), ajustando o pH com cerca de 13ml de NaOH 2M, sendo então levadas ao forno de microondas, programado na potência máxima. Ligar o aparelho e esperar a ebulição (Fig. 3).

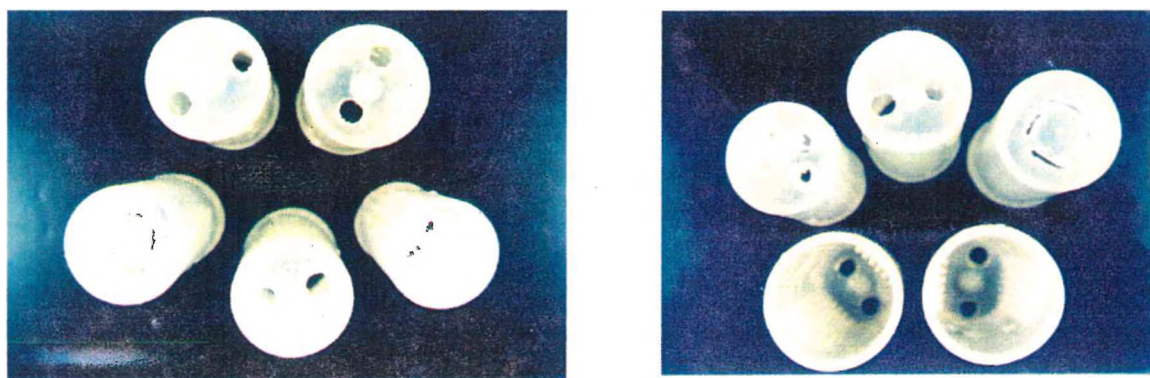


Figura 2: Tubos porta lâminas de plásticos com orifícios na base para ir ao microondas dentro do becker

Após o início da ebulição parar e marcar 7 minutos e 30 segundos; findos os quais retiram-se as lâminas do aparelho e deixam-nas no tampão citrato à temperatura ambiente por 20 minutos, em seguida procede-se a uma lavagem em TBS (Tris Buffered Salina) seguida de um banho em TBS por 5 minutos. Segue-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em metanol (Anexo 01) por 10 minutos em câmara escura (Becker envolvido em papel alumínio - Fig. 4).



Figura 3: Lâminas em solução de tampão citrato (fase de ebulição).



Figura 4: Bloqueio da peroxidase em câmara escura (Becker envolvido em papel alumínio).

Segue-se nova lavagem e banho em TBS semelhante ao já descrito. Neste momento, dá-se início à incubação em câmara úmida no soro normal de coelho, cuja diluição é de 1:5 em BSA - 1 porção do soro normal de coelho mais 4 porções de BSA - Soro Albumina-Bovina (Anexo 03) por 20 minutos, que tem por finalidade o bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos presentes nas secções, ao final retira-se o excesso da solução por aspiração. O próximo passo é a incubação com o anticorpo primário que irá diferenciar nas secções as células a serem estudadas (Fig. 5).

O anticorpo primário é então diluído de acordo com o protocolo do LABTECH (1:50) "over-night" (18-24h) a 8°C (Anexo 03). É importante ressaltar que todas as incubações são sempre protegidas do excesso de luz e que essas reações ocorrem na presença de controles positivos e negativos. Segue-se lavagem em TBS por 5 minutos. Destaca-se que as lavagens

realizadas a partir desta fase são realizados com o auxílio do aspirador (Adaptação do LABTECH - Fig 6).

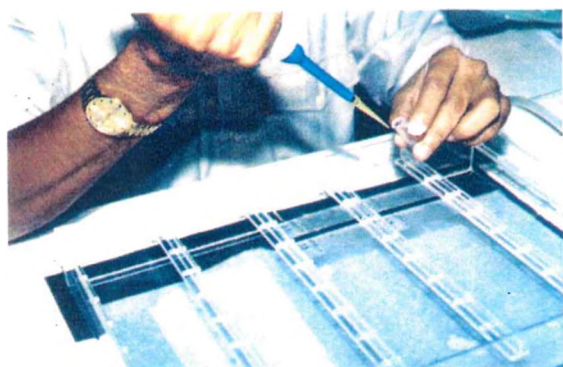


Figura 5: Incubação

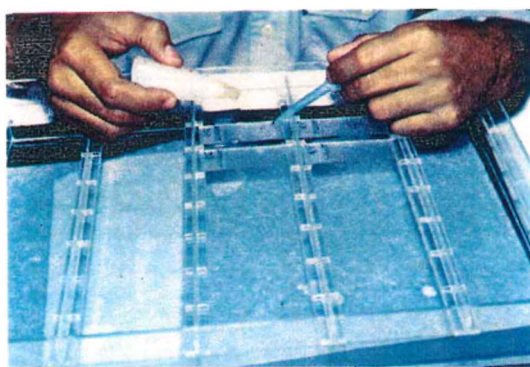


Figura 6: Lavagem com aspiração

Faz-se novamente em câmara úmida a incubação com o anticorpo secundário (Anticorpo de coelho anti-camundongo biotinilado) diluído a 1:200 (Anexo 03), cuja função é amplificar a reação anterior. Segue-se lavagem em TBS por 5 minutos. Realiza-se então a incubação em câmara úmida na estreptavidina por 30 minutos (Anexo 03) que dá continuidade à amplificação da reação. Segue-se lavagem em TBS por 5 minutos. Faz-se a revelação da reação com a 3,4-diaminobenzidina - DAB (Anexo 03) por 7 minutos. Em seguida lava-se abundantemente em água corrente eliminando-se primeiramente o excesso do DAB em hipoclorito de sódio, tendo-se o cuidado para que o jato de água não incida diretamente sobre as secções pela possibilidade de desprende-los das lâminas. Finalmente faz-se o contraste da reação com a hematoxilina de Harris (Anexo 01) por 30 segundos, lavar novamente em água corrente obedecendo às recomendações citadas anteriormente e a seguir para o preparo habitual da lâmina que consiste em desidratação e a diafanização das secções para a sua montagem utilizando-se bálsamo de Canadá®.

3.2.4 Protocolo para a Análise e Leitura das Secções (CD-20,CD-43 e CD-68)

A análise das secções foi realizada em microscópio óptico Nikon comum com objetivas de 40x e oculares de 10x. Inicialmente foram classificadas segundo a dispersão (distribuição) das células marcadas (1 significando um a dois focos; 2 significando três focos e 3 significando dispersão multifocal ou homogênea). As leituras foram feitas em 10 campos em correspondência às áreas subjacentes às lesões intra-epiteliais (baixo e alto grau); já nas neoplasias, as leituras foram realizadas em 10 campos aleatórios, uma vez que os leucócitos apresentavam-se e dispunham-se interpostos às células neoplásicas. Para efeito de referência, foram realizadas contagens em campos distantes da lesão intra-epitelial, nos casos nos quais se dispunha de fragmentos de conização, observados os citoplasmas nos quais a reação foi positiva.

3.2.5 Do Examinador e Controle de Qualidade

Foram escolhidos dois examinadores para efetuarem as leituras, ambos previamente treinados de modo homogêneo. Ambos realizaram a leitura da totalidade das secções. Sendo os dados comparados por suas médias aritméticas.

O controle de qualidade foi feito pela fonte treinadora, através da escolha aleatória de lâminas dos dois examinadores para releitura.

Os resultados foram comparados e avaliados conforme o modelo estatístico do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação do número médio de células CD20⁺ e CD43⁺ entre os tipos de lesão e da Análise de variância para a mesma comparação de células CD68⁺. Para conclusão

das diferenças significativas utilizou-se o nível de significância máximo de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados das leituras das 61 secções histopatológicas estão expressos no Quadro 2.

Foram encontradas no epitélio normal um valor médio entre os observadores de 58,29 células CD20+, 24,36 células CD43+ e 55,07 células CD68+ por lâmina; nas lesões de baixo grau o valor médio foi de 60,93 células CD20+, 47,50 células CD43+ e 91,27 células CD68+ por lâmina; nas lesões de alto grau este valor foi de 3,79 células CD20+, 97,50 células CD43+ e 69,83 células CD68+ e nos carcinomas invasores observou-se uma média de 134,89 células CD20+, 113,74 células CD43+ e 118,26 células CD68+.

Quadro 2: Valores descritivos e percentuais do CD20, CD43, CD68, em relação ao epitélio normal e às lesões escamosas do colo uterino.

Lesão do Colo do Útero	Normal			Baixo Grau			Alto Grau			CA		
	CD20	CD43	CD68	CD20	CD43	CD68	CD20	CD43	CD68	CD20	CD43	CD68
Média	58,29	24,36	55,07	60,93	47,50	91,27	3,79	97,50	69,83	134,89	113,74	118,26
Erro Padrão	51,28	39,31	44,10	36,93	68,85	61,45	12,36	121,07	38,45	125,39	94,76	46,11
Mediana	33,50	3,50	34,50	54,00	5,50	74,50	0	61,75	74,00	87,50	84,00	121,50
Amplitude	8-159	0-94	7-123	10-135	0-253	229-12	0-43	0-416	0-126	5-593	10-442	0-208

4.1 Análise do CD20

Resultados com o uso do teste não Paramétrico de Kruskal-Wallis:

Quadro 3: Teste Kruskal-Wallis para a comparação do número médio de células CD20+ entre os tipo de lesões.

LESÃO	N	POSTO MÉDIO
NORMAL	7	29,1429
BAIXO GRAU	15	31,0000
ALTO GRAU	12	7,5833
CA	27	41,8889
TOTAL	61	
$\chi^2 = 31,213$	GL=3	P<0 ,0001

Assim, pelo quadro 3 nota-se que existe diferença altamente significativa, ($p \leq 0,0001$), do número médio de células CD20+ entre os tipo de lesões.

Verificando quais são os tipos de lesões cujo número médio de células CD20+ diferem significativamente foram encontrados:

Quadro 4: Teste de sub-hipóteses Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5% para a comparação do número médio de células CD20 entre os tipo de lesões.

LESÃO	ALTO GRAU		CA		NORMAL	
	Diferença entre os posto médios	DMS ⁽¹⁾ entre os posto médios	Diferença entre os posto médios	DMS ⁽¹⁾ entre os posto médios	Diferença entre os posto médios	DMS ⁽¹⁾ entre os posto médios
BAIXO GRAU	23,42	13,4763	10,89	11,2053	1,86	15,92733
ALTO GRAU			34,31	12,0722	21,56	16,5487
CA					12,75	14,7582

(1) DMS = diferença mínima significativa

(*) = significativa a 5%

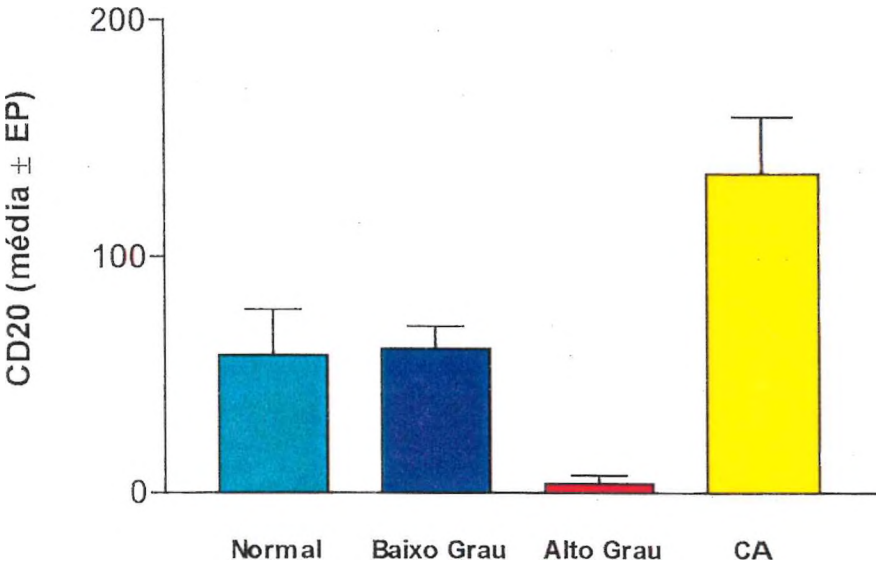
Quadro 5: Quadro resumo das comparações, nível de significância de 5%, duas a duas as médias do número de células CD20+ para cada tipo de lesões.

LESÃO		Conclusão ao nível de significância de 5%
BAIXO GRAU	ALTO GRAU	Existe diferença significativa
	CA	Nada leva a crer que existe diferença significativa
	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa
ALTO GRAU	CA	Existe diferença significativa
	NORMAL	Existe diferença significativa
CA	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa

Assim, pelo quadro 5 nota-se que existe diferença significativa entre o numero médio de células CD20+ para as lesões de ALTO GRAU em relação as lesões de BAIXO GRAU, CA e NORMAL sendo que, segundo os

dados observados, as lesões do tipo ALTO GRAU apresentaram um numero **médio inferior** de células CD20+ que as lesões do tipo BAIXO GRAU bem como também que as lesões do tipo CA e NORMAL.

Gráfico 1: Média mais ou menos erro padrão da média do número médio de células CD20+ por lâmina em função do tipo de lesão.



1.2.3.2 Vírus do Papiloma Humano (HPV)

Os vírus tornaram-se então o principal alvo das pesquisas oncogênicas (Zur-HAUSEN, 1976 e JABLONSKA, 1979) demonstraram, através da técnica de hibridização molecular, a existência de 4 tipos de HPV em verrugas cutâneas e lesões anogenitais sendo que, em algumas, foi demonstrado seu potencial oncogênico.

Utilizando microscopia eletrônica, Della Torre e Laverty (1978) detectaram partículas virais no condiloma plano. A confirmação de que tratava-se do HPV veio com Jenson (1980) que desenvolveu anticorpos grupos-específicos que agiam contra proteínas do capsídeo viral de uma grande variedade de vírus de papilomas humanos e de animais. Quase simultaneamente foram descritas alterações epiteliais na cérvix uterina por Purola e Savia (1977), com aspectos citológicos idênticos aos do condiloma acuminado, principalmente em seu aspecto papilar (DE PALO *et al.*, 1993; KREBS, 1993).

Nas últimas duas décadas a demonstração e tipificação do HPV em diversas lesões anogenitais e orais vem ganhando abrangência mundial, com a identificação de mais de 100 tipos entre os que já foram encontrados tanto em animais como em humanos (FERREIRA, 1999).

A identificação da infecção por HPV como principal fator envolvido na carcinogênese cervical, resultou em inestimável progresso para a compreensão das condições de instalação e progredição do câncer cervical.

Até os mais raros tipos de HPV's, encontrados em seres humanos estão amplamente difundidos. Os mesmos genótipos (HPV 5, 8, 10, 12, 14, 17, entre outros) de pacientes com epidermodisplasia verruciforme hereditária ocorrem mundialmente em baixa frequência (JABLONSKA *et al.*, 1979; JABLONSKA, 1982; Zur-HAUSEN, 1996). Igualmente outros tipos de HPV que infectam a pele, as mucosas oral e genital foram descobertos em

várias partes do mundo, corroborando a suspeita de um antigo (remoto) relacionamento de infecções por HPV e seres humanos.

O modo de transmissão ocorre por via sexual em 95% dos casos e em 5% por fômites, havendo a proposição de que o principal fator seja a infecção da camada basal, por ocasião de microlesões, sendo as junções de diferentes epitélios os sítios preferenciais pela proximidade da camada de células proliferativas da superfície (BOSCH, 1995; FUCHS, 1988; EDWARDS, 1995).

Estudos epidemiológicos e experimentais sugeriram que a infecção por certos tipos de HPV's estariam diretamente relacionada à patogênese dessa patologia e mostraram também a presença do HPV em aproximadamente 95% dos casos de câncer do colo uterino (SCHOELL *et al.*, 1999; BOSCH, 1995).

Apesar da confirmação da presença do HPV em lesões precursoras e neoplásicas malignas da cérvix uterina, o isolamento de DNA's HPV-específicos em epitélio escamoso de pacientes sem lesão colposcópica, levantou a hipótese de que o vírus não poderia ser utilizado como um parâmetro isolado. Neste sentido caberia a avaliação da resposta imune local e sistêmica como contribuinte para manutenção ou não do equilíbrio morfológico e da maturação do epitélio escamoso em suas diversas apresentações expostas ao HPV (FUCHS *et al.*, 1988; Zur HAUSEN, 1996).

4.2-ANÁLISE DO CD43

Usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis temos:

Quadro 6: Teste Kruskal-Wallis para a comparação do número médio de células CD43 entre os tipo de lesões.

LESÃO	N	POSTO MÉDIO
BAIXO GRAU	15	22,3000
ALTO GRAU	12	31,7500
CA	27	39,1296
NORMAL	7	17,0000
TOTAL	61	
$\chi^2 = 13,670$	GL=3	P=0,003

Assim, pelo quadro 6 nota-se que existe diferença, p=0,003, do número médio de células CD43+ entre os tipos de lesões.

Verificando quais são os tipos de lesões cujo número médio de células CD43+ diferem significativamente encontramos:

Quadro 7: Teste de sub-hipóteses Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5% para a comparação do número médio de células CD43 entre os tipo de lesões.

LESÃO	ALTO GRAU		CA		NORMAL	
	Diferença entre os posto médios	DMS ⁽¹⁾ entre os posto médios	Diferença entre os posto médios	DMS ⁽¹⁾ entre os posto médios	Diferença entre os posto médios	DMS ⁽¹⁾ entre os posto médios
BAIXO GRAU	9,45	13,4763	16,83	11,2053	5,30	15,9273
ALTO GRAU			7,38	12,0722	14,75	16,5487
CA					22,13	14,7582

(1) DMS = diferença mínima significativa

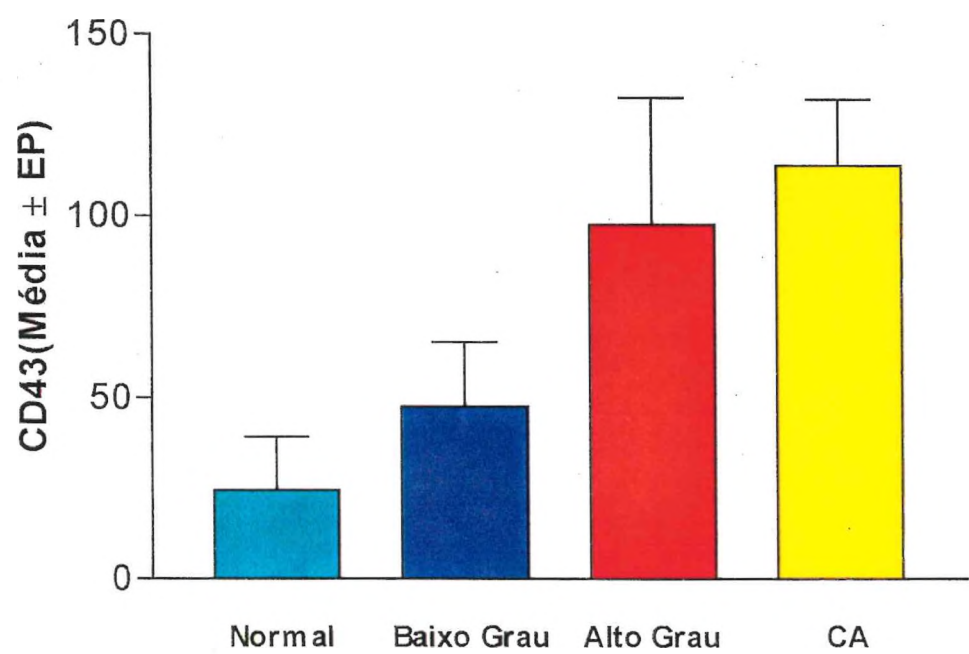
(*) = significativa a 5%

Quadro 8: Quadro resumo das conclusões, nível de significância de 5%, da comparação duas a duas a média do número de células CD43+ para cada tipo de Lesões.

LESÃO		Conclusão ao nível de significância de 5%
BAIXO GRAU	ALTO GRAU	Nada leva a crer que existe diferença significativa
	CA	Existe diferença significativa
	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa
ALTO GRAU	CA	Nada leva a crer que existe diferença significativa
	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa
CA	NORMAL	Existe diferença significativa

Assim, pelo quadro 8 nota-se que existe diferença significativa entre o numero médio de células CD43+ para as lesões de CA em relação as lesões BAIXO GRAU e NORMAL sendo que, segundo os dados observados, as lesões do tipo CA apresentaram um numero **médio superior** de células anti-CD43 que as lesões de BAIXO GRAU bem como das lesões NORMAIS.

Gráfico 2: Média mais ou menos erro padrão do número de células CD43+ por lâminas em função do tipo de lesão.



4.3 ANÁLISE DO CD68

Usando a Análise de variância temos:

Quadro 9: Quadro da análise de variância para a comparação do número médio de células CD68+ entre os tipo de lesões.

Fonte de Variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F-Snedecor	p
Lesões	3	33574,771	11191,590	4,6875	0,00539
Resíduo	57	136088,499	2387,518		
TOTAL	60	169663,270			

Assim, pelo quadro 9 nota-se que existe diferença, $p=0,00539$, do número médio de células CD68+ entre os tipo de lesões.

Verificando quais são os tipos de lesões cujo número médio de células CD68+ diferem significativamente encontramos:

Quadro 10: Teste de Tuckey para a comparação dois a dois o número médio de células CD68+ entre os tipos de lesões.

TIPO DE LESÃO		Diferença média	DP (diferença média)	p	Intervalo de Confiança para a diferença média
Baixo Grau	Alto grau	21,4333	18,9243	0,6711	[-28,6498; 71,5164]
	CA	-26,9926	15,7351	0,3253	[-68,6357; 14,6505]
	NORMAL	36,1952	22,3661	0,3767	[-22,9967; 95,3871]
Alto grau	CA(*)	-48,4259	16,9525	0,0296	[-93,2907; -3,5612]
	NORMAL	14,7619	23,2386	0,9202	[-46,7392; 76,2630]
CA	NORMAL(*)	63,1878	20,7244	0,0178	[8,3407; 118,0350]

Quadro 11: Quadro resumo das conclusões da comparação duas a duas as médias do número de células CD68+ para cada tipo de lesões.

LESÃO		Conclusão	p
BAIXO GRAU	ALTO GRAU	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,6711
	CA	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,3253
	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,3767
ALTO GRAU	CA	Existe diferença significativa	0,0296
	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,9202
CA	NORMAL	Existe diferença significativa	0,0178

Assim, pelo quadro 11 nota-se que:

- existe diferença significativa, $p=0,0296$, entre o numero médio de células CD68+ para as lesões de alto grau e Ca sendo que, segundo os dados observados, as lesões de alto grau apresentaram um numero médio inferior de células CD68+ que as lesões CA
- existe diferença significativa, $p=0,0178$, entre o numero médio de células CD68+ para as lesões de Ca e ausência de lesões (lesões normais) sendo que, segundo os dados observados, as lesões normais apresentaram um numero médio inferior de células CD68+ que as lesões CA.

Gráfico 3: Média e intervalo de confiança para a média com um coeficiente de confiança de 95% para o número médio de células CD68+ por lâmina em função do tipo de lesão.

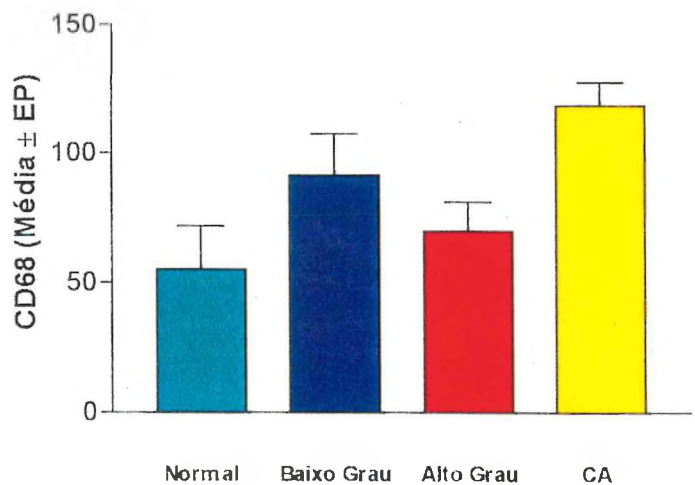
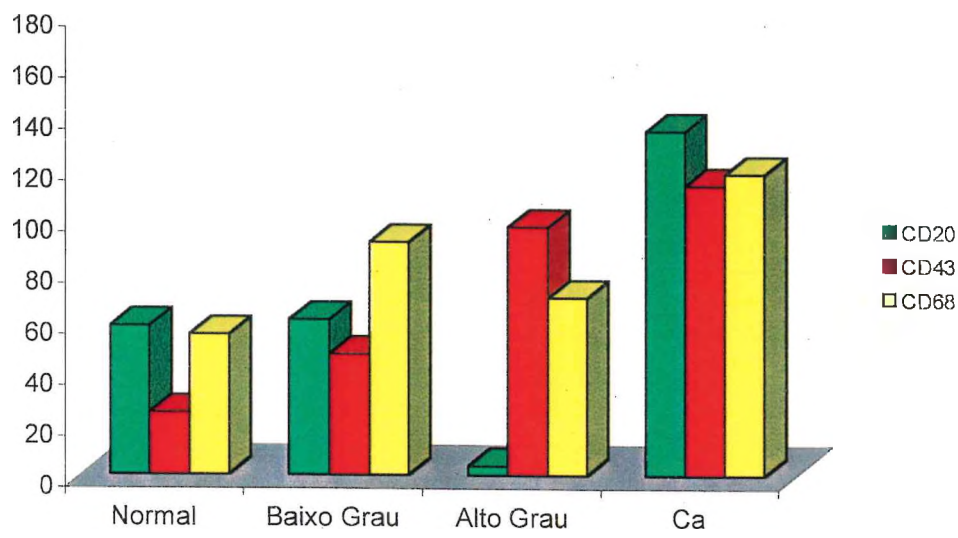


Gráfico 4 – Média dos resultados dos imunomarcadores (CD20, CD43, CD68) segundo distribuição do normal e das lesões de baixo grau, alto grau e carcinomas cervicais.



4 -ANÁLISE DO %CD20

Quadro 12: Quadro da análise de variância para a comparação das médias do % de células CD20+ por lâmina entre os tipo de lesões.

Fonte de Variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F-Snedecor	p
Lesões	3	10279,16	3426,386	11,3702	P < 0,0001
Resíduo	57	17176,83	301,348		
TOTAL	60	27455,99			

Assim, pelo quadro 12 nota-se que existe diferença, $p < 0,0001$, no número médio do % de células CD20+ por lamina entre os tipo de lesões.

Verificando quais são os tipos de lesões cuja média do % células CD20+ por lamina diferem significativamente encontramos:

Quadro 13: Teste de Games-Howell para a comparação duas a duas a média da variável transformada do % de células CD20+ por lâmina entre os tipo de lesões.

TIPO DE LESÃO		Diferença média	DP(diferença média)	p	Intervalo de Confiança para a diferença média
Baixo Grau	Alto grau	27,9956	6,723258	0,0006	[10,2025; 45,7887]
	CA	-1,56721	5,59025	0,9922	[-16,3618; 13,2274]
	NORMAL	-14,2606	7,946041	0,2865	[-35,2899; 6,7686]
Alto grau	CA	-29,5628	6,022737	0,0001	[-45,5020; -13,6236]
	NORMAL	-42,2562	8,256031	< 0,0001	[-64,1058; -20,4066]
CA	NORMAL	-12,6934	7,362795	0,3210	[-32,1791; 6,7922]

Quadro 14: Quadro resumo das conclusões, da comparação duas a duas as médias do % do numero de células CD20+ por lâmina para cada tipo de lesão.

LESÃO		Conclusão	p
BAIXO GRAU	ALTO GRAU	Existe diferença significativa	0,0006
	CA	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,9922
	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,2865
ALTO GRAU	CA	Existe diferença significativa	0,0001
	NORMAL	Existe diferença significativa	<0,0001
CA	NORMAL	Nada leva a crer que existe diferença significativa	0,3210

Assim, pelo quadro 14 nota-se que existe diferença significativa, entre a lesão de Alto Grau e os demais tipo de lesão na média do % células CD20+ por lamina sendo que, segundo os dados observados, as lesões de alto grau apresentaram em média um menor valor para o % células CD20+ quando comparado com as demais lesões.

5-ANÁLISE DO %CD43

Quadro 15: Quadro da análise de variância para a comparação das médias do % de Células CD43+ por lâmina entre os tipo de lesões.

Fonte de Variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F-Snedecor	p
Lesões	3	4430,6698	1476,89	2,4798	0,0702
Resíduo	57	33946,798	595,5579		
TOTAL	60	38377,468			

Assim, pelo quadro 15 nota-se que, segundo os dados observados, não existe diferença, $p=0,0702$, no número médio do % de células CD43+ por lamina entre os tipo de lesões.

6 ANÁLISE DO %CD68

Quadro 16: Quadro da análise de variância para a comparação das médias do % de células CD68+ por lâmina entre os tipo de lesões.

Fonte de Variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F-Snedecor	p
Lesões	3	3176,47	1058,8237	2,2138	0,0963
Resíduo	57	27262,60	478,2912		
TOTAL	60	30439,07			

Assim, pelo quadro 16 nota-se que, segundo os dados observados, não existe diferença, $p=0,0963$, no número médio do % de células CD68+ por lamina entre os tipo de lesões.

5 DISCUSSÃO

Na resposta imune local da cérvix uterina, estão envolvidas mais efetivamente as células epiteliais e os leucócitos mononucleares, entre outras células; sendo os leucócitos mononucleares residentes de lesões pré-malignas e malignas o objeto do nosso estudo. Esta discussão será iniciada com um breve esclarecimento do papel da célula epitelial nesta resposta.

Tanto a qualidade da resposta imune do hospedeiro, como a ação do agente patógeno, influenciam diretamente na progressão ou na regressão das lesões neoplásicas do colo uterino. Apesar de mais de 95% das neoplasias cervicais estarem associadas ao HPV, o grau de transformações das células não é suficiente para a manifestação de todas as alterações no fenótipo celular. Outros fatores intrínsecos do hospedeiro parecem contribuir para o processo tumorigênico (JACOBS *et al*, 1998).

O HPV tem sido responsabilizado por causar uma supressão da resposta imune celular. Sabe-se que há uma depleção intra-epitelial no número de macrófagos e linfócitos T “helper” (CD4+) na mucosa cervical na vigência desta infecção viral. Estas observações conduzem à especulação de que o HPV pode interferir no recrutamento e ativação dos macrófagos e linfócitos no epitélio cervical (WOODWORTH & SIMPSON, 1993).

Na infecção por HPV da cérvix uterina, o alvo natural é o queratinócito. Estudos têm mostrado que estas células em cultura podem secretar várias citocinas que são essenciais ao processo de resposta imune local do hospedeiro. Entre as citocinas secretadas pelos queratinócitos destacam-se a IL-1 α ou IL-1 β , assim como IL-1RA (Receptor Antagonista para IL-1). Essas citocinas desempenham importante papel como mediadoras da resposta inflamatória e imune, estimulando os próprios queratinócitos a sintetizarem outras citocinas como IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- α . De modo particular, o GM-CSF estimula o crescimento e a atividade

biológica dos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, enquanto a IL-8 faz o recrutamento destas células para o sítio da infecção; já o TNF- α promove a produção de moléculas de adesão e a expressão de antígenos de histocompatibilidade, que participam da apresentação do antígeno viral, que conduz ao reconhecimento e à lise das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (CD8+). Estes fatos demonstram que a produção de citocinas tem um papel determinante na prevenção ou na limitação da infecção por HPV na cérvix uterina (WOODWORTH & SIMPSON, 1993).

A diminuição no número de macrófagos e a proporção entre linfócitos T “helper” e T citotóxico no epitélio cervical, atribuídos à infecção por HPV, associam-se a lesões pré-neoplásicas, bem como aos carcinomas (GEMIGNANI, 1995).

Fundamentado nessas informações, tanto conhecidas quanto presumidas, podemos atribuir ao HPV uma capacidade para modular a expressão das respostas imunes locais de tal forma que possa propiciar a sua permanência nas células cervicais infectadas e induzir, nas mesmas, as transformações pré-malignas e malignas.

5.1 A Expressão do Imunomarcador CD20

- **Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau (LIMBG)**

Nas Lesões de baixo grau os efeitos citopáticos e a expressão viral do HPV no queratinócito é exuberante, pois a produção viral é máxima; havendo portanto uma oferta de antígenos virais em grande quantidade no sítio da lesão (WOODWORTH & SIMPSON, 1993), o que proporciona uma grande resposta humoral inicialmente. Ou seja, após a ativação dos linfócitos T CD4⁺ os linfócitos B são ativados e orientados no sentido de uns se

iferenciarem em plasmócitos e secretarem imunoglobulinas específicas para pítopos virais, enquanto outros se diferenciarem em células B de memória. Este dado condiz com o achado neste trabalho uma média percentual de 1,47% de células CD20+ nas lesões de baixo grau, comparada a 3,47% nas esões de alto grau. A presença significativa do linfócito B nos carcinomas rvasores (33,04%) será discutida mais adiante.

A resposta humoral na lesão de baixo grau parece estar mais elacionada com a expressão imunogênica do HPV do que por alterações elulares de natureza displásica; visto ainda que estas lesões estão mais eqüentemente relacionadas com os subtipos virais 6 e 11 (LORINCZ *et al*, 1987; ERON, 1986) que não participam no geral com alterações celulares malignas, sendo esta capacidade reservada mais freqüentemente para os ubtipos 16, 18, 31 e 45 (Le BUANEC, 1999). Os virus HPV 6 e 11 também ão participam de alterações que imunocomprometa o hospedeiro, podendo mecanismo de vigilância imunológica funcionar adequadamente (GRUIJL *t al*, 1998; McCANCE *et al*, 1988; FRANCO, 1995).

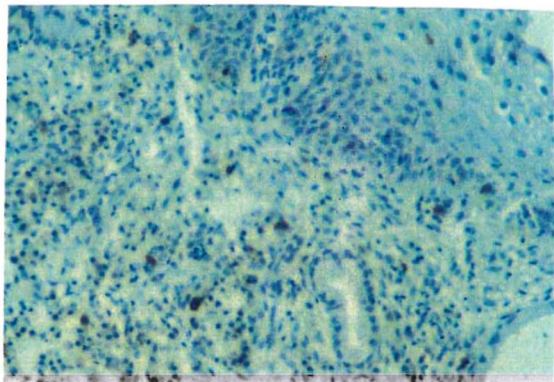


**Fig. 7: Lesão intra-epitelial malpighiana
baixo grau CD20 (PAP- 100x) caso
n° 6624/96**

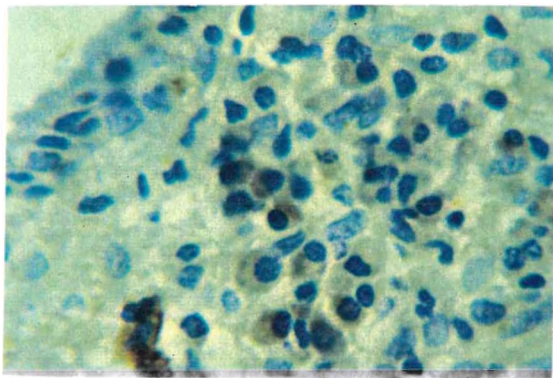


**Fig. 8: Lesão intra-epitelial malpighiana
baixo grau CD20 (PAP- 400x) caso
n° 6624/96**

- **Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau (LIMAG)**

Nas lesões de alto grau, há uma supressão da resposta humoral relacionada à diminuição significativa no número de células CD4⁺ nas lesões neoplásicas progressivas comparada à encontrada nas lesões neoplásicas em regressão (TAKEHARA, 1996). Embora possa haver um aumento numérico das células T no sítio da lesão, tal aumento se dá principalmente às custas de linfócito T citotóxico CD8⁺; por conseguinte há uma desproporção destas duas populações celulares (↓Linfócito Th1, ↑Linfócito T CD8⁺) (AL-SALEH *et al*, 1998).

As células CD4⁺ participam da ativação das células B, através das citocinas, tais como IL-2, IL-4 e IL-5, as quais, como já foi abordado na introdução, induzem a mitose e a diferenciação das células B.

Nos dados apresentados, foi evidenciado uma diminuição acentuada das células CD20⁺ nas lesões de alto grau, comprovada por uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre as médias de células CD20⁺ nas lesões de baixo e alto grau; fato que voltará a se repetir, mas no sentido oposto, quando comparado aos carcinomas invasores.

Nas lesões de alto grau há o início do comprometimento imunológico do hospedeiro que conta com a capacidade dos subtipos de HPV, principalmente o 16 e o 18, capazes de interferirem significativamente no funcionamento das células imunes, tornando as células hospedeiras suficientemente autônomas para replicação; escapando, desta forma, dos mecanismos antivirais naturais. É visto ainda que nesta fase há modificações morfológicas e funcionais; resultando nas conseqüentes expressões antigênicas exuberantes, não só devido ao parasitismo viral, mas também devido ao avanço do grau neoplásico (GRUIJL *et al*, 1998; McCANCE *et al*, 1998).

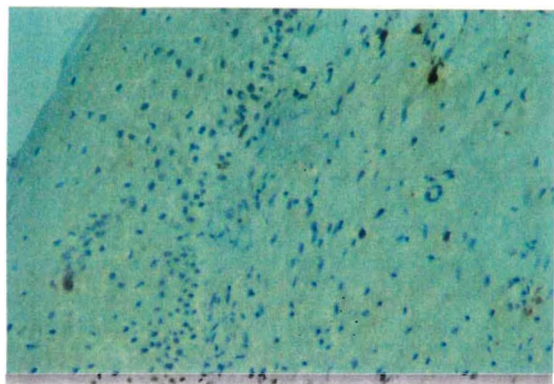


Figura 9: Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD20 (PAP-100x) caso nº 6458/96

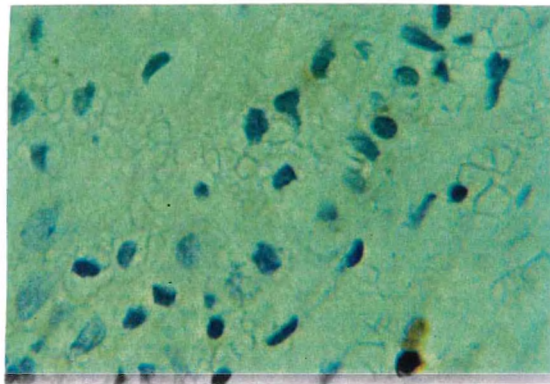


Figura 10: Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD20 (PAP-400x) caso nº 6458/96

- **No Carcinoma Invasor**

Após à resposta humoral inicial, os vírus podem permanecer latentes e silenciosos, por um longo período (meses/anos), para então, por ocasião de uma imunodepressão secundária, poder haver uma reativação viral com a conseqüente participação das células de memória específicas para aqueles antígenos. Esta segunda resposta é conhecidamente mais intensa. Pode-se então especular que no estágio de carcinomatose haveria tal comportamento, estimulada agora pela presença de antígenos tumorais, em expressão nas células neoplásicas (HACHISUGA *et al*, 1989).

Estudos anteriores de outros autores, revelaram que os títulos de anticorpos contra vírus HPV, especialmente contra as proteínas E6 e E7 dos sorotipos 16 e 18, aumentariam à medida que a gravidade da lesão progredisse (AL-SALEH *et al*, 1998). Neste sentido pode-se concluir que a resposta imune humoral evidenciada ao HPV reflete mais a progressão tumoral do que constitui como um mecanismo protetor contra o tumor (NIMAKO *et al*, 1997).

Nos carcinomas invasores, foi observada a maior média de células CD20⁺ comparada aos outros tipos de lesões, ou seja 134,89 células marcadas por secção. Esta observação, parece convalidar a análise exposta

acima, de que a resposta secundária promovida, em parte, pelas células de memória diferenciadas desde o primeiro contato com o vírus do HPV e ativadas pela renovação de antígenos virais, nas células neoplásicas, está promovendo uma maior presença dos linfócitos B/plasmócitos responsáveis pela expressão da imunidade humoral. Adicionalmente, a elevada presença das células da resposta humoral no tecido neoplásico pode estar relacionada também ao reconhecimento de novos antígenos específicos expressos no tumor (TSA), associados ao processo de diferenciação das células pré-malignas em células agressivas dos carcinomas invasivos. Todas estas moléculas fornecem subsídios a uma resposta humoral algo mais exacerbada que a inicial, por circunstâncias um pouco diferentes do que nas lesões de baixo grau (MAJEWSKI & JABLONSKA, 1998).

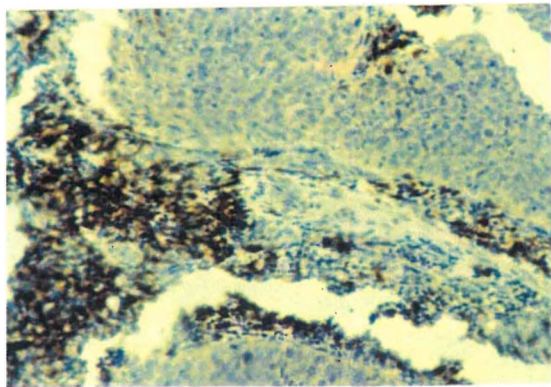


Figura 11: Carcinoma invasor do colo uterino (PAP 100x) CD20 caso nº 6013/96

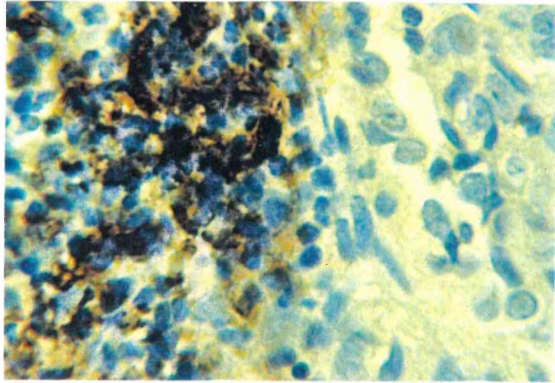


Figura 12: Carcinoma invasor do colo uterino (PAP 400x) CD20 caso nº 6013/96

5.2 A Expressão do Imunomarcador CD43

- **Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau (LIMBG)**

Como foi visto anteriormente, há um evento comum às respostas imunes celular e humoral que precede todos os outros que é o de ativação da célula T CD4⁺, o qual funciona como mediador da manutenção do estado

de sua própria ativação. Assim, para que haja ativação de células B e T, há antes a prévia participação de células T CD4⁺ ativadas.

Além disso os linfócitos T participam ativamente da resposta imune a vírus. Como já foi referido, nas lesões de baixo grau, por causa da expressão viral máxima, existe uma marcante participação destas células. No entanto, há relatos (TAKEHARA, 1996) de que com a progressão da gravidade da lesão, a resposta celular acompanharia, promovendo um aumento maior em termos de quantidade de células em atividade. Os dados deste trabalho fornecem números que confirmam esta progressão (a média das células nas lesões de baixo grau foi de 47,50 células/secção em comparação com 97,50 nas lesões de alto grau).

Nesta fase, a resposta imune celular tem seu alvo direcionado mais especificamente às alterações celulares de natureza viral, em virtude de sua expressão marcante. Então, as células T citotóxicas são ativadas a conter a progressão das lesões. Aqui se observa, em alguns casos, até a resolução completa da infecção viral e as recuperações morfo e fisiológica do tecido, com ou sem intervenção terapêutica; refletindo talvez o grau de “inocência” da lesão, não somente pelo estágio “*per si*”, mas também pela participação mais freqüente de sorotipos mais inofensivos como os tipos 06 e 11 (LORINCZ *et al*, 1987); como também da eficácia da imunidade citotóxica mantida pelo indivíduo.

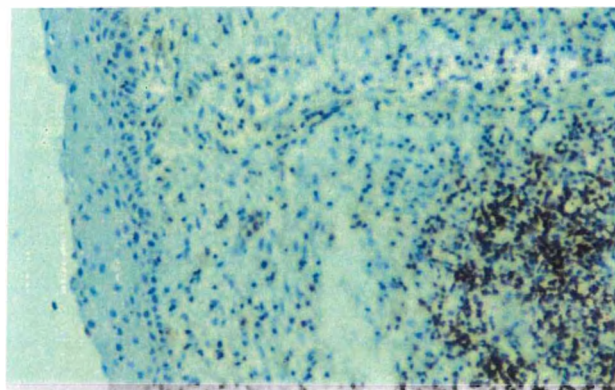


Figura 13: Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD43 (PAP-100x) caso n° 6624/96

- **Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau (LIMAG)**

Há nas lesões de alto grau um aumento no número de células CD43+, apesar de como já foi mencionado, haver uma diminuição dos linfócitos T CD4+. Este aumento se dá tanto na população dos linfócitos T “helpers” como na dos linfócitos T citotóxicos, sendo que estes últimos aumentam proporcionalmente mais. Este aumento numérico, no entanto, não é acompanhado por um aumento da ativação ou ação destas células, o que seria de grande valia para defesas do organismo contra o tumor. Ao contrário, o que é visto são populações linfocitárias provavelmente enfraquecidas nas suas capacidades de secretarem citocinas, necessárias ao seu pleno exercício imunológico. Assim, é visto uma diminuição na produção de IL-12, secretada pelos linfócitos B, monócitos, macrófagos, polimorfonucleares e células dentríticas; de IL-10 produzida pelos linfócitos Th2 (JACOBS *et al*, 1997); de IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA oriundas dos queratinócitos; e ainda de IL-8, GM-CSF e TNF- α também fornecidas pelos queratinócitos sob estímulo da IL-1 (WOODWORTH & SIMPSON, 1993; COMECI, 1996; CLERICE, 1997). Estudos mostraram que havia um aumento significativo da densidade de células IL-4+ em lesões de baixo e alto grau, comparadas com células de tecidos ectocervical normal. Este excesso na produção de IL-4 por células Th2 pode representar um prenúncio do comprometimento de uma resposta imune celular eficiente, situação esta observada em algumas pacientes (AL-SALEH *et al*, 1998).

A média de células CD43+ encontrada nas lesões de alto grau do presente estudo foi de 97,50 unidades por secção, levando a crer que não é apenas o número de células que revelaria a atividade imunológica mas sim a qualidade do funcionamento das mesmas; haja visto que a expressão elevada do CD43 relaciona-se com o estado ativado do linfócito T CD4+ em interação com APC.

Como já foi referido anteriormente existe a participação preferencial dos chamados HPV de alto risco oncogénico que têm mecanismos gênicos habilitados em confundir o sistema imune do hospedeiro (Ref. 43). A frequência de lesões pré-neoplásicas e carcinomas em pacientes infectadas pelo vírus HIV sugerem que a participação dos linfócitos CD4+ estaria presente na prevenção ou limitação da progressão dessas células ao estado neoplásicos mais agressivos e metastáticos (EDWARDS *et al*, 1993; BARBERIS *et al*, 1998; AL-SALEH *et al*, 1998).

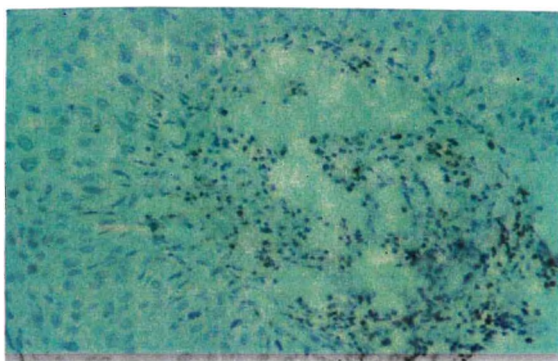


Figura 14: Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD43 (PAP-100x) caso nº 1063/96

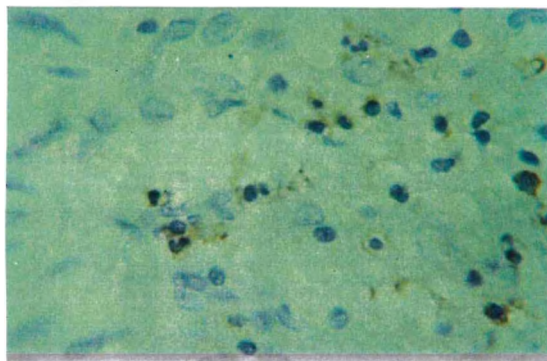


Figura 15: Lesão intra-epitelial malpighiana alto grau CD43 (PAP-400x) caso nº 1063/96

- **No Carcinoma Invasor**

Sendo a resposta celular a principal na ação contra os tumores, existe uma expressão máxima da atividade dos linfócitos T (BELL, 1995; EVANS, 1997).

Com o aumento da gravidade da lesão, há um aumento na quantidade de células CD43+ nos carcinomas invasores da cérvix uterina, neste caso apesar do aumento numérico superar modestamente o encontrado na lesão de alto grau (113,74 células CD43+ por secção contra 97,50 células por secção nas lesões de alto grau), aqui estas células são ainda menos capazes de desempenhar adequadamente, para produzir as citocinas necessárias à

mediação das respostas imunes eficazes nas defesas contra neoplasias (WOODWORTH & SIMPSON, 1993; TAKEHARA, 1996).

Esta incapacidade é atribuída à presença e expressão do HPV (Ref.01, 31, Japones), principalmente na ação das suas proteínas E6 e E7 que inibem diretamente a produção de citocinas (ROUTES & RYAN, 1995). O fato de haver muitas células CD4+ produtoras de IL-4 nas lesões neoplásicas de alto grau e nos carcinomas invasores, fala a favor da presença de células Th2 não promotoras de mecanismos efetores de defesas contra lesões HPV induzidas na cérvix uterina (TARTOUT *et al*, 1994).

Há, ainda, nas lesões de alto grau e nos carcinomas invasores uma diminuição da expressão, ao nível da membrana das células neoplásicas cervicais, das moléculas da classe II do MHC, o que dificulta o reconhecimento do antígeno pelo linfócito T CD4+, como também a apresentação dos antígenos por parte das células apresentadoras de antígenos (GHOSH & MOORE, 1992; ARANY & TYRING, 1996; AL-SALEH *et al*, 1998).

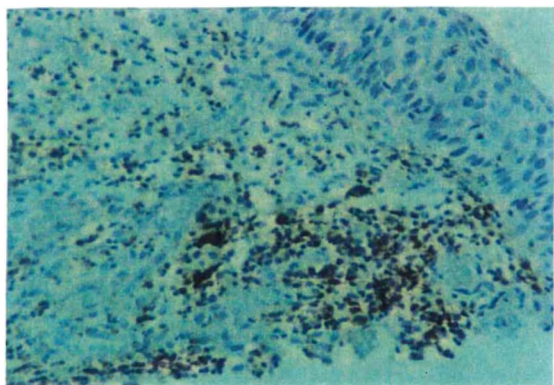


Figura 16: Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-100x) CD43 caso n° 6633/96

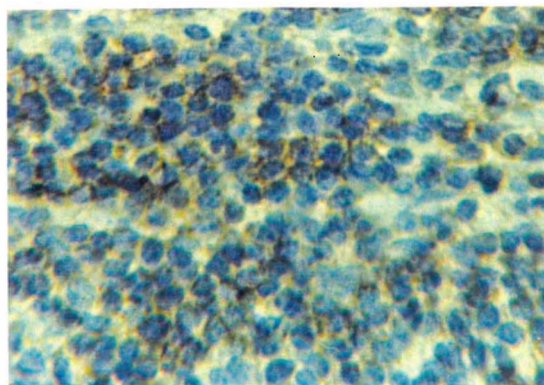


Figura 17: Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-400x) CD43 caso n° 6633/96

5.3 A Expressão do Imunomarcador CD68

- **Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Baixo Grau (LIMBG)**

Sendo os macrófagos células (profissionais) apresentadoras de antígenos aos linfócitos T, existe na lesão de baixo grau uma grande quantidade de antígenos virais; o que proporciona aos macrófagos condições ideais para o processamento e apresentação de antígenos virais aos linfócitos T CD4+. No presente trabalho foi verificado uma média de 91,27 células/secção, que não guardou diferença significativa com as outras lesões; porém quando relacionada com as médias dos outros marcadores na LIMBG, condiz com o esperado e relatado na literatura (HACHISUGA *et al*, 1988).

Na lesão de baixo grau, as quimoquinas promovem o afluxo de macrófagos ao sítio da lesão, os quais promovem o processamento e apresentação de antígenos virais aos linfócitos T. Como foi dito anteriormente, foi encontrado nestas lesões a expressão antigênica máxima do HPV.

Não há relação descrita entre o número de macrófagos em tecidos com lesão neoplásica e o prognóstico da paciente. Mas tem-se que o seu número é maior nestas lesões quando comparado ao mesmo sítio anatômico normal (HACHISUGA *et al*, 1988).

Os macrófagos são ainda imputados como uma linhagem de células não-T produtora da IL-12 que induz o linfócito T a secretar IL-10 e IFN- γ , que são moduladores das respostas imunes humoral e celulares (WINDHAGEN, 1996).

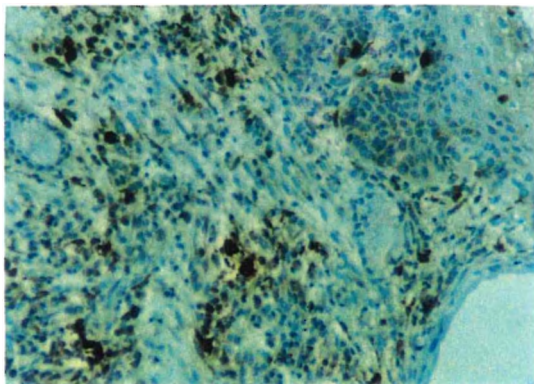


Figura 18: Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD68 (PAP-100x) caso n° 6624/96

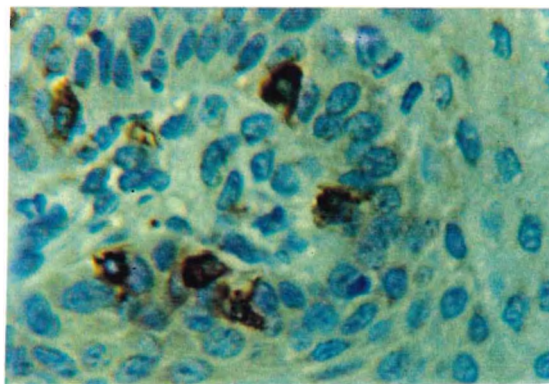


Figura 19: Lesão intra-epitelial malpighiana baixo grau CD68 (PAP-400x) caso n° 6624/96

- **Na Lesão Intra-epitelial Malpighiana de Alto Grau (LIMAG)**

Ao contrário do esperado, os números das células CD68+ foram consideravelmente mais baixos do que os encontrados nas outras lesões, com uma média de 69,83 células por secção. Supõe-se no mínimo a existência de duas hipóteses: 1^a. Que tenha havido um erro de marcação nas secções, apesar dos controles positivos e negativos estarem perfeitos. Tanto a pouca disponibilidade dos sítios de ligação quanto a recuperação antigênica parcial podem contribuir para um resultado desses. Tendo por parâmetro, que o resultado foi coincidente entre os dois examinadores e de acordo com o terceiro, fica afastada a possibilidade de erro na leitura; 2^a. O não recrutamento de macrófagos ao local, pela baixa disponibilidade de quimoquinas. Esta hipótese baseia-se no fato de haver um predomínio de ativação do linfócito Th2 (TARTOUR *et al*, 1994; AL-SALEH *et al*, 1998) nas lesões neoplásicas do colo uterino, que está mais presente na promoção da resposta humoral, contribuindo, ao mesmo tempo, à diminuição da secreção das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, GM-CSF, quimoquinas (MOSMANN, 1996; AHMED & BIRON, 1999).

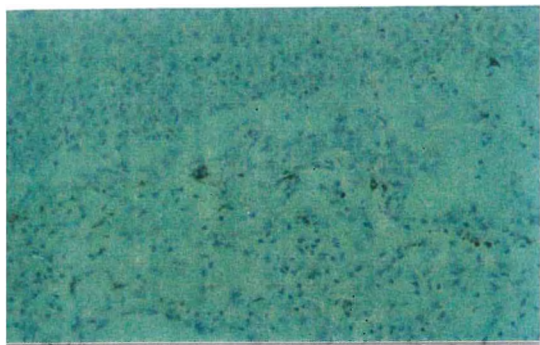


**Figura 20: Lesão intra-epitelial
malpighiana alto grau CD68 (PAP-100x)
caso n° 1314/96**

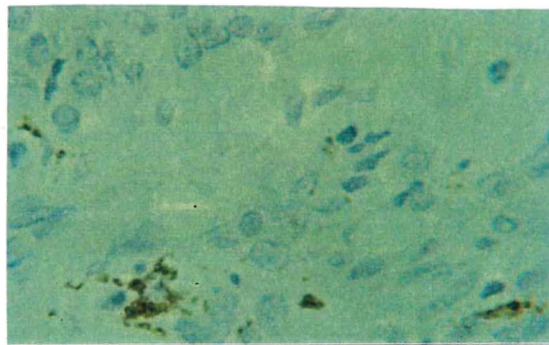


**Figura 21: Lesão intra-epitelial
malpighiana alto grau CD68 (PAP-400x)
caso n° 1314/96**

- **No Carcinoma Invasor**

Há um aumento médio do número de células CD68+ nas lesões malignas, estatisticamente significativo, quando comparado à média do número encontrado nas lesões de alto grau (118,26 e 69,83 células/secção, respectivamente).

Este achado concorda com o de outros estudos que postulam um aumento na densidade populacional de macrófagos no sítio da lesão à medida que a lesão neoplásica progride (HACHISUGA *et al*, 1989).

Os macrófagos podem ter suas atividades diminuídas, como APCs, em função da interferência indireta ou direta do HPV (devido, principalmente, do tipo E5 do sorotipo 16), na expressão de moléculas de classe II do MHC; o que deve resultar na redução da sua capacidade de processamento e apresentação de antígeno aos linfócitos T CD4+ (CASON *et al*, 1993). Em tais circunstâncias, estas células estariam exercendo, apenas, as atividades inerentes da fagocitose, dentre outras.

Apesar da ação do HPV sobre o linfócito T CD4+ e da sua diminuição a secretar algumas citocinas, o mesmo não ocorre quanto a produção do IFN- γ (JACOBS, 1998), o qual é imputado como principal ativador dos

macrófagos, permitindo assim, que se tenham respostas imunes com a participação dos macrófagos, mesmo nas lesões neoplásicas com a participação do HPV de alto risco oncogênico (sorotipos 16 e 18). No estado de ativação, eles tornam-se fagócitos mais potentes, incrementando, desta maneira, a oferta de células na apresentação antigênica, na tentativa de superar as limitações impostas pela diminuição dos níveis de moléculas da classe II do MHC.

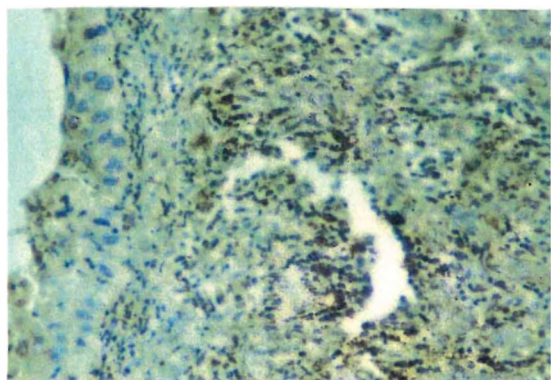


Figura 22: Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-100x) CD68 caso nº 6633/96

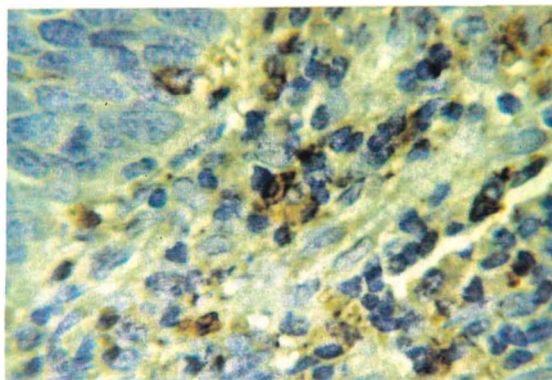


Figura 23: Carcinoma invasor do colo uterino (PAP-400x) CD68 caso nº 6633/96

6 CONCLUSÕES

Avaliações imunohistoquímicas, realizadas com anticorpos monoclonais marcados para detecção de células portadoras de CD20, CD43 e CD68, em 61 amostras de epitélio normal, lesões pré-malignas e malignas, revelaram os seguintes padrões de respostas imunológicas nos tecidos examinados.

1. Nas lesões de baixo grau não houve diferença significativa entre as respostas celular e humoral, tendo em vista que os três imunomarcadores utilizados não apresentaram variação significativa, porém, a intensidade das respostas revelou-se menor do que nos carcinomas.
2. Nas lesões de alto grau, houve nítido predomínio da resposta imunológica celular, representada pela elevada presença de células CD43+ encontradas nas adjacências da lesão e, às vezes, dentro do próprio epitélio. As células CD20 positivas, representando a atividade da imunidade humoral, estavam pouco presentes e apresentavam a menor média de presença, em relação às demais lesões avaliadas.
3. O número de células marcadas pelo CD43, indicador da atividade dos linfócitos T, era progressivamente maior, à medida da gravidade da lesão aumentava, apesar da supressão aos linfócitos T CD4+ atribuída aos HPVs de alto risco oncogênico, implicados na progressão destas lesões; presumivelmente devido ao aumento dos níveis de linfócitos T CD8+.
4. Nos carcinomas, a exemplo das lesões de baixo grau, não foi observada uma diferença significativa entre as duas respostas imunológicas, haja visto que as células CD20 e CD43 positivas estavam equalitariamente distribuídas. Porém, a presença dessa

células foi significativamente maior do que nas lesões de baixo grau.

5. Destacaram-se, nas avaliações das lesões de alto grau, o reduzido número de células CD68 e CD20 positivas, e significativa presença dos linfócitos T(CD43+); nos carcinomas, os três parâmetros avaliados, mostraram-se uniformemente elevados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 2ª. Ed. Rio de Janeiro. Livraria e Editora REVINTER Ltda. 1998.
- AHMED, R., BIRON, C. A. Immunity to viruses. In: PAUL, W. E. (Ed) **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1999. p. 1295-1334.
- AL-SALEH, W., GIANNINI, S. L., JACOBS, N., MOUTSCHEN, M., DOYEN, J., BONIVER, J., DELVENNE, P. Correlation of t-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. **J. Pathol.**, v. 184, p. 283-290, 1998.
- ALVES, V. A. F., BACCHI, C. E., VASSALLO, J. **Manual de imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 270.
- ARANY, I., TYRING, S. K. Status of local cellular immunity in interferon-responsive and nonresponsive human papillomavirus-associated lesions. **Sex. Transm. Dis**, v. 23, n. 6, p. 475-480, 1996.
- BARBERIS, M. C., VAGO, L., CECCHINI, G., BRAMERIO, M., BANFI, G., D'AMICO, M., CANNONE, M. Local impairment of immunoreactivity in HIV-infected women whit HPV-related squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Tumori**, v. 84, n. 4, p. 489-492, 1998.
- BARROSO, R. Cancer of the uterine cervix: epidemiology and virology. **Rev. Prat**, v. 40, n. 1, p. 9-11, 1990.

- BAUER, H. M., GREER, C. E., CHAMBERS, J. C., TASHIRO, C. J., CHIMERA, J., REINGOLD, A., MANOS, M. Genital Human Papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, v. 265, n. 4, p.472-477, 1991.
- BELL, M. C., EDWARDS, R. P., PARTRIDGE, E. E., KUYKENDALL, K., CONNER, W., GORE, H., TURBAT-HERRARA, E., CROWLEY-NOWICK, P. A. CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. **J. Clin. Immunol.**, v. 15, n. 3, p. 130-136, 1995.
- BEZERRA, F. M. Estudo **imunopatológico da periodontite do adulto: avaliações imunohistoquímicas das células mononucleares de gengivas biopsiadas de pacientes**. Fortaleza, 1999. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará.
- BOSCH FX, MANOS MM, MUNOZ N, SHERMAN M, JANSEN A M, PETO J, SCHIFFMAN MH, VICTOR M, KURMAN R, SHAH KV. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC). Study Groups. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 87, n. 11, p. 796-802, 1995.
- BRUNDA, M. J., LUISTRO, L., WARRIER, R. R., WRIGHT, R. B., HUBBARD, B. R., MURPHY, M., WOLF, S. F., GATELY, M. K. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. **J. Exp. Med**, v. 178, p. 1223-1230, 1993.
- CASON, J., KHAN, A. S., BEST, J. M. Towards vaccines against human papillomavirus type-16 genital infection. **Vaccine**, v. 11, p. 603-611, 1993.

CLERICE, M., MEROLA, M., FERRARIO, E., TRABATTONI, D., VILLA, M. L., STEFANON, B., VENZON, D. J., SHEARER, G. M., DE PAULO, G., CLERICI, E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with Human Papillomavirus infection. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 89, n. 3, p. 245-250, 1997.

COMERCI, J. T., RUNOWICZ, C. D., FLANDERS, K. C., VICTORIA, C. D., FIELDS, A. L., KADISH, A. S., GOLDBERG, G. L. Altered expression of transforming growth factor- β 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. **Cancer**, v. 77, n. 6, p. 1107-1114, 1996.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th. ed. New York: W. B. Saunders, 1999. Chapt. 7: Diseases of immunity, p. 188-259.

_____. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th. ed. New York: W. B. Saunders, 1999. Chapt. 24: The female genital tract, p. 1035-1092.

CRUM, C. P., ROCHE, J. K. apud PARR, M. B., PARR, E. L. Female genital tract. Immunity in animal models. In: OGRA, P. L. (Ed.) **Mucosal immunology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1999. p. 1395-1409.

DAVIDSON, B. et al. Inflammatory response in cervical neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol. Res. Pract.*, v. 193, n. 7, p. 491-495, 1997.

DE PALO, G. **Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior**. 1^a. Ed. Rio de Janeiro. Editora Médica e Científica Ltda. p. 133-188. 1993.

DE ROBERTS, E. D. P., DE ROBERTS Jr, E. M. F. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 2^a. Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1993.

DI LUCA, D., ROTOLA, A., PILOTTI, S., MONINI, P., CASILLI, E., RILKE, F., CASSAI, E. Simultaneous presence of herpes simplex and human papilloma vírus sequences in human genital tumors. **Int. J. Cancer**, v. 15, n.40, p. 763-8.

DONNANGELO, M. C. F., PEREIRA, L. **Saúde e sociedade**. São Paulo: Liv. Duas Cidades, 1976. 124p.

EDWARD, R. P., KUYKENDALL, K., CROWLEY-NOWICK, P., PARTRIDGE, E.E., SHINGLETON, H. M., MESTECKY, J. T Lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. **Cancer**, v. 76, n. 8, p. 1411-1415, 1995.

ERON, L. J., JUDSON, F., TUCKER, S., PRAWER, S., MILLS, J., MURPHY, K., HICKEY, M., ROGERS, M., FLANNINGAN, S., HIEN, N., KATZ, H. I., GOLDMAN, S., GOTTLIEB, A., ADAMS, K., BURTON, P., TANNER, D., TYLOR, E., PEETS, E. Interferon therapy for condylomata acuminata. **N. Engl. J. Med**, v. 315, n. 17, p. 1059-1064, 1986.

EVANS EM, M. A. N. S., EVANS, A. S., BORYSIEWICZ, L. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic t-lymphocytes. **Cancer Res.**, v. 57, p. 2943-2950, 1997.

FERREIRA, S. N. H. **Lesões malpighianas invasoras (CEC), intra-epiteliais de alto (LIM-AG) e de baixo grau (LIM-BG) do colo uterino: avaliação da proliferação celular (MIB1), da expressão da proteína P53 segundo a liade**. Fortaleza, 1999. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará,.

FIHOROVA, R. N., ANDERSON, D. J. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. **Biol. Reprod**, v. 60, p. 508-514, 1999.

- FONSECA, L. A. M. A evolução das doenças neoplásicas. In.: MONTEIRO, C. A. **Velhos e novos males da saúde no Brasil**: A evolução do país e de suas doenças. Editora HUCITEC. São Paulo, p. 268-278. 1995.
- FRANCO, E. L. F. Epidemiology of anogenital warts and cancer. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 23, n. 3, p. 597-619, 1996.
- FUCHS, P. G., GIRARDI, F., PFISTER, H. Humaman papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. **Int. J. Cancer**, v. 41, p. 41-45, 1988.
- FUKUDA, K., HACHISUGA, T., NAKAMURA, S., MATSUO, N., IWASAKA, T., SUGIMORI, H. Local immune response in persistent cervical dysplasia. **Obstet. Gynecol.**, v. 82, n. 6, p. 941-945, 1993.
- GARIGLIO, P. Cervico-uterine cancer. Influence of cell viral genes implications in the development of vaccines. **Gac. Med. Mex**, v. 134, n. 3, p. 297-307, 1998.
- GEMIGNANI, M., MAIMAN, M., FRUCHTER, R. G., ARRASTIA, C. D., GIBBON, D., ELLISON, T. CD4 lymphocytes in women with invasive and preinvasive cervical neoplasia. **Gynecol. Oncol**, v. 59, n. 3, p. 364-369, 1995.
- GHOSH, A. K., MOORE, M. Tumour-infiltrating lymphocytes in cervical Carcinoma. **Eur. J. Cancer**, v. 28A, n. 11, p. 1910-1916, 1992.
- GIANNINI, S. L, AL-SALEH, W., PIRON, H., JACOBS, N., DOYEN, J., BONIVER, J., DELVENNE, P. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, n. 2, p. 183-189, 1998.
- GISSMANN, L. Immunologic responses to Human Papillomavirus infection. **Obst. Gynecol. Clin. North Am.** v. 23, n. 3, p. 625-635, 1996.

- GOMPEL, C., KOSS, L. G. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. São Paulo: Manole, 1997. p. 200.
- GRUIJL, T. D., BONTKES, H. J., WALBOOMERS, J. M. M., STUKART, M. J., DOEKHIE, F. S., REMMINK, A. J., HELMERHORST, T. J. M., VERHEIJEN, R. H. M., DUGGAN-KEEN, M. F., STERN, P. L., MEIJER, C. J. L. M., SCHEPER, R. J. Differential T helper cell responses to Human Papillomavirus type 16 E7 Related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: A longitudinal study. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1700-1706, 1998.
- HACHISUGA, T., FUKUDA, K., HAYASHI, Y., IWASAKA, T., SUGIMORI, H. Immunohistochemical demonstration of histiocytes in normal ectocervical epithelium and epithelial lesions of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, v. 33, n. 3, p. 273-278, 1989.
- HAUSEN, H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. **J Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 122, n. 1, p. 3-13, 1996.
- HAUSEN, H., VILLIERS, E. M. Human Papillomaviruses. **Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 427-447, 1998.
- IWASAKA, T. The possibility of viral etiology in cervical carcinogenesis. **Nippou Sanka Fujinka Zasshi**, v. 42, n. 8, p. 802-811, 1990.
- JABLONSKA, S. Human Papillomavirus and oncogenesis. **Hautarzt**, v. 57, n. 8, p. 551-556, 1982.
- JABLONSKA, S., ORTH, G. JARZABEK-CHORZEISKA, M., OBALEK, S., RZESA, G. CROISSANT, O., FAVRE, M. New developments relating to papillomavirus. **Hautarzt**, v. 530, n. 8, p. 411-417, 1982.
- JACOBS, M. V., SANTAMARIA, M., MEIJER, C. J. L. M., WALBOOMERS, J. M. M. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, p. 43-49, 1998.

- JACOBS, M. V., HUSMAN, A. M. R., BRULE, A. J. C., SNIJDERS, P.J. F., MEIJER, C. J. L. M., WALBOOMERS, J. M. M. Group-specific differentiation between high and low risk Human Papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. **J. Clin. Microbiol**, v. 33, n. 4, p. 901-905, 1995.
- JACOBS, N., GIANNINI, S. L., DOYEN, J., BAPTISTA, A., MOUTSCHEN, M., BONIVER, J., DELVENNE, P. Inverse modulation of IL-10 and IL-2 in the blood of women with preneoplastic lesion of the uterine cervix. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 111, n. 1, p. 219-24, 1998.
- KEEBLER, C. M., SOMRAK, T. M. **The Manual of cyotechnology**. 7th ed. Chicago: America Society of Clinical Pathologists, 1993. p. 464.
- KJAER, S. K., VILLIERS, E. M., HAUGAARD, B. J., CHRISTENSEN, R. B., TEISEN, C., MOLLER, K. A., POLL, P., JENSEN, H., VESTERGAAD, B. F., UNGE, E., JENSE, O. M. Human Papillomavirus, herpes simples virus and cervical cancer incidence in greenland and Denmark. A populationbased cross-sectional study. **Int. J. Cancer**, v. 41, n. 4, p. 518-524, 1988.
- KURMAN, R. J., SOLOMON, D. **O sistema Bethesda para o relato de diagnóstico citológico cervicovaginal**. Rio de Janeiro: Revinter, 1997. p. 75.
- LE BUANEC, H., LACHGAR, A., D'ANNA, R., ZAGURY, J. F., BERNARD, J, ITTELE D HALLEZ, S., GIANNOULI, C., BURNY, A., ZAGURY, D. Induction of cellular immunosuppression by the human papillomavirus type 16 E7 oncogenic protein. **Biomed. Pharmacother.**, v. 53, n. 7, p. 323-328, 1999.
- LEY, C., BAUER, H. M., REINGOLD, A., SCHIFFMAN, M. H, CHAMBERS, J. C., TASHIRO, C. J., MANOS, M. M. Determinants of genital Human Papillomavirus infection in young women. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 83, n. 14, p. 997-1003, 1991.

- LLADÓ, L. B. **El carcinoma in situ del cuello uterino**. Barcelona: Espaxs, 1971, p. 255.
- LORINCZ, A. T., TEMPLE, G. F., KURMAN, R. J., JENSON, A. B., LANCASTER, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. **JNCI**, v. 79, n. 4, p. 671-676, 1987.
- MACNAB, J. C. M., WALKINSHAW, A. S., CORDINER, J. W., CLEMENTS, J. B. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 315, n. 17, p. 1052-1058, 1986.
- MAIMAN, M., FRUCHTER, R. G., SEDLIS, A., FELDMAN, J., CHEN, P., BURK, R. D., MINKOFF, H. Prevalence, risk factors, and accuracy of cytologic screening for cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. **Gynecol. Oncol.**, v. 68, n. 3, p.233-239, 1998.
- MAJEWSKI, S., JABLONSKA, S. Immunology of HPV infection and HPV-associated tumors. *Int. J. Dermatol.*, v. 37, n. 2, p. 81-95, 1998.
- MCCANCE, D. J., KOPAN, R., FUCHS, E., LAIMINS, L. A. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 7169-7173, 1988.
- MINISTÉRIO DA SAUDE INCA/Conprev. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999**. Rio de Janeiro, 1999.
- MOSMANN, T. Cytokines and immune regulation. In: RICH, R. R. (Ed.) **Clinical immunology: principles and practice**. St. Louis: Mosby, 1996. v. I, p. 217-230.
- MOSMANN, T. R., MOORE, K. W., The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses, **Immunoparasit. Today**, v. 12, n. 3, p. A49-A53, 1991.

- MOSMANN, T. R., SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, **Immunol. Today**, v. 17, n. 3, 1996.
- MOTA, F., CALDER, V., RUTAU, K., SINGER, A., CHAIN, B. Characterization of soluble factors from cultures of premalignant cervical epithelium. **Eur. J. Gynecol. Oncol.**, v. 20, n. 4, p. 262-267, 1999.
- NAISH, S. J., BOENISCH, T., FARMILLO, A. J. **Handbook immunochemical staining methods**. Carpinteria: Dako, 1989.
- NAKANO, T., OKA, K., TAKAHASHI, T., MORITA, S., ARA, T. Roles of langerhans'cells and T-Lymphocytes infiltrating cancer tissues in patients treated by radiation therapy for cervical cancer. **Cancer**, v. 70, n. 12, p. 2839-2844, 1992.
- NGELANGEL C, MUNOZ N, BOSCH FX, LIMSON GM, FESTIN MR, DEACON J., JACOBS, M. V., SANTAMARIA, M., NEIJER, C. J., WALBOOMERS, J. M. Causes of cervical cancer in the Philippine: a case control study. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 90, n. 1, p. 43-49, 1998.
- NIMAKO, M., FIANDER, A. N., WILKINSON, G. W. G., BORYSIEWICZ, L. K., MAN, S. Human Papillomavirus-specific cytotoxic T Lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4855-4861, 1997.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de normas y procedimientos para el control del cancer de cuello uterino**. Washington, 1990. (Serie Paltex para ejectores de Programas de Salud, n. 6)
- PARKIN, D. M., MUIR, C. S., WHELAN, S. L., ET AL: Cancer incidence in five continents, v. VI. **IARC Scientific Publications**, n. 120 Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1992.

- PFISTER, H. The Role of Human Papillomavirus in anogenital cancer. obstetrics and gynecology. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 23, n. 3, 1996, p. 579-595, 1996.
- REEVES, W. C., BRINTON, L. A., GARCIA, M., BRENES, M. M., HERRERO, B. S. R., GAITÁN, E., TENORIO, F., BRITTON, R. C., RAWLS, W. E. Human Papillomavirus Infection and cervical cancer in Latin America. **N. Engl. J. Med**, v. 320, n. 22, p.1437-1441, 1989.
- REID, R., GREENBERG, M., JENSON, B., HUSAIN, M., WILLETT, J., DAOUD, Y., TEMPLE, G., STANHOPE, C. R., SHERMAN, A. I., PHIBBS, G. D., LORINCZ, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 156, n. p.212-222, 1987.
- ROCHE, J. K., CRUM, C. P. Local immunity and the uterine cervix: implications for cancer-associated viruses. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 33, n. 4, p. 203-209, 1991.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 4^a Ed. Editora Manole. 1997.
- ROUTES, L. M., RYAN, S. Oncogenicity of Human Papillomavirus-or Adenovirus-Transformed Cells Correlates with Resistance to Lysis by Natural Killer Cells. **J. Virol**, v. 69, n. 12, p. 7639-7647, 1995.
- SABISTON Jr., D. C. **Tratado de cirurgia**. 11^a. Ed. Editora Interamericana Ltda. Rio de Janeiro. 1979.
- SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of Human Papillomavirus infection and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 84, n. 6, p. 394-398, 1992.
- SCHOELL, W. M., JANICEK, M. F., MIRHASHEMI, R. Epidemiology and biology of cervical cancer. **Semin. Surg. Oncol**, v. 16, n. 3, p. 203-211, 1999.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ-SESA. Boletim Epidemiológico Anual. **Perfil de adoecer e morrer do povo cearense em 1995**. Fortaleza, 1995.

SHIFFMANN M, BAUER HM, HOOVER RN AT AL. Epidemiologic evidence showing that Human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl. Cancer. Inst**, v. 85, p. 958-964, 1993.

STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. P. 689.

TAKEHARA, K. Local immune responses in uterine cervical carcin. **Nippon Sanka Pujinka Gakkai Zasshi**, v. 48, n. 11, p. 1063-1070, 1996.

TARTOUR, E., GEY, A., SASTRE-GARAU, X., PANNETIER, C., MOSSERI, V., KOURILSKY, P., FRIDMAN, W. H. Analysis of interleukin 6 gene expression in cervical neoplasia using a quantitative polymerase chain reaction assay: Evidence for enhanced interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma. **Cancer Res**, v. 54, n. 23, 1994.

TINDLE, R. W., FRAZER, L. H. Immune responses to the papillomavirus and the prospects for human papillomavirus specific immunization. **Curr. Terap. Microbiol. Immunol.**, v. 186, p. 218-253, 1994.

VILLA, L. L., FRANCO, E. L. F. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of Human Papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 81, n. 5, p. 332-340, 1989.

WATANABE, S., SATO, Y., KODAMA, T., SHIMOSATO, Y. Immunohistochemical study with monoclonal antibodies on immune response in human lung cancers. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5883-5889, 1983.

WINDHAGEN, A., ANDERSON, D. E., CARRIZOSA, A., WILLIAMS, R. E., HAFLER, D. A. IL-12 Induces Human T Cells Secreting IL-10 with IFN- γ ¹. **J. Immunol.**, v. 157, p. 1127-1131, 1996.

WOODWORTH, C. D., SIMPSON, S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirusimmortalized, and carcinoma cell lines. **Am. J. Pathol.**, v. 142, n. 5 1993.

YOSHINO, T., MUKUZONO, H., AOKI, H., TAKAHASHI, K., TAKEUCHI, T., KUBONISHI, I., OHTSUKI, Y., MOTOII, M., AKAGI, T. A novel monoclonal antibody (OPD4) recognizing a helper/inducer T Cell subset. **Am. J. Pathol.**, v. 134, n. 6, p. 1339-1345, 1989.

ZINKERNAGEL, R. M. Immunity to viruses. In: PAUL, W. E. (Ed.) **Fundamental immunology**, 3th. ed. New York: Raven Press, 1993. Chapt. 34, p. 1211-1243.

ANEXOS

ANEXO I

FÓRMULAS DAS SOLUÇÕES

7. TRIS/HCl 0,5m (Tampão)
(TRIS BUFFERED) Solução mãe - pH 7,6

TRIS	H ₂ O	HCl (N)p/pH 7,6	Volume Final TRIS/Cl 0,5m
60,57g	500 ml	+ 376 ml	1000 ml
30,285g	250 ml	+ 112,8 ml	500 ml
18,171g	150 ml	+ 88 ml	300 ml
12,12g	100 ml	+ 75,2 ml	200 ml
6,057g	50 ml	+ 37,6 ml	100 ml

2. TRIS/HCl (TRIS BUFFERED SALINA (UBS) 0,05m (Solução de trabalho)

TRIS/HCl	NaCl	H ₂ O	Volume Final TBS (0,05m)
500 ml	40 g	4500 ml	5000 ml
250 ml	20 g	2250 ml	2500 ml
150 ml	12 g	1350 ml	1500 ml
100 ml	8 g	900 ml	1000 ml
50 ml	4g	450 ml	500 ml

3. NaOH (2M) para aumentar o pH)

P.M. = 40 (peso molecular)

1 mol - 40g - 1000 ml

2 moles - 80g - 1000 ml

NaOH	H ₂ O	Volume Final TBS (0,05m)
80 g	1000 ml	1000 ml
40 g	500 ml	500 ml
20 g	250 ml	250 ml
8 g	100 ml	100 ml

4. NCl (1 N)) para baixar o pH)

P.M. = 36,46

Concentração 37%

Cl	H ₂ O
83 ml	1000 (917) ml
17,2 ml	200 (182, 8) ml

5. Tampão Citrato (1mμ) pH 6,0

Ácido Cítrico	NaOH (ajuste do pH)	H ₂ O Volume Final
2,10 g	+ 25 ml	1000 ml
1,05 g	+ 13 ml	500 ml

6. Diluição da Estreptavidina

1 gota da solução A + 1 gota da solução B + 5 ml do tampão Tris.

7. Diaminobenzidina (DAB)

1 cápsula de diaminobenzidina + 10 ml de TBS + 10mμ de peróxido.

8. Peróxido a 3% em metanol

Metanol	Peróxido	Volume Final
97 ml	3 ml	100 ml
600 ml	18 ml	618 ml

9. Soro Albumina-bovina (BSA) a 5%

BSA	Tampão Tris	Volume Final
5 g	95 ml	100 ml

ANEXO II

TÉCNICA DO PAP(PARAFINA) PEROXIDASE ANTI-PEROXIDASE AVIDINA BIOTINA

PREPARAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

- Xilol a 60° C por 15 min
- Xilol à temperatura ambiente por 15 minutos
- Etanol 100%(3x) por 30 segundos cada
- Etanol 95% por 30 segundos
- Etanol 80% por 30 segundos
- Etanol 70% por 30 segundos
- Lavagem em água corrente e destilada

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

- Colocar as lâminas num recipiente de plástico em Tampão Citrato(pH 6,0)
- Colocar as lâminas no micro-ondas programado na potência máxima. Ligar o micro-ondas e esperar a
- ebulição do tampão citrato. Após o início da ebulição marcar 7min e 30 seg.
- Deixar as lâminas no tampão citrato à temperatura ambiente por 20 min.
- Lavar em TBS por 5 minutos

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA

- Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% em metanol do 10 minutos
- Lavar em TBS por 5 minutos.

REAÇÃO UTILIZANDO O COMPLEXO PEROXIDASE-ANTI-PEROXIDASE

- Incubação em câmara úmida no soro normal de coelho(1:5) por 20 minutos. Após a incubação retirar o excesso do soro sobre as lâminas(aspiração)

- Incubação em câmara úmida no anticorpo primário diluído de acordo com o protocolo(1:50) "over night" a 80C(de 18 a 24h). O anticorpo primário reage com o antígeno que se quer pesquisar presente no tecido
- Lavar em TBS por 5 minutos.
- Incubação em câmara úmida no anticorpo secundário (Coelho anti-mouse biotinilado) diluído 1:200 por 30 minutos. O anticorpo secundário biotinilado liga-se ao anticorpo primário.
- Lavar em TBS por 5 minutos.
- Incubação em câmara úmida no Complexo PAP. O complexo estreptavidina-biotina-peroxidase liga-se à biotina do anticorpo secundário. A peroxidase presente na reação catalisa a precipitação local de biotinil tiramida. A estreptavidina conjugada à peroxidase liga-se à biotina depositada na reação catalisada pela peroxidase (do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase).
- Lavar em TBS por 5 minutos. REVELAÇÃO E MONTAGEM

REVELAÇÃO e MONTAGEM

- Incubar as lâminas em solução substrato (Revelação com Diaminobenzidina- DAB - 60mg%) por 7 minutos. Não esquecer de adicionar 10mμ de H₂O₂ no momento do uso.
- Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.
- Contracorar com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, em seguida lavar em água corrente e destilada.
- Desidratar as lâminas em: etanol 50%
- Etanol 80%
- Etanol 95%
- Etanol 100% (3 vezes)
- Xilol (3 vezes)
- Montagem da laminula com bálsamo Canadá®.

LEITURA EM MICROSCOPIA ÓPTICA COMUM

ANEXO III

DILUIÇÕES

1ª Diluição - Soro normal de Coelho 1:4

- 1 parte do Soro Normal de Coelho
- 4 partes do Soro Albumina-Bovina(BSA)

Cada lâmina

- 100μl => 20μl de Soro normal de coelho
- 80μl de BSA a 5% da solução Tris

2ª Diluição - Anticorpo Primário - 1:49

- 1 parte do Anticorpo primário(cada CD)
- 49 partes de Soro Albumina-bovina(BSA)

Cada lâmina

- 100μl => 02μl de Anticorpo primário
- 98μl de BSA

3ª Diluição - Anticorpo Secundário- 1:199

- 1 parte do Anticorpo secundário (Soro de coelho Anti-mouse biotinilado)
- 199 partes do Soro Albumina-bovina(BSA)

Cada lâmina

- 100μl => 0,5,1 de Anticorpo secundário
- 99,5μl de BSA

ANEXO IV

DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Foram observadas 61 pacientes com lesões no Colo Uterino. Em cada paciente foi realizada a classificação da lesão - Lesão de Baixo Grau, Lesão de Alto Grau e Carcinoma Invasivo (CA). Também em cada paciente realizou-se uma coleta de "material " da Lesão e então em uma lamina foi verificado a presença de Células CD20+ , CD43+ e CD68+ através de anticorpos monoclonais.

As variáveis observadas foram

Numero de Células CD20+ por lâmina.

Numero de Células CD43+ por lâmina.

Numero de Células CD68+ por lâmina.

Dois observadores analisaram cada lâmina de forma totalmente independentes e cujos valores a serem considerados para a análise será:

Y_1 = Média aritmética do Total de Células CD20+ por lâmina dos observadores.

Y_2 = Média aritmética do Total de Células CD43+ por lâmina dos observadores.

Y_3 = Média aritmética do Total de Células CD68+ por lâmina dos observadores.

Também será analisado o % de células CD20+, CD43+ e CD68+ obtida pela relação do total de células marcadas para cada anticorpo em relação ao total geral de células CD20+, CD43+ e CD68+.

$$Y_1' = Y_1 / (Y_1 + Y_2 + Y_3) . 100\%$$

$$Y_2' = Y_2 / (Y_1 + Y_2 + Y_3) . 100\%$$

$$Y_3' = Y_3 / (Y_1 + Y_2 + Y_3) . 100\%$$

O objetivo da pesquisa é verificar em cada um dos marcadores acima (Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_1' , Y_2' , Y_3') se em média este diferenças significativas entre os tipo de lesão.

A metodologia estatística utilizada será:

- Análise descritiva dos valores da variável e valores residuais para verificação de valores discrepantes.
- Teste de Kolmogorov-Smirnov (quando o número de observações é $n > 50$) e teste de Shapiro-Wilk (quando o número de observações é $n \leq 50$) para verificar a condição de normalidade do efeito residual da análise da variância para um fator fixo e teste de Levene's para verificar a igualdade das variâncias residuais.
- Para as variáveis cuja distribuição do efeito residual satisfaz a condição de normalidade e homocedasticia utilizou-se análise de variância para um fator fixo (Tipo de lesão).
- Para as variáveis cuja condição de distribuição dos valores não satisfaz a normalidade utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.
- No caso de encontrarmos diferenças significativas entre os tipo de lesão então será, realizado testes de comparação entre duas a duas as médias do número de células para cada tipo de Lesão cujos testes foram:

Teste de TucKey no caso das variáveis normais.

Teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis no caso de variáveis cuja condição de normalidade não foi satisfeita.

OBS: Para a conclusão de diferenças significativas utilizou-se o nível de significância máximo de 5%.

Os programas computacionais utilizados foram: SPSS 7.5 for Windows, Word 95 e Excel 97.

OBSERVADOR 1

1	CA Inv															
2	3688	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
4	CD20 (3)	12	12	13	17	9	12	13	9	11	8	116	11,6	12	2,590581	6,711111
6	CD43 (3)	16	9	15	22	19	10	21	11	13	12	148	14,8	14	4,613988	21,28889
8	CD68 (3)	10	12	11	15	14	7	8	10	13	7	107	10,7	10,5	2,830391	8,011111
9																
13	1722/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
14	CD20 (3)	5	13	5	4	16	14	17	8	21	17	120	12	13,5	6,055301	36,66667
16	CD43 (3)	10	21	8	9	6	8	12	9	5	13	101	10,1	9	4,532598	20,54444
18	CD68 (3)	11	9	7	9	12	8	8	14	13	11	102	10,2	10	2,347576	5,511111
19																
23	6013/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
24	CD20 (3)	20	14	19	17	18	13	15	13	8	14	151	15,1	14,5	3,541814	12,54444
26	CD43 (3)	32	28	18	14	17	26	23	19	15	9	201	20,1	18,5	7,06242	49,87778
28	CD68 (3)	7	16	15	8	5	9	12	15	12	10	109	10,9	11	3,725289	13,87778
31																
32	3188/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
33	CD20 (3)	17	5	11	9	3	4	7	9	6	7	78	7,8	7	4,049691	16,4
35	CD43 (3)	7	9	3	0	6	9	7	5	5	7	58	5,8	6,5	2,740641	7,511111
37	CD68 (3)	13	16	9	6	8	12	17	12	9	8	110	11	10,5	3,620927	13,11111
38																
41	4555	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
42	CD20 (1)	2	4	0	1	0	3	0	4	0	1	15	1,5	1	1,649916	2,722222
43																
44	CD43 (3)	23	12	8	6	7	10	8	11	10	16	111	11,1	10	5,065131	25,65556
45																
46	CD68 (3)	14	12	17	15	21	10	18	12	13	9	141	14,1	13,5	3,725289	13,87778
47																
49																
50	1452/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
51	CD20(2)	21	26	21	4	12	5	13	9	11	10	132	13,2	11,5	7,238784	52,4
52																
53	CD43 (3)	4	12	11	17	9	8	14	10	11	10	106	10,6	10,5	3,470511	12,04444
54																
55	CD68 (3)	19	16	12	11	17	16	13	11	9	14	138	13,8	13,5	3,155243	9,955556
56																
57																
59	1063/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
60	CD20 (3)	34	17	16	18	11	15	18	12	10	16	167	16,7	16	6,717308	45,12222
61																
62	CD43 (3)	11	9	8	5	9	8	10	7	13	12	92	9,2	9	2,394438	5,733333
63																
64	CD68 (3)	17	12	15	13	19	11	12	14	18	13	144	14,4	13,5	2,75681	7,6

67																
68	3420/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
69	CD20 (1)	4	2	0	1	0	5	7	0	2	2	23	2,3	2	2,359378	5,566667
70																
71	CD43 (1)	7	6	9	6	1	2	4	3	7	8	53	5,3	6	2,668749	7,122222
72																
73	CD68 (3)	15	12	13	8	4	12	8	6	11	7	96	9,6	9,5	3,50238	12,26667
74																
76																
77	6009/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
78	CD20 (3)	18	15	8	5	12	11	7	5	12	8	101	10,1	9,5	4,280446	18,32222
79																
80	CD43 (1)	12	5	3	8	5	7	9	8	4	6	67	6,7	6,5	2,668749	7,122222
81																
82	CD68 (3)	9	4	8	10	4	11	12	4	11	6	79	7,9	8,5	3,17805	10,1
83																
85																
86	4570/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
87	CD20 (1)	1	0	2	0	0	0	1	1	0	0	5	0,5	0	0,707107	0,5
88																
89	CD43 (2)	13	3	3	5	4	6	5	11	4	3	57	5,7	4,5	3,497618	12,23333
90																
91	CD68 (3)	6	7	5	8	5	11	6	7	8	7	70	7	7	1,763834	3,111111
92																
94																
95	3822/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
96	CD20 (3)	15	31	26	39	18	31	13	20	21	16	230	23	20,5	8,459052	71,55556
97																
98	CD43 (1)	4	0	0	0	3	0	0	2	0	5	14	1,4	0	1,95505	3,822222
99																
100	CD68 (3)	16	11	6	5	12	7	17	8	6	5	93	9,3	7,5	4,473378	20,01111
101																
103																
104	6633/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
105	CD20 (3)	21	19	18	9	12	11	22	17	23	20	172	17,2	18,5	4,894441	23,95556
106																
107	CD43 (3)	10	14	11	18	21	17	15	9	13	11	139	13,9	13,5	3,871549	14,98889
108																
109	CD68 (3)	8	9	11	7	9	14	10	9	13	12	102	10,2	9,5	2,250926	5,066667
110																
112																
113	6056	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
114	CD20 (2)	15	10	8	11	12	10	7	6	15	12	106	10,6	10,5	3,062316	9,377778

115																
116	CD43 (3)	14	11	7	5	12	8	15	19	16	9	116	11,6	11,5	4,427189	19,6
117																
118	CD68 (3)	24	13	15	11	16	17	19	14	9	18	156	15,6	15,5	4,273952	18,26667
119																
120	Ca de colo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	TOTAL	MÉDIA	MEDIANA	DES PAD	
121	4460/96															
122	CD-20	15	27	22	20	8	16	9	18	7	14	156	15,6	15,5	6,449806	41,6
123																
124	CD-43	25	20	23	26	14	13	11	12	15	18	177	17,7	16,5	5,538752	30,67778
125																
126	CD-68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127																
128	1724/96															
129	CD-20	8	4	4	1	0	6	6	4	3	2	38	3,8	4	2,440401	5,955556
130																
131	CD-43	19	15	18	16	12	17	17	15	16	19	164	16,4	16,5	2,1187	4,488889
132																
133	CD-68	11	7	9	8	11	14	8	12	10	8	98	9,8	9,5	2,20101	4,844444
134																
135	1690/97															
136	CD-20	13	20	8	15	10	14	7	16	10	14	127	12,7	13,5	3,973523	15,78889
137	CD-43	17	25	16	12	18	12	16	14	14	18	162	16,2	16	3,794733	14,4
138	CD-68	4	6	5	5	7	4	5	6	9	8	59	5,9	5,5	1,66333	2,766667
139																
140	3937/															
141	CD-20	4	3	4	6	3	2	0	1	3	2	28	2,8	3	1,686548	2,844444
142	CD-43	6	7	9	13	8	7	6	7	11	13	87	8,7	7,5	2,710064	7,344444
143	CD-68	11	12	10	8	11	13	5	9	17	15	111	11,1	11	3,446415	11,87778
144																
145	3230/															
146	CD-20	16	18	11	17	12	22	18	20	26	12	172	17,2	17,5	4,756282	22,62222
147	CD-43	17	25	19	26	23	16	27	24	19	21	217	21,7	22	3,860052	3,860052
148	CD-68	13	8	14	16	12	13	10	9	8	11	114	11,4	11,5	2,674987	2,674987
149																
150	1067/96															
151	CD-20	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	5	0,5	0,5	0,527046	0,527046
152	CD-43	0	1	0	1	1	3	1	2	4	5	18	1,8	1	1,686548	1,686548
153	CD-68	8	10	6	8	9	5	8	8	7	6	75	7,5	8	1,509231	1,509231
154																
155	2694/96															
156	CD-20	3	4	2	4	5	4	4	5	3	13	47	4,7	4	3,056868	3,056868
157	CD-43	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	4	0,4	0	0,699206	0,699206
158	CD-68	4	3	4	5	5	4	3	4	3	4	39	3,9	4	0,737865	0,737865

160	1960/96															
161	CD-20	13	16	10	4	6	5	5	5	6	5	75	7,5	5,5	4,089281	4,089281
162	CD-43	10	6	4	5	8	7	14	5	5	9	73	7,3	6,5	3,056868	3,056868
163	CD-68	5	4	5	2	6	3	4	5	4	3	41	4,1	4	1,197219	1,197219
164																
165	3403/96															
166	CD-20	5	7	4	6	4	5	5	6	2	3	47	4,7	5	1,494434	1,494434
167	CD-43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	CD-68	9	6	3	4	3	2	3	4	2	3	39	3,9	3	2,13177	2,13177
169																
170	323/															
171	CD-20	17	7	9	4	9	10	5	6	7	6	80	8	7	3,681787	3,681787
172	CD-43	31	37	35	33	21	32	38	26	22	27	302	30,2	31,5	5,977736	5,977736
173	CD-68	16	11	15	17	25	17	15	16	10	14	156	15,6	15,5	4,060651	4,060651
174																
175	3075/97															
176	CD-20	84	67	79	75	47	62	83	72	69	56	694	69,4	70,5	11,88089	11,88089
177	CD-43	16	8	5	14	8	4	7	13	9	10	94	9,4	8,5	3,893014	3,893014
178	CD-68	12	9	10	11	13	9	10	11	18	15	118	11,8	11	2,859681	2,859681
179																
180	2309/96															
181	CD-20	61	36	23	54	43	19	37	35	46	32	386	38,6	36,5	12,93746	12,93746
182	CD-43	7	6	4	5	2	4	12	3	7	5	55	5,5	5	2,798809	2,798809
183	CD-68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
184																
185	3189/96															
186	CD-20	22	29	9	11	35	13	18	8	19	22	186	18,6	18,5	8,783824	8,783824
187	CD-43	20	14	19	21	13	11	9	24	12	10	153	15,3	13,5	5,250397	5,250397
188	CD-68	11	16	20	16	8	9	15	10	17	12	134	13,4	13,5	3,949684	3,949684
189																
190	1654/97															
191	CD-20	13	7	4	5	9	14	16	12	7	18	105	10,5	10,5	4,790036	4,790036
192	CD-43	10	6	12	15	17	14	19	24	10	14	141	14,1	14	5,108816	5,108816
193	CD-68	11	12	7	6	8	9	15	11	10	12	101	10,1	10,5	2,685351	2,685351
194																
195	3039/97															
196	CD-20	8	4	7	9	8	27	9	14	10	4	100	10	8,5	6,63325	6,63325
197	CD-43	10	9	5	3	14	12	19	4	3	5	84	8,4	7	5,378971	5,378971
198	CD-68	6	7	10	8	15	6	16	13	8	12	101	10,1	9	3,695342	3,695342
199																
200	CD-20	156	38	127	28	172	5	47	75	47	80	694	386	186	105	100
201	CD-43	177	164	162	87	217	18	4	73	0	302	94	55	153	141	84
202	CD-68	0	98	59	111	114	75	39	41	39	156	118	0	134	101	101

203																
204	CD-20(%)	46,8	12,6	36,4	12,3	34,1	5,1	52,2	39,6	54,6	14,8	58,6	87,5	39,3	30,2	35
205	CD-43(%)	53,2	54,8	46,5	38,4	43,1	18,3	4,4	38,6	0	56,1	10,3	12,5	34,6	40,6	29,4
206	CD-68(%)	0	32,6	17,1	49,3	22,8	76,6	43,4	21,8	45,4	29,1	31,1	0	26,1	29,2	35,6
207																
208																
209																
210		3668	1722	6013	3188	4555	1452	1063	3420	6009	4570	3822	6633	6056	4460	1724
211	CD-20	32	38	33	33	7	35	41	13	41	4	68	42	28	47	12
212	CD-43	40	31	47	24	42	28	23	31	27	43	4	34	31	53	55
213	CD-68	28	31	20	43	51	37	36	56	32	53	28	24	41	0	33
214																
215	LIEMBG															
216	0403/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
217	CD20(3)	5	4	5	8	4	4	5	3	2	2	42	4,2	4	1,75119	3,066667
218	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
219	CD68(3)	7	8	7	4	8	7	4	3	4	3	55	5,5	5,5	2,068279	4,277778
220																
221	4520	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
222	CD20(2)	4	3	3	2	2	4	0	3	2	0	23	2,3	2,5	1,418136	2,011111
223	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	CD68(3)	7	8	6	5	4	5	6	9	7	5	62	6,2	6	1,549193	2,4
225																
226	1088/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
227	CD20(3)	7	5	6	8	8	6	3	5	4	7	59	5,9	6	1,66333	2,766667
228	CD43(N)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	0,7	0	1,494434	2,233333
229	CD68(3)	12	7	8	5	9	10	7	6	8	7	79	7,9	7,5	2,024846	4,1
230																
231	6624/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
232	CD20(3)	8	8	15	7	6	5	6	8	7	9	79	7,9	7,5	2,766867	7,655556
233	CD43(3)	16	10	8	7	16	18	22	10	9	10	126	12,6	10	5,015531	25,15556
234	CD68(3)	9	16	12	14	10	11	13	9	19	12	125	12,5	12	3,17105	10,05556
235																
236	2140/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
237	CD20(2)	5	4	5	6	3	4	3	5	4	3	42	4,2	4	1,032796	1,066667
238	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239	CD68(3)	4	3	5	4	4	3	5	4	6	5	43	4,3	4	0,948683	0,9
240																
241	4787/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
242	CD20(3)	19	6	23	10	6	8	4	3	3	5	87	8,7	6	6,896859	47,56667
243	CD43(2)	5	6	2	4	2	1	4	3	0	1	28	2,8	2,5	1,932184	3,733333
244	CD68(3)	11	9	8	5	7	8	9	5	7	6	75	7,5	7,5	1,900292	3,611111
245																
246	3921/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var

247	CD20(2)	9	9	9	9	8	10	11	10	9	9	11	11	10	10	10
248	CD43(N)	0	0	0	2	4	1	1	0	0	0	8	0,8	0	1,316561	1,733333
249	CD68(3)	6	14	11	7	4	5	6	5	4	6	68	6,8	6	3,224903	10,4
250																
251	1652/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
252	CD20(3)	1	4	5	4	0	0	9	8	6	8	45	4,5	4,5	3,341656	11,16667
253	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
254	CD68(3)	4	6	4	5	11	10	7	8	4	5	64	6,4	5,5	2,547733	6,488889
255																
256	2640/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
257	CD20(3)	4	6	5	5	8	17	12	15	13	8	93	9,3	8	4,620005	21,34444
258	CD43(N)	1	2	1	3	0	2	1	0	0	1	11	1,1	1	0,994429	0,988889
259	CD68(3)	6	5	5	4	6	7	8	5	4	7	57	5,7	5,5	1,337494	1,788889
260																
261	2583/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
262	CD20(3)	14	10	12	10	16	11	6	3	8	5	95	9,5	10	4,062019	16,5
263	CD43(2)	2	4	6	2	15	22	20	12	7	0	90	9	6,5	7,83156	61,33333
264	CD68(3)	8	7	5	7	6	8	7	11	6	8	73	7,3	7	1,636392	2,677778
265																
266	2443/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
267	CD20(2)	4	5	7	0	0	6	3	0	4	1	30	3	3,5	2,624669	6,888889
268	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
269	CD68(3)	6	7	6	5	7	4	10	6	4	7	62	6,2	6	1,75119	3,066667
270																
271																
272	6458	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total				
273	CD20(3)	2	4	1	3	3	2	3	4	2	2	26				
274	CD43(N)	5	4	14	10	8	13	3	4	9	13	83				
275	CD68(3)	4	11	2	3	5	4	4	3	4	3	43				
276																
277	0997/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total				
278	CD20(3)	4	3	6	5	7	6	6	3	4	7	51				
279	CD43(N)	4	0	1	5	3	1	1	3	1	2	21				
280	CD68(3)	12	19	7	22	9	8	7	7	6	5	102				
281																
282	8710/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8		44	4	Total			
283	CD20(3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
284	CD43(2)	5	2	9	14	11	6	11	10	12	9	89				
285	CD68(3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
286																
287	5769/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total				
288	CD20(2)	1	0	0	1	2	1	0	0	3	0	8				
289	CD43(N)	9	2	11	13	9	9	10	3	5	3	74				
290	CD68(3)	4	4	0	0	1	0	0	3	6	2	20				

339	CD43(N)	15	75	33	17	13	7	13	70	27	20	271	3,4	3	1,074968	1,155556
336	CD68(3)	5	2	3	5	3	2	4	4	3	3	34	3,4	3	1,074968	1,155556
337																
338	2694 C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
339	CD20(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
340	CD43(N)	1	0	1	2	0	0	3	2	3	1	13	0	0	0	0
341	CD68(3)	5	4	4	5	3	3	6	2	5	4	41	4,1	4	1,197219	1,433333
342																
343	6633 C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
344	CD20(2)	4	3	0	0	2	0	0	1	0	0	10	1	0	1,490712	2,222222
345	CD43(3)	47	39	24	22	12	10	12	11	5	6	188	0	0	0	0
346	CD68(3)	13	8	8	7	10	9	15	7	11	8	96	9,6	8,5	2,674987	7,155556
347																
348	1063 C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
349	CD20(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	CD43(N)	38	44	56	54	66	48	73	64	49	63	555	0	0	0	0
351	CD68(3) REJUDICAL	7	6	5	7	4	10	6	4	7	56	6,222222	6	1,855921	3,444444	
352																
353	1956 C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
354	CD20(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
355	CD43(3)	6	10	8	12	22	14	8	5	20	11	116	0	0	0	0
356	CD68(3)	7	8	4	6	4	5	4	6	5	3	52	5,2	5	1,549193	2,4
357																
358	total	1314/96	2311	323	297	1447	1452/96	3822/96	3420/96	6633/96	1063/96	2694/96	1956			
359	CD 20	40	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0			
360	CD43	8	0	69	186	69	145	PREJUD	70	108	445	13	214			
361	CD68	42	32	94	42	115	109	86	86	62	0	41	178			
362																
363	CD20	44%	0	0	0	0	0	0	0	2%	0	0	0			
364	CD43	10%	0	42%	81%	37%	57%	0	45%	62%	100%	24%	54%			
365	CD68	46%	100%	58%	19%	63%	43%	100%	55%	44%	0	76%	46%			
366	Ca de colo	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	TOTAL	MÉDIA	MEDIANA	DES PAD	VARIÂNC
367	4460/96															
368	CD-20	15	27	22	20	8	16	9	18	7	14	156	15,6	15,5	6,449806	41,6
369	CD-43	25	20	23	26	14	13	11	12	15	18	177	17,7	16,5	5,538752	30,67778
370	CD-68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371																
372	1724/96															
373	CD-20	8	4	4	1	0	6	6	4	3	2	38	3,8	4	2,440401	5,955556
374	CD-43	19	15	18	16	12	17	17	15	16	19	164	16,4	16,5	2,1187	4,488889
375	CD-68	11	7	9	8	11	14	8	12	10	8	98	9,8	9,5	2,20101	4,844444
376																
377	1690/97															
378	CD-20	13	20	8	15	10	14	7	16	10	14	127	12,7	13,5	3,973523	15,78889

291																	
292		403	4520	1088	6624	2140	4787	3921	1652	2840	2583	2443	6458	997	8710	5769	
293	CD-20	44	27	41	24	49	46	50	42	58	38	37	17	29	0	8	
294	CD-43	0	0	5	38	0	15	5	0	7	35	0	55	12	100	73	
295	CD-68	56	73	54	83	51	39	45	58	35	27	63	28	59	0	19	
296																	
297	LIEAG																
298	1314/96	C-1	C-1	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
299	CD20(2)		10	22	9	10	7	21	12	9	10	15	125	12,5	10	5,190804	26,94444
300	CD43(3)		35	20	7	9	14	14	6	27	15	16	163	0	0	0	0
301	CD68(3)		2	2	3	3	5	3	3	4	2	2	29	2,9	3	0,994429	0,988889
302																	
303	2311/	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
304	CD20(2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	CD43(N)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
306	CD68(3)		4	3	5	4	2	3	1	2	3	5	32	3,2	3	1,316561	1,733333
307																	
308	323	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
309	CD20(2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
310	CD43(N)		32	24	20	14	13	6	7	23	8	20	167	0	0	0	0
311	CD68(3)		5	4	7	11	10	10	13	9	10	15	94		10	3,373096	11,37778
312																	
313	1447	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
314	CD20(2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
315	CD43(3)		11	9	13	7	5	4	3	1	4	3	60	0	0	0	0
316	CD68(3)		9	21	8	7	9	8	20	6	16	11	115	11,5	9	5,482295	30,05556
317																	
318	1452	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
319	CD20(2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
320	CD43		22	14	9	12	18	10	16	18	17	9	145	0	0	0	0
321	CD68(3)		12	20	12	8	8	11	7	8	9	14	109	10,9	10	3,928528	15,43333
322																	
323	3822	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
324	CD20(2)	PREJUDIC		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
325	CD43(N)	PREJUDIC		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	CD68(3)		14	8	16	5	14	9	7	11	9	13	106	10,6	10	3,565265	12,71111
327																	
328	3420	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
329	CD20(2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	CD43(N)		13	21	10	3	7	15	5	4	10	9	97	0	0	0	0
331	CD68(3)		10	7	9	9	3	8	6	9	8	5	74	7,4	8	2,170509	4,711111
332																	
333	297	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10		Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
334	CD20(2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

379	CD-43	17	23	16	12	10	12	10	17	17	10	102	10,2	10,5	1,66333	2,766667
380	CD-68	4	6	5	5	7	4	5	6	9	8	59	5,9	5,5	1,66333	2,766667
381																
382	3937/															
383	CD-20	4	3	4	6	3	2	0	1	3	2	28	2,8	3	1,686548	2,844444
384	CD-43	6	7	9	13	8	7	6	7	11	13	87	8,7	7,5	2,710064	7,344444
385	CD-68	11	12	10	8	11	13	5	9	17	15	111	11,1	11	3,446415	11,87778
386																
387	3230/															
388	CD-20	16	18	11	17	12	22	18	20	26	12	172	17,2	17,5	4,756282	22,62222
389	CD-43	17	25	19	26	23	16	27	24	19	21	217	21,7	22	3,860052	3,860052
390	CD-68	13	8	14	16	12	13	10	9	8	11	114	11,4	11,5	2,674987	2,674987
391																
392	1067/96															
393	CD-20	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	5	0,5	0,5	0,527046	0,527046
394	CD-43	0	1	0	1	1	3	1	2	4	5	18	1,8	1	1,686548	1,686548
395	CD-68	8	10	6	8	9	5	8	8	7	6	75	7,5	8	1,509231	1,509231
396																
397	2694/96															
398	CD-20	3	4	2	4	5	4	4	5	3	13	47	4,7	4	3,056868	3,056868
399	CD-43	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	4	0,4	0	0,699206	0,699206
400	CD-68	4	3	4	5	5	4	3	4	3	4	39	3,9	4	0,737865	0,737865
401																
402	1960/96															
403	CD-20	13	16	10	4	6	5	5	5	6	5	75	7,5	5,5	4,089281	4,089281
404	CD-43	10	6	4	5	8	7	14	5	5	9	73	7,3	6,5	3,056868	3,056868
405	CD-68	5	4	5	2	6	3	4	5	4	3	41	4,1	4	1,197219	1,197219
406																
407	3403/96															
408	CD-20	5	7	4	6	4	5	5	6	2	3	47	4,7	5	1,494434	1,494434
409	CD-43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	CD-68	9	6	3	4	3	2	3	4	2	3	39	3,9	3	2,13177	2,13177
411																
412	323/															
413	CD-20	17	7	9	4	9	10	5	6	7	6	80	8	7	3,681787	3,681787
414	CD-43	31	37	35	33	21	32	38	26	22	27	302	30,2	31,5	5,977736	5,977736
415	CD-68	16	11	15	17	25	17	15	16	10	14	156	15,6	15,5	4,060651	4,060651
416																
417	3075/97															
418	CD-20	84	67	79	75	47	62	83	72	69	56	694	69,4	70,5	11,88089	11,88089
419	CD-43	16	8	5	14	8	4	7	13	9	10	94	9,4	8,5	3,893014	3,893014
420	CD-68	12	9	10	11	13	9	10	11	18	15	118	11,8	11	2,859681	2,859681
421																
422	2309/96															

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
423	CD-20	61	36	23	54	43	19	37	35	46	32	386	38,6	36,5	12,93746	12,93746
424	CD-43	7	6	4	5	2	4	12	3	7	5	55	5,5	5	2,798809	2,798809
425	CD-68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
426																
427	3189/96															
428	CD-20	22	29	9	11	35	13	18	8	19	22	186	18,6	18,5	8,783824	8,783824
429	CD-43	20	14	19	21	13	11	9	24	12	10	153	15,3	13,5	5,250397	5,250397
430	CD-68	11	16	20	16	8	9	15	10	17	12	134	13,4	13,5	3,949684	3,949684
431																
432	1654/97															
433	CD-20	13	7	4	5	9	14	16	12	7	18	105	10,5	10,5	4,790036	4,790036
434	CD-43	10	6	12	15	17	14	19	24	10	14	141	14,1	14	5,108816	5,108816
435	CD-68	11	12	7	6	8	9	15	11	10	12	101	10,1	10,5	2,685351	2,685351
436																
437	3039/97															
438	CD-20	8	4	7	9	8	27	9	14	10	4	100	10	8,5	6,63325	6,63325
439	CD-43	10	9	5	3	14	12	19	4	3	5	84	8,4	7	5,378971	5,378971
440	CD-68	6	7	10	8	15	6	16	13	8	12	101	10,1	9	3,695342	3,695342
441																
442	CD-20	156	38	127	28	172	5	47	75	47	80	694	386	186	105	100
443	CD-43	177	164	162	87	217	18	4	73	0	302	94	55	153	141	84
444	CD-68	0	98	59	111	114	75	39	41	39	156	118	0	134	101	101
445																
446	CD-20(%)	46,8	12,6	36,4	12,3	34,1	5,1	52,2	39,6	54,6	14,8	58,6	87,5	39,3	30,2	35
447	CD-43(%)	53,2	54,8	46,5	38,4	43,1	18,3	4,4	38,6	0	56,1	10,3	12,5	34,6	40,6	29,4
448	CD-68(%)	0	32,6	17,1	49,3	22,8	76,6	43,4	21,8	45,4	29,1	31,1	0	26,1	29,2	35,6
449																
450																
451	CD20c	32	38	33	33	7	35	41	13	41	4	68	42	28	47	12
452	CD20b	44	27	41	24	49	46	50	42	58	38	37	17	29	0	8
453	CD20a	40	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0			
454																
455																
456	CD43b	0	0	5	38	0	15	5	0	7	35	0	55	12	100	73

OBSERVADOR 2

[illegible]

47																
48	2583/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
49	CD20(3)	67	17	9	8	7	5	33	4	0	0	150	15	7,5	20,68816	428
50	CD43(2)	37	19	0	0	0	0	30	8	22	8	124	12,4	8	13,76146	189,3778
51	CD68(3)	11	27	51	22	14	35	10	8	12	14	204	20,4	14	13,73722	188,7111
52																
53	2443/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
54	CD20(2)	2	0	1	4	8	6	4	0	40	15	80	8	4	12,11977	146,8889
55	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	CD68(3)	14	15	8	10	9	7	0	0	13	7	83	8,3	8,5	5,2079	27,12222
57																
58	6458/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
59	CD20(2)	7	3	8	6	4	5	13	2	3	2	53	5,3	4,5	3,40098	11,56667
60	CD43(3)	9	10	17	6	14	8	2	2	2	0	70	7	7	5,656854	32
61	CD68(3)	3	7	4	3	10	4	5	2	2	4	44	4,4	4	2,458545	6,044444
62																
63	0997/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
64	CD20(3)	9	7	5	4	6	13	3	3	7	0	57	5,7	5,5	3,622461	13,12222
65	CD43(3)	4	2	9	4	2	4	5	8	3	2	43	4,3	4	2,451757	6,011111
66	CD68(3)	2	4	15	1	5	2	3	1	3	1	37	3,7	2,5	4,191261	17,56667
68																
69	8710/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
70	CD20(2)	6	4	0	4	4	2	0	0	0	0	20	2	1	2,309401	5,333333
71	CD43(3)	13	9	8	11	7	4	6	14	5	4	81	8,1	7,5	3,60401	12,98889
72	CD68(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74																
75	5769/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
76	CD20(2)	1	3	0	2	4	2	0	0	8	0	20	2	1,5	2,538591	6,444444
77	CD43(3)	15	12	7	6	11	10	9	8	7	3	88	8,8	8,5	3,392803	11,51111
78	CD68(1)	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0,4	0	0,699206	0,488889
79																
80																
81	CA Inv															
82	3668	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
84	CD20 (3)	90	29	60	20	21	11	19	20	10	5	285	28,5	20	26,38708	696,2778
86	CD43 (3)	18	22	16	26	27	24	45	13	9	11	211	21,1	20	10,48226	109,8778
88	CD68 (3)	44	32	37	33	29	22	34	12	13	9	265	26,5	30,5	11,88136	141,1667
89																
90	1722/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
91	CD20 (3)	0	2	56	5	2	0	3	37	23	0	128	12,8	2,5	19,54368	381,9556
93	CD43 (3)	14	3	0	8	6	2	13	7	4	5	62	6,2	5,5	4,516636	20,4
95	CD68 (3)	32	22	26	18	27	6	12	10	8	8	169	16,9	15	9,362455	87,65556

97	6013/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
98	CD20 (3)	28	39	15	4	30	21	12	31	4	28	212	21,2	24,5	12,00741	144,1778
100	CD43 (3)	5	23	20	6	26	5	34	13	22	18	172	17,2	19	9,807027	96,17778
102	CD68 (3)	16	13	15	9	14	12	7	11	14	15	126	12,6	13,5	2,875181	8,266667
103																
104	3188/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
105	CD20 (3)	42	26	10	7	0	16	39	11	0	17	168	16,8	13,5	14,73318	217,0667
107	CD43 (3)	15	2	1	3	5	6	1	2	0	0	35	3,5	2	4,503085	20,27778
109	CD68 (3)	24	20	21	20	15	9	8	11	6	2	136	13,6	13	7,441625	55,37778
110																
111	4555	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
112	CD20 (1)	4	0	0	1	3	0	6	0	1	5	20	2	1	2,309401	5,333333
114	CD43 (3)	1	3	10	0	13	7	5	3	11	4	57	5,7	4,5	4,398232	19,34444
116	CD68 (3)	10	22	21	35	18	11	19	9	8	6	159	15,9	14,5	8,875059	78,76667
117																
118	1452/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
119	CD20 (1)	0	0	0	0	16	7	0	0	0	6	29	2,9	0	5,3427	28,54444
121	CD43 (3)	18	27	2	10	2	3	2	0	4	9	77	7,7	3,5	8,680118	75,34444
123	CD68 (3)	25	23	25	29	16	13	20	22	7	20	200	20	21	6,480741	42
124																
125	1063/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
126	CD20 (3)	72	15	6	0	5	16	110	144	65	61	494	49,4	38,5	49,5585	2456,044
128	CD43 (3)	0	0	3	16	0	0	12	5	0	6	42	4,2	1,5	5,711587	32,62222
130	CD68 (3)	21	14	13	16	2	6	3	10	9	30	124	12,4	11,5	8,527081	72,71111
131																
132	3420/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
133	CD20 (1)	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0,3	0	0,674949	0,455556
135	CD43 (1)	0	0	0	0	0	5	2	0	2	0	9	0,9	0	1,66333	2,766667
137	CD68 (3)	18	16	18	13	10	30	14	19	22	18	178	17,8	18	5,473167	29,95556
138																
139	6009/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
140	CD20 (3)	62	2	24	14	9	11	4	7	106	3	242	24,2	10	33,78954	1141,733
142	CD43 (1)	0	0	0	0	2	0	0	1	0	3	6	0,6	0	1,074968	1,155556
144	CD68 (3)	41	36	45	16	35	53	51	22	6	32	337	33,7	35,5	15,2027	231,1222
145																
146	4570/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
147	CD20 (1)	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	5	0,5	0	1,269296	1,611111
149	CD43 (2)	11	0	5	0	2	0	7	0	70	3	98	9,8	2,5	21,46729	460,8444
151	CD68 (3)	7	11	4	9	12	4	20	17	15	12	111	11,1	11,5	5,300943	28,1
152																
153	3822/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
154	CD20 (3)	25	24	1	7	0	17	6	7	0	1	88	8,8	6,5	9,727395	94,62222
156	CD43 (1)	0	0	0	0	6	10	2	0	0	0	18	1,8	0	3,457681	11,95556

159																
160	6633/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
161	CD20 (3)	35	26	3	55	5	0	0	0	24	3	151	15,1	4	19,04643	362,7667
163	CD43 (3)	0	0	2	11	8	0	1	33	20	22	97	9,7	5	11,65285	135,7889
165	CD68 (3)	18	10	6	8	7	11	12	8	6	12	98	9,8	9	3,675746	13,51111
166																
167	6056	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
168	CD20 (2)	9	2	0	3	0	0	16	2	8	13	53	5,3	2,5	5,831905	34,01111
170	CD43 (3)	22	71	26	2	5	7	19	21	37	20	230	23	20,5	19,88858	395,5556
172	CD68 (3)	19	26	13	28	24	18	11	17	16	14	186	18,6	17,5	5,699903	32,48889
173																
174	CA (2o)															
175	4460/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
176	CD20(3)	11	16	2	2	4	0	6	0	3	5	49	4,9	3,5	5,065131	25,65556
177	CD43(3)	17	10	70	48	19	5	34	5	20	9	237	23,7	18	21,14526	447,1222
178	CD68(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179																
180	1067/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
181	CD20(3)	4	3	0	3	0	3	4	3	2	2	24	2,4	3	1,429841	2,044444
182	CD43(3)	4	2	0	1	1	3	0	7	0	1	19	1,9	1	2,233582	4,988889
183	CD68(3)	12	13	20	12	10	5	8	11	27	17	135	13,5	12	6,346478	40,27778
184																
185	2694/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
186	CD20(3)	8	4	0	3	14	6	5	3	61	11	115	11,5	5,5	17,87145	319,3889
187	CD43(1)	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	16	1,6	0	3,864367	14,93333
188	CD68(3)	11	17	15	12	14	3	6	16	18	21	133	13,3	14,5	5,498485	30,23333
189																
190	1960/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
191	CD20(3)	2	3	2	5	0	0	2	7	0	1	22	2,2	2	2,299758	5,288889
192	CD43(3)	0	2	2	13	22	5	6	9	1	15	75	7,5	5,5	7,199537	51,83333
193	CD68(3)	30	5	8	9	8	12	7	10	12	5	106	10,6	8,5	7,244922	52,48889
194																
195	1724/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
196	CD20(3)	11	6	10	9	12	1	11	12	7	14	93	9,3	10,5	3,772709	14,23333
197	CD43(3)	29	35	32	43	31	33	39	23	22	15	302	30,2	31,5	8,350649	69,73333
198	CD68(3)	21	13	23	10	14	26	11	18	4	10	150	15	13,5	6,847546	46,88889
199																
200	1690/97	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
201	CD20(3)	8	16	2	4	7	10	4	14	5	2	72	7,2	6	4,848826	23,51111
202	CD43(3)	28	76	27	29	36	35	23	42	17	30	343	34,3	29,5	16,22104	263,1222
203	CD68(3)	40	15	12	28	6	16	11	2	7	6	143	14,3	11,5	11,5955	134,4556
204																
205	3937	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
206	CD20(3)	0	14	4	1	0	2	0	9	5	7	42	4,2	3	4,661902	21,73333
207	CD43(3)	1	2	15	0	4	2	16	17	2	2	61	6,1	2	6,919377	47,87778
208	CD68(3)	4	16	12	8	15	3	7	12	26	3	106	10,6	10	7,214184	52,04444
209																
210	3230	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
211	CD20(3)	1	12	18	20	31	30	62	36	49	4	263	26,3	25	19,35085	374,4556
212	CD43(3)	21	51	37	41	283	93	69	56	12	4	667	66,7	46	80,55233	6488,678
213	CD68(3)	18	8	20	19	22	13	24	27	21	26	198	19,8	20,5	5,80804	33,73333
214																
215	323	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
216	CD20(3)	2	4	6	5	6	8	5	0	4	14	54	5,4	5	3,747592	14,04444
217	CD43(3)	12	4	6	5	19	9	13	10	32	30	140	14	11	9,977753	99,55556
218	CD68(3)	15	19	10	9	5	0	0	0	16	13	87	8,7	9,5	7,149981	51,12222
219																
220	3075/97	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
221	CD20(3)	29	60	40	76	44	112	63	15	28	24	491	49,1	42	29,33125	860,3222
222	CD43(1)	0	0	0	3	0	0	0	2	0	1	6	0,6	0	1,074968	1,155556
223	CD68(3)	14	17	24	26	21	18	14	18	15	12	179	17,9	17,5	4,557046	20,76667
224																
225	2309/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
226	CD20(3)	12	114	28	5	4	34	56	2	15	8	278	27,8	13,5	34,67564	1202,4
227	CD43(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
228	CD68(N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
229																
230	3189/96	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
231	CD20(3)	10	34	8	41	7	4	46	28	2	3	183	18,3	9	17,09483	292,2333
232	CD43(2)	13	2	0	5	0	6	28	1	1	0	56	5,6	1,5	8,859396	78,48889
233	CD68(3)	5	4	5	3	12	8	9	17	22	9	94	9,4	8,5	6,095536	37,15556
234																
235	1654/97	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
236	CD20(3)	2	4	1	3	4	9	4	0	2	1	30	3	2,5	2,538591	6,444444
237	CD43(3)	7	3	13	24	6	3	4	6	9	11	86	8,6	6,5	6,345602	40,26667
238	CD68(3)	20	8	9	2	6	17	7	2	5	13	89	8,9	7,5	6,0452	36,54444
239																
240	3039/97	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad	Var
241	CD20(3)	6	2	6	10	19	6	9	7	2	8	75	7,5	6,5	4,813176	23,16667
242	CD43(3)	2	1	0	1	4	7	2	4	0	5	26	2,6	2	2,319004	5,377778
243	CD68(3)	10	11	17	16	15	10	11	8	12	16	126	12,6	11,5	3,134042	9,822222

HGSIL													
1314/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(2)	0	0	0	1	10	6	12	11	5	46	4,6	3	4,903513
CD43(1)	0	2	1	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0,699206
CD68(3)	5	2	7	13	9	16	8	6	5	75	7,5	6,5	4,249183
2311	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD68(3)	3	1	1	3	5	4	3	3	0	23	2,3	3	1,702939
323	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(3)	3	8	2	5	11	1	0	3	12	49	7,5	7,5	4,121758
CD68(3)	7	27	13	5	8	10	24	10	13	129	12,9	11	7,156194
297	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(3)	62	33	6	36	12	6	5	11	6	186	34	34	18,99825
CD68(3)	4	6	2	0	17	3	8	7	9	66	6,6	6,5	4,857983
1447	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(1)	2	2	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0,849837
CD68(3)	22	6	3	0	1	0	2	5	7	67	6,7	4	8,165646
1452/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(2)	5	2	1	0	0	0	0	1	0	15	2,5	2,5	2,223611
CD68(3)	15	10	16	12	13	19	11	10	9	122	12,2	11,5	3,614784
3822/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(3)	2	0	2	1	0	0	0	0	0	5	1	1	0,849837
CD68(3)	0	0	10	8	7	11	13	11	6	72	7,2	7,5	4,442222

3420/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0	0,316228
CD43(3)	0	0	14	9	4	10	11	6	3	57	1,5	1,5	5,100109
CD68(3)	12	5	4	12	10	9	10	14	13	93	9,3	10	3,743142
6633/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(3)	12	14	6	5	4	6	11	38	15	119	13,5	13,5	9,949316
CD68(1)	6	3	0	0	0	0	0	0	0	9	0,9	0	2,024846
1063/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(3)	53	11	8	35	135	55	41	32	12	386	32,5	32,5	38,63562
CD68(	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2694/96	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(1)	0	0	3	0	0	10	0	0	0	13	0	0	3,198958
CD68(3)	20	13	1	2	6	3	7	5	6	97	9,7	6	10,24207
1956	C-1	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	Total	Media	Mediana	DesvPad
CD20(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD43(3)	13	48	29	3	42	12	36	17	10	224	11,5	11,5	15,25487
CD68(3)	14	12	17	27	23	7	27	24	18	190	19	19,5	6,63325
Total	1314/96	2311	297	1447	1452/96	3822/96	3420/96	6633/96	1063/96	2694/96	1956		
CD20	46	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
CD43	4	0	186	5	15	5	57	119	386	13	224		
CD68	75	23	66	67	122	72	93	9	0	97	190		
CD20(%)	37%	0	0	0	0	0	0.5%	0	0	0	0		
CD43(%)	3%	0	74%	7%	11%	6%	38%	93%	100%	12%	54%		
CD68(%)	60%	100%	26%	93%	89%	94%	61.5%	7%	0	88%	46%		