

VALOAREA PROGNOSTICĂ A PROTEINEI CAPSIDE L1 A VIRUSULUI PAPILOMA UMAN (HPV) ÎN LEZIUNILE PRECANCEROASE CERVICALE

Raluca Balan¹, Ludmila Liliac¹, Nicoleta Simion¹, V. Gheorghiu², Roxana Avădanei¹, Adriana Grigoraș¹, Cornelia Amălinei¹

1. Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T.Popa” Iași, Disciplina de Histologie

2. Spitalul Clinic de Obstetrică și Ginecologie “Elena Doamna” Iași

THE PROGNOSTIC VALUE OF HUMAN PAPILOMAVIRUS L1 CAPSID PROTEIN IN CERVICAL PRECANCEROUS LESIONS (ABSTRACT): The development of cervical intraepithelial precursors lesions and cervical cancer are strongly associated with human papillomavirus (HPV) infection. The protein capsid L1 of HPV represents the major target of the cellular immune response in the cervical squamous intraepithelial lesions. The aim of this study was the assessment of the protein capsid L1 of high risk (HR) HPV in cervical low and high grade squamous intraepithelial lesions (LSIL and HSIL), in the context of their progression to malignancy. The study involved 80 patients, between 16-38 years old, with abnormal cervical cytology, who underwent subsequent cervical biopsies under colposcopic guidance, as follows: 52 cases with LSIL (CIN1, cervical intraepithelial neoplasia) and 28 cases with HSIL (18 cases with CIN2 and 10 cases with CIN3). The conventional smears and the cervical biopsies were Papanicolaou and Hematoxylin-Eosin stained and evaluated for the immunorexpression of L1HPV protein. For the cervico-vaginal smears, the HPV L1 capsid protein was expressed in 67% of LSIL and 24% of HSIL. For the cervical biopsies, the HPV L1 capsid protein was expressed in 62% of LSIL and 20% of HSIL (CIN2). The absence of immunorexpression of HPV L1 protein capsid, in smears and biopsies is correlated with the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. The immunochemical assessment of L1 HPV creates the premises for a comprehensive study, by the combination of multiple molecular and clinic-morphological parameters, in the context of monitoring the events that interest cervical neoplasia progression.

KEYWORDS: HPV, L1 CAPSID PROTEIN, LSIL, HSIL.

Correspondență: Conf. Dr. Cornelia Amălinei, medic primar Anatomie Patologică, U. M. F. ”Gr. T. Popa” Iași, str. Universitatii, nr. 16, 700115, Iași, e-mail: camalinei13@yahoo.com*.

INTRODUCERE

Studiul rolului carcinogenic al virusului papilloma uman (HPV) continuă să reprezinte principalul domeniu de cercetare al biologiei moleculare a cancerului cervical [1]. Aceste cercetări au o reală semnificație practică, cancerul cervical reprezentând a doua malignitate ca frecvență la femei, la nivel mondial. În țările în curs de dezvoltare, cancerul cervical rămâne de multe ori cea mai frecventă formă de cancer la femei, constituind până la 25% din cancerurile genitale feminine [2]. Virusurile papilloma umane (HPV) reprezintă virusuri ADN dublu-catenare care infectează celulele epiteliale ale pielii și mucoaselor, inducând leziuni proliferative benigne și maligne. Considerațiile teoretice despre posibilitatea unei asocieri între HPV și cancerul de col uterin datează de la sfârșitul anilor '70 [3].

* received date: 05.09.2011

accepted date: 21.10.2011

Ca urmare a cercetărilor asupra structurii și ultrastructurii celulei epiteliale scuamoase anormale (koilocit) detectate la pacientele cu displazii și carcinom scuamos invaziv [4], s-a publicat un studiu în care se sugera că celulele din condiloma acuminata, care conțineau particule virale compatibile cu HPV în microscopia electronică erau citologic identice cu koilocitele descrise de Koss [5].

La scurt timp, mai multe echipe de cercetatori au detectat, prin microscopie electronică și imunohistochimie, particulele virale sau proteinele capsidice HPV, în leziunile intraepiteliale scuamoase de grad scăzut (LSIL) [6]. Prin tehnicile moleculare aplicate studiului neoplasmului cervical, s-au făcut progrese rapide în înțelegerea relațiilor dintre HPV și cancerul cervical [7].

Se consideră că organizarea genomică a diferitelor tipuri de HPV este similară, deși numeroasele tulpini virale studiate prezintă o specificitate semnificativă în corelație cu localizarea anatomică a epiteliului infectat și cu tipul leziunilor produse la locul infecției [8]. Genomul viral este divizat în trei regiuni: o regiune circumscrișă (*eng.* upstream regulatory region (URR), long central region (LCR)), o regiune timpurie (*eng.* early, E) și o regiune tardivă (*eng.* late, L) [9]. URR sau LCR este o regiune necodată a genomului viral, cu importanță în reglarea replicării virale și transcripția secvențelor în aval din regiunea timpurie. Regiunea timpurie (E) este transcrisă precoce în ciclul de viață viral și codifică predominant proteine cu rol în replicarea virală, în timp ce regiunea tardivă codifică proteine structurale virale ce sunt produse tardiv în ciclul de viață viral. Acestea din urmă, L1 și L2 alcătuiesc structura icosaedrică a virionului. L1 este proteina majoră a capsidului, în timp ce L2 reprezintă componenta minoră. Ultrastructural, L1 formează particule aproximativ de mărimea unui virion complet, motiv pentru care sunt numite particule virus-like (VLPs). Proteina L2 poate de asemenea să prezinte expresie la nivelul celulelor, unde va forma o structură capsidică similară cu L1. Expresia comună a L1 și L2 determină creșterea nivelului de VLPs, sugerând că L2 ajută astfel la stabilizarea capsidului [10].

Cele peste 100 de tipuri de HPV izolate și studiate au fost împărțite în trei mari grupe. Cel de-al treilea grup, care cuprinde mai mult de 40 tipuri de tulpini HPV, infectează predominant tractul anogenital. Proteinele capsidice L1 și L2 au fost depistate în proporții mari în condiloma acuminata și în LSIL și în cantități mici în HSIL (leziuni intraepiteliale scuamoase de grad înalt) și carcinoamele cervicale. Virusul papilloma alterează procesele normale de diferențiere programată observate la nivelul keratinocitelor. Se consideră că locul inițial al infecției HPV este reprezentat fie de celulele bazale, fie de celulele primitive basal-like ale epiteliului scuamos imatur, aspect care se datorează prezenței unor receptori specifici pentru HPV de pe celulele bazale. Un potențial receptor, localizat pe celulele bazale ale epiteliului stratificat scuamos este reprezentat de familia de integrine ce conțin alfa6 integrina, în complex cu integrina beta1 sau beta2 [11]. HPV poate exista în celulele bazale în două stări biologice diferite. Una este infecția neproductivă (latentă), în care ADN HPV continuă să habiteze în celulele bazale, fără a fi produși virionii infecțioși. Cealaltă formă de infecție HPV este infecția virală productivă, în care replicarea ADN viral apare independent de sinteza ADN cromozomial al celulei gazdă. Această replicare independentă produce mari cantități de ADN viral, rezultând virioni infecțioși. Replicarea ADN viral are loc predominant în celulele straturilor superficiale și intermediare ale epiteliului stratificat scuamos.

Pe măsură ce celulele epiteliale infectate se maturează și se deplasează spre suprafața epiteliului, factorii transcripționali de diferențiere specifici, derivați celular, produși de către epitelium stimulează producerea proteinelor capsid virale. Acest proces permite să se formeze mari cantități de virioni intacti și produce efectele citopatice caracteristice ale infecției HPV, care pot fi detectate citologic și histologic (acantoza, vacuolizarea citoplasmatică, koilocitoza, multinucleerea și atipiile nucleare) [12].

Majoritatea femeilor active sexual dezvoltă infecții HPV tranzitorii, cu o durată relativ scurtă de timp, în final o mare parte devenind ADN HPV negative. Doar o mică proporție din femeile expuse la HPV vor prezenta infecție persistentă, cu niveluri detectabile de ADN HPV în epiteliul genital.

Aceste femei aparțin categoriei infectate cu tulpini high risk și care, prin infecția persistentă, prezintă riscul de a dezvolta carcinom cervical invaziv. Se consideră că un rol important în evoluția unei infecții HPV îl au tipul viral și factorii imunologici [13]. Proteina capsidă L1 a HPV este considerată a fi ținta majoră a răspunsului imun celular în leziunile scuamoase intraepiteliale cervicale [14]. Având în vedere cele expuse, scopul studiului de față a fost evaluarea imunoexpresiei proteinei capsidă L1 a tulpinilor high risk (HR) a HPV în leziunile scuamoase de grad scăzut și înalt (LSIL și HSIL), în contextul progresiei acestora spre malignitate.

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul a cuprins 80 de paciente cu vârsta cuprinsă între 16-38 de ani, care prezentau o citologie cervico-vaginală anormală, 52 de cazuri cu LSIL (CIN1, neoplazie intraepitelială cervicală) și 28 de cazuri cu HSIL (18 cazuri cu CIN2 și 10 cazuri cu CIN3). Pacientelor li s-a realizat ulterior biopsie cervicală sub ghidaj colposcopic.

Frotiurile cervico-vaginale, fixate prin pulverizarea frotiurilor proaspete cu spray fixator, au fost reintroduse în etanol 95% și colorate folosindu-se metoda Papanicolau. Biopsiile cervicale au fost fixate pentru 24 de ore în formalină tamponată și procesate pentru includere la parafină. Secțiunile seriate de 4-5 μm au fost deparafinate ulterior și colorate cu Hematoxilin-Eosină.

Atât frotiurile convenționale cât și biopsiile cervicale corespunzătoare au fost evaluate pentru imunoexpresia proteinei capsidă L1 a HPV.

După citodiagnosticul Papanicolau, realizat în acord cu terminologia Bethesda 2001 și după diagnosticul histopatologic al biopsiilor cervicale, frotiurile cervico-vaginale și secțiunile histologice au fost decolorate și utilizate pentru detectarea expresiei proteinei capsidă L1 a HPV, prin examen imunocitochimic, respectiv imunohistochimic. În ambele cazuri s-au folosit anticorpii monoclonali împotriva tulpinilor high-risk (HR) ale HPV (16, 18, 33, 35, 39, 45, 56 și 58), (Cytoactiv HPV L1 High Risk Set REF SCA0850, Cytoimmun Diagnostics GmbH) într-un protocol de lucru standardizat.

Metoda imunochimică pentru detecția proteinei capsidă virale L1

Frotiurile cervico-vaginale și secțiunile histologice au fost introduse în xilen, pentru îndepărtarea lamelor și rehidratate prin plasare în băi succesive de alcool cu concentrații descrescătoare: 96%, 70%, 50%. Lamele introduse în soluție de tampon citrat au fost tratate termic la microunde pentru demascarea antigenică. După blocarea situsurilor de legare nespecifică, probele au fost incubate cu anticorpii primari (High Risk Antibody VAHP), în camera umedă timp de 30 de minute, la temperatura camerei.

Developarea reacției a constat în incubarea lamelor cu reactivul de detecție timp de 30 de minute și cu soluția de cromogen timp de 10 minute, la temperatura camerei. După contracolorarea cu hematoxilină și montarea lamei în mediu solubil în apă, lamele au fost examinate la microscop.

Un singur nucleu de celulă epitelială scuamoasă, colorat în roșu a fost suficient pentru a indica o reacție imunochimică pozitivă a probei.

REZULTATE

Pentru cazurile luate în studiu, diagnosticele histopatologice au corespuns cu citodiagnosticele, după cum urmează: 52 de cazuri cu LSIL (CIN1) și 28 de cazuri cu HSIL (18 cazuri CIN2 și 10 cazuri CIN3).

Infecția cu HPV a fost confirmată morfologic prin prezența efectului citopatic viral, tradus prin existența koilocitelor, atât pe frotiurile cervico-vaginale cât și pe secțiunile histologice corespunzătoare biopsiilor cervicale. Astfel, pentru frotiurile convenționale, atipii koilocitare au existat în toate cazurile diagnosticate cu LSIL (100%) și în 8 cazuri diagnosticate cu HSIL (28,57%).

Pentru biopsiile corespunzătoare, efectul citopatic viral s-a constatat în toate cazurile cu displazii minore, LSIL (CIN1) (100%) și în doar 14 cazuri diagnosticate cu HSIL (CIN2) (50%).

Modificările de tip citopatic viral au fost prezente predominant la pacientele cu vârste între 22-34 de ani. Anomaliile morfologice notate au fost de obicei cele nucleare și aspectele koilocitare tipice.

Imunocitochimia în frotiurile cervico-vaginale

Pentru frotiurile cervico-vaginale, proteina capsidă L1 a fost exprimată în 67% (34 cazuri LSIL) din displaziile minore și în 24% (6 cazuri) din displaziile tip HSIL (tabel 1). Imunoexpresia proteinei capsidă a fost semnificativ redusă pentru cazurile HSIL HPV pozitive. În cazurile LSIL HPV pozitive (Fig. 1) nu s-a putut demonstra o reducere semnificativă a expresiei proteinei capsidă L1.

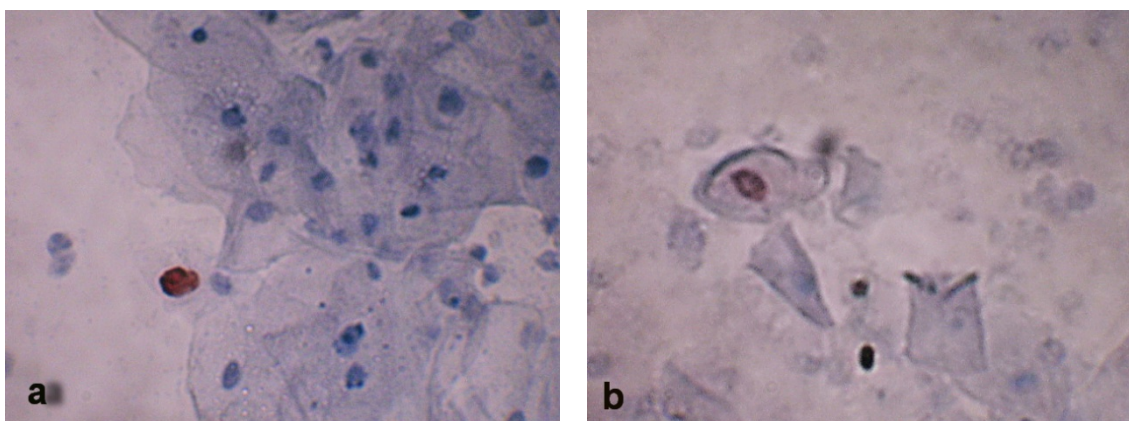


Fig. 1 Frotiu convențional cervico-vaginal, LSIL. **a.** Celulă exocervicală scuamoasă cu displazie minimă, imunopozitivitate nucleară (anti L1 HR-HPV x 20); **b.** Celulă exocervicală scuamoasă cu efect citopatic HPV, imunopozitivitate nucleară (anti L1 HR-HPV x 40)

Imunohistochimia în biopsiile cervicale

În cazul leziunilor scuamoase intraepiteliale diagnosticate histopatologic, proteina capsidă L1 a fost exprimată în 62% (32 cazuri LSIL) din displaziile minore și în 20% (5 cazuri) din displaziile HSIL (CIN2) (Tabel 1).

Pentru imunodectia proteinei capsidă L1 a HPV, reacția pozitivă s-a caracterizat printr-o colorare intensă a întregului nucleu, înconjurat de o citoplasmă fără marcaj (Fig. 2). În majoritatea cazurilor, reacția pozitivă s-a observat în koilocitele tipice sau în diskeratocite, cu caracteristici nucleare de HSIL (CIN2). Pentru cazurile diagnosticate LSIL, pozitivitatea nucleilor a fost prezentă doar în koilocitele tipice (Fig. 2).

Evoluția leziunilor a fost corelată doar cu pozitivitatea nucleilor, nu și cu intensitatea și procentul de celule imunomarcate.

Regresia leziunilor a fost prevalentă pentru cazurile L1-pozitive, în care 28 de cazuri au prezentat remisie, în timp ce 12 au progresat, de la CIN1 sau CIN2 la CIN3, la monitorizarea de la 6, 12 și 18 luni.

Tabel 1

Evaluarea imunodectiei proteinei capsidă L1 HPV în cazurile LSIL și HSIL pentru frotiurile cervico-vaginale și biopsiile cervicale

Cazuri investigate	Proteina capsidă L1 în cazurile LSIL	Proteina capsidă L1 în cazurile HSIL
Frotiuri cervico-vaginale	67%	24%
Biopsii cervicale	62%	20%

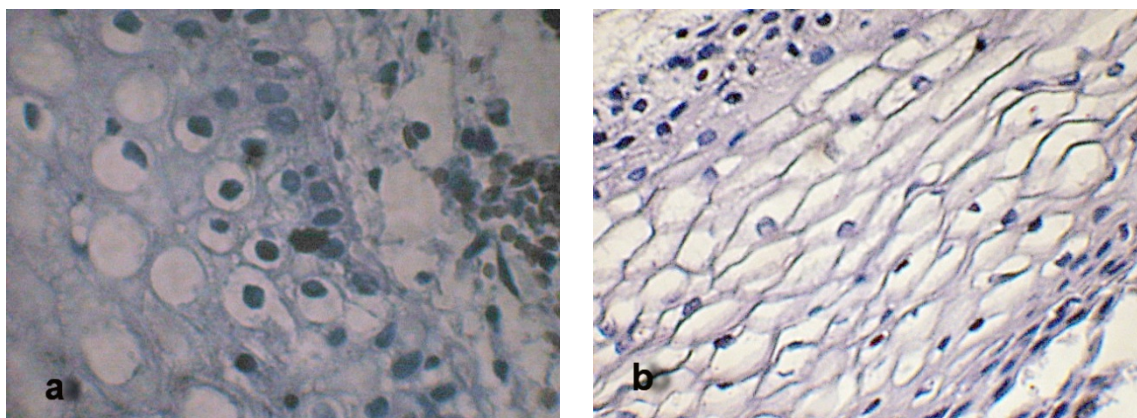


Fig. 2 Epiteliu scuamos exocervical, displazie cervicală minimă (LSIL, CIN1)
a. imunocolorare nucleară la nivelul treimii bazale a epitelului (anti L1 HR-HPV x 20);
b. Koilocite cu imunocolorare nucleară (anti L1 HR-HPV x 10)

DISCUȚII

Proteina capsidă L1 este exprimată în faza activă a infecției cu HPV și este necesară în completarea ciclului celular viral. În consecință, detecția proteinei virale, prin reacție imunochimică reprezintă o evidență a infecției active HPV în frotiul sau țesutul examinat [10]. Proteina capsidă virală L1 reprezintă o țintă majoră a răspunsului imun celular [14]. Leziunile LSIL și displaziile moderate, fără imunodectie a proteinei L1 sunt corelate, în mai mult de 80% din cazuri, cu progresia displaziei. Griesser et al. certifică acest aspect, subliniind că leziunile scuamoase minore și moderate fără expresie a proteinei capsidă L1 sunt semnificativ mai expuse la progresie comparative cu cazurile L1 pozitive [15].

Aceste afirmații sunt în concordanță cu rezultatele studiului nostru, în care regresia leziunilor L1-pozitive a fost însemnată, la monitorizarea de la 6, 12 și 18 luni, 28 de cazuri prezentând remisie și 12 progresie, de la CIN1 sau CIN2 la CIN3.

În general, infecțiile HPV anogenitale au tendința de a fi tranzitorii și de o durată relativ scurtă, atât la femeile tinere cât și la cele mai în vârstă. Deoarece la majoritatea femeilor HPV pozitive infecția se remite spontan, prevalența infecțiilor HPV scade cu creșterea vârstei.

Astfel, istoria naturală a infecțiilor HPV se bazează pe faptul că majoritatea femeilor tinere active sexual sunt expuse la virus la un moment dat, după începerea vieții sexuale [16]. Majoritatea acestor femei dezvoltă infecții HPV tranzitorii, cu o durată relativ scurtă de timp și în cele din urmă majoritatea femeilor infectate cu HPV vor deveni ADN HPV negative. Doar o mică proporție din femeile expuse la HPV dezvoltă o infecție persistentă și continuă să aibă niveluri detectabile de ADN HPV în epiteliul scuamos genital. Aceste femei aparțin categoriei infectate cu tulpini high risk și care prin infecția persistentă prezintă riscul de a dezvolta carcinom cervical invaziv [17].

Se consideră că un rol important în evoluția unei infecții HPV îl au factorii imunologici [13]. Mucoasa genitală deține arme inductoare și efectoare ale răspunsului imun, ceea ce face ca infecția HPV să interfere cu mecanismele imune vigilante locale [13]. Cu toate că imunitatea locală și sistemică determină latență în infecția cu HPV și în evoluția leziunilor înspre displaziile de grad înalt, răspunsurile imune mediate celular, la nivel periferic se consideră a fi în mare măsură epifenomene, din moment ce răspunsul imun relevant este local [13]. Studiile au relevat că mucoasa cervicală normală se află sub supravegherea unui mic număr de limfocite T reglatoare, dispersate în stroma imediat subjacentă membranei bazale a epiteliului [13,18,19]. Infiltratul lezional în cervicite este bogat în limfocite CD4+ și CD8+, dar nu prezintă limfocite T reglatoare. În contrast, o mică proporție de cervicite HPV pozitive prezintă un număr semnificativ de limfocite T reglatoare în epiteliul scuamos metaplazic [19]. Această constatare a dus la concluzia că limfocitele T reglatoare prezente în epiteliul infectat cu virusul papilloma pot modula răspunsul limfocitelor T efectoare și pot contribui la menținerea toleranței locale, permițând astfel infecției să persiste [13]. Se consideră că regresia leziunilor scuamoase CIN2 și CIN3 este mediată de un răspuns imun mediat celular local, care este dereglat în leziunile scuamoase de grad înalt [13]. S-a observat că foliculii limfatici sunt mai frecvenți în leziunile scuamoase de grad înalt comparativ cu mucoasa cervicală normală, ceea ce poate indica o activitate imună locală crescută [20]. Infiltratul limfocitar conține predominant limfocite T CD4+ în stroma cervicală adiacentă displaziei și limfocite T CD8+ în interiorul epiteliului displazic [21,22].

Cel mai probabil, lipsa antigenului HPV este datorată unei sinteze proteice slabe, sub limita minimă de detecție imunochimică. Deoarece L1 reprezintă ținta majoră a răspunsului imun [14,22], translația sa deficitară poate duce la o epurare neeficientă a celulelor infectate, promovând integrarea ADN-ului viral în genomul celulei gazdă și transformarea celulelor epiteliale imature. Observația care afirmă că scăderea pozitivității capsidului HPV16 în serul pacientelor cu carcinom cervical este un indicator de prognostic rezervat, susține importanța unui răspuns umoral specific. Imunodetecția proteinei capsidului L1, pe frotiurile cervico-vaginale, pot indica în consecință statusul imun indus local asupra infecției HPV și poate oferi informații prognostice, mai ales în leziunile cu displazii minime (LSIL).

Cu toate că majoritatea carcinoamelor cervicale prezintă integrarea ADN viral, acesta este detectabil doar într-o mică proporție a displaziilor LSIL și HSIL [23]. Așa cum a fost deja raportat în literatură [14], probabil că există mecanisme adiționale de control care conduc la o imunoexpresie negativă a proteinei L1 pentru cazurile menționate.

Dezvoltarea antigenului L1 al capsidului viral depinde de factori de transcripție ce pot fi exprimați în timpul procesului de maturare, de la celula epitelială bazală la celula superficială [10]. În leziunile HSIL, structura naturală ca și maturarea epitelului sunt derulate, astfel că celulele scuamoase bazale displazice reprezintă tipul celular predominant cu expresie redusă a proteinei capsidului L1.

Din cadrul frotiurilor cervico-vaginale, datele noastre relevă faptul că proteina capsidului L1 a fost exprimată în 67% din cazurile LSIL și 24% din cazurile HSIL. Prezența nucleilor imunopozitivi pentru proteina L1 a putut fi corelată cu evoluția clinică. Imunoexpresia L1 a fost semnificativ redusă pentru cazurile HSIL HPV pozitive. În cazurile LSIL HPV pozitive, nu s-a putut demonstra o reducere semnificativă a imunoexpresiei proteinei capsidului viral L1. Datorită ratei scăzute a pozitivității L1 HR-HPV identificată în cazurile cu HSIL, putem admite că detecția HPV nu este utilă în gradarea leziunilor intraepiteliale scuamoase cervicale, ceea ce este în acord cu datele din literatură [24].

În studiul nostru, vârsta medie a pacientelor a fost 27 de ani. Acest fapt este în concordanță cu studiile existente, în care s-a demonstrat că prevalența infecției HPV variază cu vârsta și regiunea geografică, atingând ratele cele mai înalte sub vârsta de 35 de ani [25].

Infecția cu HPV a fost confirmată morfologic, în cazurile studiate, prin prezența efectului citopatic viral, tradus prin existența koilocitelor, atât pe frotiurile cervico-vaginale cât și pe secțiunile histologice corespunzătoare biopsiilor cervicale. Astfel, pentru frotiurile convenționale, atipii koilocitare au existat în toate cazurile diagnosticate cu LSIL (100%) și în 8 cazuri diagnosticate cu HSIL (28,57%). Pentru biopsiile corespunzătoare, efectul citopatic viral s-a constatat în toate cazurile cu displazii minore, LSIL (CIN1) (100%) și în doar 14 cazuri diagnosticate cu HSIL (CIN2) (50%). Anomaliile morfologice notate au fost de obicei cele nucleare și aspectele koilocitare tipice. Deși leziunile displazice pot fi depistate precoce, evoluția neoplaziilor intraepiteliale nu poate fi prevăzută prin criterii morfologice. Este deja admis că dezvoltarea și persistența leziunilor precanceroase cervicale necesită prezența ADN-ului viral și că dispariția ADN anticipează regresia celulelor neoplazice, chiar și în stadii avansate ale leziunilor displazice [26].

În infecțiile latente neproductive, un număr mic de copii ale genomului HPV rămân de obicei în nucleu, într-o formă circulară liberă numită episom. Replicarea ADN episomal în infecțiile latente este strâns cuplată cu replicarea celulelor epiteliale și apare doar în paralel cu replicarea ADN cromozomial al celulei gazdă. Deoarece particulele virale complete nu sunt probabil produse în infecțiile latente, efectele citopatice caracteristice ale infecției HPV nu sunt prezente iar HPV nu poate fi identificat decât prin metode moleculare. Epiteliul cu infecție latentă nu prezintă deci anomalii morfologice.

CONCLUZII

Absența imunoexpresiei proteinei capsidului viral L1, în frotiuri sau biopsii este corelată cu progresia leziunilor intraepiteliale scuamoase cervicale.

Evaluarea imunohistochimică a proteinei L1 a HPV creează premisele unui studiu complex, prin îmbinarea mai multor parametri moleculari și clinico-morfologici, în contextul monitorizării evenimentelor ce interesează progresia neoplaziei cervicale.

ACKNOWLEDGEMENTS

Cercetarea a fost finanțată de către Consiliul Național al Cercetării Științifice, prin grant IDEI 2036/2008.

BIBLIOGRAFIE

1. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(1-2): 9-19.
2. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1): 1-17.
3. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977; 78: 1-30.
4. Koss L, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci.* 1956; 63(6): 1245-1261.
5. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 1976; 20(6): 505-509.
6. zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994; 186: 131-156.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(9): 690-698.
8. de Villiers EM. Hybridization Methods other than PCR: un Update. In: Munoz N, Bosch FS, Shab KV, Meheus A. eds. *The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer.* Lyon, IARC, 1992; p. 111-119.
9. Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(4): 810-817.
10. Gu W, Ding J, Wang X, de Kluyver RL, Saunders NA, Frazer IH, Zhao KN. Generalized substitution of isoencoding codons shortens the duration of papillomavirus L1 protein expression in transiently gene-transfected keratinocytes due to cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(14): 4820-4832.
11. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997; 71(3): 2449-2456.
12. Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous Lesions of the Cervix. In Kurman RJ. ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* 5th ed. New York, Springer-Verlag, 2002; p. 253-265.
13. Jayshree RS, Sreenivas A, Tessa M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res.* 2009; 130(3): 286-295.
14. Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, Bastert G. Immunocytochemical detection of human papillomavirus high risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytol.* 2003; 47(2): 124-128.
15. Griesser H, Sander H, Hielfrich R, Moser B, Schenk U. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004; 26(5): 241-245.
16. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10(2): 101-106.
17. Koss GL, Melamed RM. Squamous Carcinoma of the Uterine Cervix and Its Precursors. In Koss GL, Melamed RM. eds. *Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006; p. 308-315.
18. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(1): 354-361.

19. Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Uma Devi, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: Cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol.* 2008; 60(1): 55-65.
20. Kobayashi A, Darragh T, Herndier B, Anastos K, Minkoff H, Cohen M, Young M, Levine A, Grant LA, Hyun W, Weinberg V, Greenblatt R, Smith-McCune K. Lymphoid follicles are generated in highgrade cervical dysplasia and have differing characteristics depending on HIV status. *Am J Pathol.* 2002; 160(1): 151-164.
21. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996; 13(1): 2323-2330.
22. Steele JC, Roberts S, Rookes SM, Gallimore PH. Detection of CD4⁺- and CD8⁺-T-cell responses to human papillomavirus type 1 antigens expressed at various stages of the virus life cycle by using an enzyme-linked immunospot assay of gamma interferon release. *J Virol.* 2002; 76(12): 6027-6036.
23. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 59(24): 6132-6136.
24. Yildiz YZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract.* 2007; 203(6): 445–449.
25. Cox JT. Evaluating the Role of HPV Testing for women with equivocal Papanicolaou test findings. *JAMA.* 1999; 281(17): 1645-1647.
26. Goia CD, Iancu IV, Socolov D, Botezatu A, Lăzăroiu AM, Huică I, Pleșa A, Anton G. The expression of cell cycle regulators in HPV - induced cervical carcinogenesis. *Romanian Biotechnological Letters.* 2010; 15(4): 5376-5383.