

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS T,
LINFÓCITOS B E CÉLULAS *NATURAL KILLER*
NO ESTROMA CERVICAL DE PACIENTES
SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA O HIV E
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

ADRIANA ALMEIDA DE SOUZA LUCENA

Belo Horizonte

2011

ADRIANA ALMEIDA DE SOUZA LUCENA

**AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS T,
LINFÓCITOS B E CÉLULAS *NATURAL KILLER*
NO ESTROMA CERVICAL DE PACIENTES
SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA O HIV E
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Programa: Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo de Melo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazzi Michelin.

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG**

2011



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Victor Hugo de Melo, Márcia Antoniazi Michelin, Fernando Marcos dos Reis e Juliana Barroso Zimmermann, aprovou a defesa da dissertação **“AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS T, LINFÓCITOS B E CÉLULAS NATURAL KILLER NO ESTROMA CERVICAL DE PACIENTES SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA O HIV E COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL”** apresentada pela mestrand **ADRIANA ALMEIDA DE SOUZA LUCENA**, para obtenção do título de mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 16 de dezembro de 2011.

Prof. Victor Hugo de Melo
Orientador

Profa. Márcia Antoniazi Michelin
Coorientadora

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Profa. Juliana Barroso Zimmermann



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
eng.u.medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **ADRIANA ALMEIDA DE SOUZA LUCENA**, nº de registro 2009655278. No dia **dezesesseis de dezembro de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS T, LINFÓCITOS B E CÉLULAS NATURAL KILLER NO ESTROMA CERVICAL DE PACIENTES SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA O HIV E COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Victor Hugo de Melo, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Victor Hugo de Melo /Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Profa. Márcia Antoniazzi Michelin/Coorientadora	Instituição: UFTM	Indicação: <u>Apto</u>
Prof. Fernando Marcos dos Reis	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Profa. Juliana Barroso Zimmermann	Instituição: UFJF	Indicação: <u>APTA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2011.

Prof. Victor Hugo de Melo _____
 Profa. Márcia Antoniazzi Michelin _____
 Prof. Fernando Marcos dos Reis _____
 Profa. Juliana Barroso Zimmermann _____
 Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

ccfs
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
UFMG

Aos meus pais, Terezinha e Mateus,
exemplos de amor incondicional, dedicação e retidão.

As minhas irmãs, Alessandra e Aline,
pelo carinho e amizade, sempre...

E aos meus sobrinhos amados, Matheus e Felipe.

Ao meu querido marido, Clécio,
companheiro de todas as horas,
pela compreensão, carinho e dedicação.

E aos meus queridos filhos, João Gabriel e Ana Carolina,
razões maiores do meu viver...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao **Prof. Dr. Victor Hugo de Melo**, meu orientador, que me deu a chance de fazer parte do seu grupo de pesquisa e é, para mim, exemplo de seriedade, dedicação e disponibilidade. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio em todos os momentos de dificuldade deste projeto, tendo sempre uma palavra de incentivo e encorajamento.

À **Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin**, minha coorientadora, por ter nos recebido com tanto carinho todas as vezes em que estivemos em Uberaba e que, com toda a sua capacidade e competência, soube nos orientar, apoiar e capacitar a realizar toda a técnica de imuno-histoquímica, além dos ensinamentos de imunologia, que foram muito valiosos.

Ao **Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta**, que abriu as portas do laboratório Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) para a realização deste trabalho, pela receptividade e apoio.

Ao meu marido, **Clécio Ênio Murta de Lucena**, que com seu espírito acadêmico inspirou em mim o desejo pela realização deste trabalho, auxiliando-me em todos os momentos de dificuldades e dúvidas, incentivando-me e compreendendo os momentos de ausência.

À **Prof^a. Dr^a. Cláudia Teixeira da Costa Lodi**, minha grande amiga, responsável pelo meu ingresso no grupo de pesquisa e que esteve ao meu lado nas fases deste projeto, principalmente em toda a análise estatística, com total disponibilidade, dedicação e carinho.

À **Dr^a. Maria Inês de Miranda Lima**, minha amiga, que cedeu seu material para a realização deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade, incentivo, carinho e apoio.

À minha amiga **Dr^a. Mírian Viviane Maciel Barros**, com quem dividi este projeto desde o início, pelo seu apoio, companheirismo e amizade. A caminhada a duas foi realmente mais leve...

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa “A mulher e o HIV”, em especial **Nara Chartuni P. Teixeira, Angela Cristina Labanca, Fabyola Jorge Cruz, Gustavo Alvarenga, Jannete Campos, Benito Ceccato, Helena de Souza Rabelo, Iracema Maria R. da Fonseca**, companheiros de jornada, pelo apoio e incentivo.

A todos do laboratório do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (**NUPAD**), em especial à **Dr^a. Nara de Oliveira Carvalho**, pelo constante apoio às nossas pesquisas.

A todos os **funcionários e alunos do IPON**, que sempre nos receberam com tanto carinho, e em especial à **Pâmela Cândido**, que esteve do nosso lado durante a realização da técnica de imuno-histoquímica, ensinando, ajudando, incentivando. Obrigada pelo carinho e generosidade, sempre...

À **Prof^a. Dr^a. Sheila Jorge Adad**, que com sua simpatia, competência e disponibilidade revisou todo o nosso material histopatológico.

Ao **Prof. Dr. Moisés Salgado Pedrosa**, do laboratório CEAP e amigo, que disponibilizou seu valioso tempo de trabalho e de descanso a nos ajudar na leitura da imuno-histoquímica. Obrigada pela paciência, carinho e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Maurício Buzzelin Nunes**, patologista da Santa Casa de Belo Horizonte, pela colaboração, disponibilidade, por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu fizesse toda a leitura microscópica do material.

À **Prof^a. Dr^a Helenice Gobbi**, pelos ensinamentos do mundo da imunohistoquímica, que me foram muito valiosos na realização deste trabalho.

À **Prof^a. Magda Barbosa Roquette Taranto**, pela paciência, colaboração e revisão do Português e de todo este trabalho.

À professora **Marisa Carneiro Mendonça**, pela amizade, incentivo e colaboração e, acima de tudo, pelos seus ensinamentos no inglês, que me foram e são muito valiosos.

À professora e grande amiga **Maria Teresa Sotomayor Emery**, pelo constante incentivo na realização deste projeto, pela amizade e carinho sempre, além dos ensinamentos em línguas estrangeiras.

Às minhas secretárias do lar, **Léia e Klemilda**, por cuidarem tão bem da minha casa e dos meus filhos, permitindo que eu me dedicasse a este trabalho de forma tranquila.

A todas as pacientes, razão primordial dos nossos estudos, pela disponibilidade e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Avaliação da contagem de linfócitos T, linfócitos B e células *natural killer* (NK) no estroma cervical de pacientes soropositivas e soronegativas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com neoplasia intraepitelial cervical (NIC). **Objetivos:** caracterizar a resposta imune local pela expressão dos linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), linfócitos B (CD20⁺) e células NK (CD56⁺) no estroma cervical das pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, com NIC, comparando se existe diferença dessa resposta entre elas e entre os grupos de NIC. **Pacientes e método:** estudo transversal realizado a partir de peças de conização por cirurgia de alta frequência (CAF) de 85 pacientes, 47 soropositivas e 38 soronegativas para o HIV, em que havia 46 casos de NIC 2/3 e 39 de NIC 1. A avaliação das células imunomarcadas foi feita por técnica de imuno-histoquímica no estroma cervical, logo abaixo da área de neoplasia intraepitelial. A leitura microscópica dos resultados da imuno-histoquímica foi realizada pelo observador mais experiente, de maneira subjetiva, cujos resultados foram agrupados em baixa e alta expressão das células imunológicas em questão. Na análise estatística foram usados teste qui-quadrado e teste exato de Fisher para comparação das variáveis categóricas. Foram pesquisadas possíveis interações entre as variáveis, de acordo com os resultados de *odds ratio* (OR) discordantes, e a análise multivariada foi realizada por regressão logística, mantendo-se somente as variáveis e interações significantes no modelo final ($p < 0,05$). Para verificar a qualidade do ajuste das regressões logísticas, foi utilizado o teste de Hosmer-Lemeshow. **Resultados:** na análise univariada, comparando as pacientes quanto ao *status* HIV, foram encontradas diminuição significativa de linfócitos T CD8⁺ nas pacientes soronegativas ($p = 0,03$) e acentuada redução de células NK CD56⁺ nas soropositivas ($p = 0,01$). E quanto ao grau de lesão, não foi obtida diferença estatisticamente significativa na expressão dessas células entre os grupos de NIC 2/3 e NIC 1. A análise multivariada mostrou as variáveis CD8 (OR=0,34; IC95%=0,13-0,87) e CD56 (OR=4,48; IC95%=1,23-16,3) com associação independente para a infecção pelo HIV. E mostrou as variáveis CD3 x HIV (OR=4,79; IC95%=1,02-22,50) e CD20 x HIV (OR=0,12; IC95%=0,02-0,61) com associação independente para grau de lesão. **Conclusões:** de maneira global, a baixa expressão de todas as células imunológicas pesquisadas foi predominante tanto nas pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, quanto nas NIC 2/3 e NIC 1. A infecção pelo HIV parece ter influenciado diretamente a expressão das células NK, com importante diminuição nas pacientes soropositivas. E o padrão de expressão dos linfócitos T CD3 e T CD20 nas NIC 2/3 e NIC 1, respectivamente, parece ter tido interação com a presença do HIV.

Palavras-chave: Neoplasia intraepitelial cervical. Vírus da imunodeficiência humana. Imuno-histoquímica. Linfócitos T e linfócitos B. Células *natural killer*.

ABSTRACT

Assessment of T and B lymphocyte cell count and natural Killer cell count in the cervical stroma of HIV positive and negative women with cervical intraepithelial neoplasia. **Objecives:** To characterize the local immune response by measuring the expression of T lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+), B lymphocytes (CD20+) and Natural Killer cells (CD56+) in the cervical stroma of HIV positive and negative women with cervical intraepithelial neoplasia, investigating whether there are differences in the immune response among the groups and between groups of high and low grade lesions. **Patients and methods:** This was a cross-sectional study which analyzed cone specimens by loop electrosurgical excision procedure in 85 patients, 47 of which were HIV-seropositive and 38 were HIV-seronegative. There were 46 cases of high grade CIN and 39 cases of low grade CIN. An immunohistochemical analysis of immunostained cells, located just below the CIN cells, was conducted. The microscopic reading of immunohistochemical analysis was done by the most experienced observer in a subjective way. The results were grouped into high and low expression of immune cells. The statistical analysis used chi square test and Fisher's exact test to compare categorical variables. The interactions among the variables were also investigated, based on odds ratio results. The multivariate analysis with logistic regression was performed, keeping the significant variables and interactions in the final model ($p < 0,05$). In order to test for goodness of fit for logistic regression, the Hosmer-Lemeshow test was used. **Results:** the univariate analysis comparing HIV status showed a significant decrease of TCD8+ lymphocytes in HIV-seronegative patients ($p=0,03$) as well as significant decrease of NK CD56+ cells in HIV-seropositive ($p=0,01$). There was no statistically significant difference in the expression of these cells in high and low grade CIN. The multivariate analysis showed that the variables CD8 (OR=0,34; IC 95%=0,13-0,87) and CD56 (OR=4,48; IC 95%=1,23-16,3) were independently associated for HIV infection. In addition, variables CD3 x HIV (OR=4,79; IC95%=1,02-22,50) and CD20 x HIV (OR=0,12; IC95%=0,02-0,61) were independently associated for lesion grade. **Conclusions:** In general, there was a predominance of low expression of immune cells in both HIV-seronegative and HIV-seropositive patients and in high and low grade CIN. HIV infection was likely to have directly influenced the Natural Killer cell expression, showing a significant decrease in HIV-seropositive patients. The pattern of TCD3 and TCD20 lymphocyte expression in high and low grade CIN lesions, respectively, may have interacted with the presence of HIV.

KEYWORDS: Cervical Intraepithelial Neoplasia. Human Immunodeficiency Virus. Immunohistochemistry. T Lymphocytes. B Lymphocytes. Natural Killer cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
CAF	Cirurgia de alta frequência
CC	Câncer cervical
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CL	Célula de Langerhans
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz
DAB	Diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desorribonucleico
dp	Desvio-padrão
EDTA	Etilenodiaminotetracetatodossódico
HAART	Terapia antirretroviral de alta potência
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
JEC	Junção escamocolunar
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MALT	Tecidos linfoides associados à mucosa
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NIC	Neoplasias intraepiteliais cervicais
NK	<i>Natural killer</i>

OR	<i>Odds ratio</i>
PAM	Posto de Atendimento
PBH	Prefeitura de Belo Horizonte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCB	Leitura dos controles positivos
RLU	Unidade relativa de luz
RNA	Ácido ribonucleico
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TBST	Solução salina tris-tamponada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	<i>T-helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T regulatórios
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
WIHS	<i>Women's Interagency HIV Study</i>
ZT	Zona de transformação

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Micrótomo.....	43
FIGURA 2 - Frasco com anticorpo CD3.....	44
FIGURA 3 - Estufa a 60º.....	45
FIGURA 4 - Processo de hidratação dos cortes em álcool.....	46
FIGURA 5 - Lâminas em solução tampão: jarra de Couplin.....	47
FIGURA 6 - Panela de pressão Pascal.....	47
FIGURA 7 - Marcação das lâminas com caneta própria para imuno- histoquímica.....	48
FIGURA 8 - Lâminas, na bandeja úmida de incubação, com solução de leite molico® para bloqueio das proteínas endógenas.....	48
FIGURA 9 - Frasco de anticorpo primário.....	49
FIGURA 10 - Incubação do anticorpo primário.....	49
FIGURA 11 - Frascos dos anticorpos secundário e polímero.....	50
FIGURA 12 - Contracoloração: hematoxilina.....	50
FIGURA 13 - Processo de desidratação dos cortes.....	51
FIGURA 14 - Cortes montados com lamínula.....	51
FIGURA 15 - NIC 3: expressão CD3 no estroma.....	53
FIGURA 16 - NIC 3: expressão CD4 no estroma.....	54
FIGURA 17 - NIC 1: expressão CD8 no estroma.....	54
FIGURA 18 - NIC 3: expressão CD56 no estroma.....	54

Gráficos

GRÁFICO 1 – Distribuição do padrão de expressão dos imunomarcadores CD3, CD4, CD8, CD56, CD20 nas pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV.....	68
GRÁFICO 2 – Distribuição do padrão de expressão para CD3, CD4, CD8, CD56, CD20 nas NIC 2/3 e NIC 1	71

Quadro

QUADRO 1 - Equivalência de nomenclaturas citológicas e histológicas das lesões pré-invasivas do câncer cervical uterino.....	42
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Poder do teste para o teste qui-quadrado considerando diversos tamanhos do efeito.....	55
TABELA 2 - Análise de média/ mediana para idade, paridade e início da atividade sexual comparando pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV.....	59
TABELA 3 - Comparação entre as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV segundo variáveis sociodemográficas....	59
TABELA 4 - Comparação entre as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, segundo citologia, colposcopia, resultado da biópsia e histopatológico da CAF.....	61
TABELA 5 - Medidas descritivas para TCD4+ e carga viral das pacientes soropositivas para o HIV.....	62
TABELA 6 - Análise de média/mediana para idade, paridade e início da atividade sexual comparando as mulheres portadoras de NIC 2/3 e NIC 1.....	62
TABELA 7 - Comparação entre as pacientes com NIC 2/3 e NIC 1 segundo variáveis sociodemográficas.....	63
TABELA 8 - Comparação entre as pacientes com NIC 2/3 e NIC 1 segundo citologia, colposcopia, resultado da biópsia e <i>status</i> do HIV.....	64
TABELA 9 - Comparação entre pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV quanto ao padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20.....	67
TABELA 10 - Comparação dos grupos de NIC 2/3 e NIC 1 quanto ao padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20.....	70
TABELA 11 - Padrão de expressão alta e baixa dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20, relacionado ao <i>status</i> HIV e NIC da CAF	73

TABELA 12 - <i>Odds ratio</i> (OR) para cada marcador das análises univariadas com <i>status</i> HIV e grau de NIC <i>versus</i> OR da interação (<i>status</i> HIV x grau de NIC)	74
TABELA 13 - Modelo inicial da análise multivariada, segundo a presença ou não do HIV.....	75
TABELA 14 - Modelo final da análise multivariada, segundo a presença ou não do HIV.....	76
TABELA 15 - Modelo inicial da análise multivariada, segundo o grau de NIC (CAF).....	77
TABELA 16 - Modelo final da análise multivariada, segundo o grau de NIC (CAF).....	78

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Breve histórico.....	21
2.2 Entendendo imunologia.....	21
2.3 Aspectos gerais da resposta imune no trato genital inferior.....	24
2.4 Resposta imune ao papilomavírus humano (HPV).....	26
2.5 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e câncer cervical (CC).....	31
2.6 Síndrome da imunodeficiência adquirida: considerações gerais e correlação com infecção pelo HPV/NIC.....	35
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	39
4.1 Desenho do estudo.....	39
4.2 Pacientes.....	39
4.2.1 Critérios de inclusão.....	40
4.2.2 Critérios de exclusão.....	40
4.3 Método.....	41
4.3.1 Teste de triagem sorológica para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	41
4.3.2 Exame histopatológico.....	41
4.3.3 Conização por cirurgia de alta frequência (CAF).....	42
4.3.4 Técnica de imuno-histoquímica.....	43
4.3.5 Avaliação microscópica das reações imuno-histoquímicas.....	51
4.4 Análise estatística.....	55
4.4.1 Cálculo amostral.....	55

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

4.4.2 Análise univariada.....	55
4.4.3 Análise multivariada.....	56
4.5 Considerações éticas.....	56
5 RESULTADOS.....	58
5.1 Primeira etapa de análise dos resultados.....	58
5.1.1 Caracterização das pacientes quanto à variável HIV.....	58
5.1.1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das pacientes estudadas quanto à variável HIV.....	58
5.1.1.2 Citologia, colposcopia e biópsia realizadas previamente à cirurgia de alta frequência (CAF) e resultado histopatológico da CAF das pacientes estudadas quanto à variável HIV.....	60
5.1.2 Caracterização das pacientes quanto à variável grau de NIC da CAF (NIC 2/3 e NIC 1)	62
5.1.2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das pacientes estudadas quanto à variável grau de NIC da CAF.....	63
5.1.2.2 Citologia, colposcopia e biópsia realizadas previamente à cirurgia de alta frequência (CAF) e resultado histopatológico da CAF das pacientes estudadas quanto à variável grau de NIC da CAF	64
5.2 Segunda etapa de análise dos resultados.....	65
5.2.1 Análise univariada do padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20 em relação à presença ou não do HIV.....	65
5.2.1.1 Contagem de células positivas para o marcador CD3 (linfócitos totais).....	65
5.2.1.2 Contagem de células positivas para o marcador CD4 (linfócito T)	65
5.2.1.3 Contagem de células positivas para o marcador CD8 (linfócito T)	66
5.2.1.4 Contagem de células positivas para o marcador CD56 (células <i>natural killer</i>).....	66
5.2.1.5 Contagem de células positivas para o marcador CD20 (linfócitos B).....	66
5.2.2 Análise univariada do padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20 em relação aos graus de neoplasia intraepitelial cervical	68

5.2.2.1 Contagem de células positivas para o marcador CD3 (linfócitos totais).....	68
5.2.2.2 Contagem de células positivas para o marcador CD4 (linfócito T)	69
5.2.2.3 Contagem de células positivas para o marcador CD8 (linfócito T)	69
5.2.2.4 Contagem de células positivas para o marcador CD56 (células <i>natural killer</i>).....	69
5.2.2.5 Contagem de células positivas para o marcador CD20 (linfócitos B).....	70
5.2.3 Avaliação de interação.....	74
5.2.4 Análise multivariada.....	74
5.2.4.1 Quanto ao <i>status</i> HIV.....	74
5.2.4.2 Quanto ao grau de NIC da CAF.....	76
6 DISCUSSÃO.....	79
6.1 Análise dos grupos de pacientes HIV-positivo e HIV-negativo quanto aos aspectos clínicos e epidemiológicos estudados.....	79
6.2 Análise dos marcadores CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20 em relação à presença do HIV e em relação ao grau de NIC	84
6.2.1 Considerações gerais.....	84
6.2.2 Técnica de imuno-histoquímica.....	85
6.2.3 Imunomarcador CD3.....	86
6.2.4 Imunomarcador CD4.....	87
6.2.5 Imunomarcador CD8.....	88
6.2.6 Imunomarcador CD56.....	92
6.2.7 Imunomarcador CD20.....	93
6.3 Considerações finais.....	95
7 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS E APÊNDICES.....	114

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino ainda é a segunda causa de morte por câncer na mulher em todo o mundo e a primeira em países em desenvolvimento. No Brasil, essa doença ocupa o segundo lugar, perdendo apenas para o câncer de mama, tratando-se, portanto, de importante problema de saúde pública (FRAZER, 2007).

O carcinoma de células escamosas do colo uterino desenvolve-se a partir das lesões precursoras, que são as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Apresenta, na maioria dos casos, evolução lenta e sua prevenção consiste em identificar, o mais precocemente possível, as lesões atípicas no epitélio do colo uterino por meio de exames como a citologia oncótica, histopatologia, além de métodos de biologia molecular para detecção do papilomavírus humano (HPV). E, por fim, tratamento indicado no momento certo (QUEIROZ, 2007; ZUR HAUSEN, 2009).

O agente etiológico específico e obrigatório dessas lesões cervicais é o HPV. Existem evidências epidemiológicas de que a infecção persistente por esse vírus, em especial dos tipos oncogênicos, desempenha papel preponderante na evolução dessas lesões para câncer cervical, caso não sejam efetuados detecção precoce e tratamento específico. No entanto, a elevada incidência da infecção sem manifestação clínica indica que a presença do HPV é necessária, mas não suficiente, para causar as neoplasias intraepiteliais e o câncer (BOSCH *et al.*, 2008; KOSHIOL *et al.*, 2008; PSYRRI; DIMAIO, 2008; WHEELER, 2008).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que mulheres imunocomprometidas são mais susceptíveis à persistência e progressão da infecção pelo HPV. Além disso, a incidência e o risco de recorrência das neoplasias intraepiteliais são mais altos nessas pacientes, demonstrando a importância dos mecanismos imunes sistêmico e local nesses eventos (NICOL *et al.*, 2008; STANLEY, 2009).

A introdução da terapia antirretroviral de alta potência (HAART) restabeleceu a imunidade sistêmica das pacientes soropositivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), reduzindo as várias infecções oportunistas, como toxoplasmose, citomegalovírus e herpes, e mudando significativamente o

prognóstico e as taxas de mortalidade dessas pacientes (GATES; KAPLAN, 2002). No entanto, paralelamente à maior sobrevida dessas pacientes, tem ocorrido aumento da incidência e prevalência das lesões HPV-induzidas (PALEFSKY, 2006). Essa observação de alta incidência das lesões, mesmo após restaurado o sistema imunológico dessas pacientes, requer melhor explicação e investigação quanto à resposta imune local cervical, em particular a imunidade mediada por células (celular) (KOBAYASHI *et al.*, 2002; PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005).

Revisando a literatura já existente relacionada à resposta imune cervical nas pacientes com neoplasias intraepiteliais, encontrou-se limitado número de artigos, principalmente em se tratando das pacientes soropositivas para o HIV. São pouquíssimos estudos sobre a caracterização da imunidade local comparando pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV.

Viu-se, então, a necessidade de mais investigações sobre o papel da resposta imune local do hospedeiro, dando continuidade ao que já foi realizado pela Dr^a. Juliana Zimmermann em sua tese de doutorado. Ela faz parte do nosso grupo de pesquisa e também avaliou a resposta imune local, a partir da qual quantificou e comparou as células de Langerhans ao longo do epitélio cervical e na área de lesão histopatológica em pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV. Neste estudo ampliou-se a pesquisa de células *natural killer* que compõem a imunidade inata e linfócitos T e linfócitos B, da imunidade adquirida ou específica. Por fim, comparar pacientes soropositivas para o HIV com as soronegativas parece ser uma boa estratégia para avaliar a influência do HIV na resposta imune local.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve histórico

O termo imunidade é derivado da palavra latina *immunitas*, que se refere à proteção contra processos legais que os senadores romanos tinham durante o seu mandato (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os historiadores acreditam que Tucídides, em Atenas, no século V a.C., foi quem primeiro usou o termo imunidade, referindo-se a uma infecção a que ele chamou de “peste” (hoje conhecida como peste bubônica). Mas é possível que o conceito de imunidade já existisse muito antes disso, como sugere o antigo costume chinês de estimular a imunidade das crianças contra a varíola, fazendo-as inalar pó feito das lesões cutâneas da pele de pacientes que estavam se recuperando da doença (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A imunologia é uma ciência relativamente nova. Historicamente, sua origem tem sido atribuída a Edward Jenner, que descobriu, em 1796, que a vacínia, ou varíola, induzia proteção contra varíola humana, uma doença frequentemente fatal. Jenner deu a esse procedimento o nome de vacinação. Ele levou à ampla aceitação desse método para conferir imunidade contra doenças infecciosas e a vacinação permanece sendo um método eficaz de prevenir infecções (JANEWAY JR. *et al.*, 2007).

2.2 Entendendo imunologia

As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas (microrganismos e macromoléculas como proteínas e polissacarídeos) é chamada de resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2005; JANEWAY JR. *et al.*, 2007).

A resposta imunológica pode ser do tipo inata ou natural e do tipo adaptativa ou adquirida. A inata consiste de mecanismos de defesa celulares e

bioquímicos preexistentes, que respondem de maneira rápida e inespecífica a qualquer substância estranha ou agente infeccioso, independentemente de um contato prévio. A resposta adaptativa é estimulada pela exposição a agentes infecciosos, cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com exposições posteriores a um mesmo microrganismo. Essa resposta caracteriza-se por ser específica em distinguir diferentes moléculas e ter a habilidade de se “lembrar” e responder com mais intensidade e rapidez a exposições subsequentes ao mesmo antígeno (ABBAS; LICHTMAN, 2005; FRAZER, 2007).

A resposta imune depende diretamente das células e de seus respectivos produtos que compõem o sistema imune. O início e o desenvolvimento da resposta imunológica adquirida requerem que os antígenos sejam capturados e apresentados a linfócitos específicos. Tal evento se dá a partir das chamadas células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais capturam os antígenos e apresentam-nos aos linfócitos (fase de ativação dos linfócitos), ocorrendo, então, a eliminação do antígeno (fase de eliminação do antígeno) (JANEWAY *et al.*, 2007).

As células do sistema imune originam-se na medula óssea e migram para os tecidos periféricos através do sangue e do sistema linfático, para exercerem suas funções. Todas as células sanguíneas derivam de uma única célula não diferenciada e pluripotencial, presente na medula óssea – célula-tronco hematopoiética pluripotente –, da qual se originam células progenitoras que constituem a base de diferentes linhagens celulares.

O progenitor linfoide comum é o que dá origem aos linfócitos T e B da imunidade adquirida e às células *natural killers* (NK) da imunidade inata. O progenitor mieloide é o precursor dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), macrófagos, células dendríticas e mastócitos do sistema imune inato e também aos megacariócitos e eritroblastos, que originam as plaquetas e eritrócitos, respectivamente (JANEWAY *et al.*, 2007).

Os linfócitos são os principais componentes da imunidade adquirida, sendo as únicas células capazes de reconhecer os antígenos proteicos de maneira específica. São divididos em duas subpopulações, T e B (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os linfócitos B, quando ativados, diferenciam-se em células plasmáticas (plasmócitos) secretoras de anticorpos. São responsáveis pela imunidade humoral, secretando anticorpos e tendo como principal alvo os microrganismos

extracelulares, eliminando-os (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os linfócitos T, que se dividem em linfócitos T citotóxicos (T CD8+) e linfócitos T auxiliares ou *helper* (T CD4+), são responsáveis pela imunidade celular. Eles apresentam especificidade restrita para antígenos ligados à superfície celular. Ou seja, reconhecem apenas peptídeos antigênicos ligados às proteínas do hospedeiro, que são codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O MHC é expresso nas superfícies das APCs e é dividido em tipo I e tipo II. Enquanto as moléculas do MHC I são ativadas por antígenos endógenos, as do MHC II são ativadas por antígenos exógenos. Os linfócitos T CD4+ reconhecem antígenos presentes no MHC II e os linfócitos T CD8+ reconhecem antígenos presentes no MHC I (ABBAS; LICHTMAN, 2005; STANLEY, 2006).

As APCs compreendem as células de Langerhans (CL), células dendríticas (DC), macrófagos e linfócitos B, sendo que as mais potentes são as CL e DC. Estas são capazes de internalizar antígenos exógenos e processá-los para serem apresentados aos linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BANCHEREAU *et al.*, 2000).

Em resposta à estimulação antigênica, os linfócitos T CD4+ secretam proteínas chamadas de citocinas, cuja função é estimular a proliferação e a diferenciação das células T, assim como outras células, incluindo linfócitos B, macrófagos e outros leucócitos. Os linfócitos T CD8+ destroem, de maneira direta, células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN, 2005; DIEFENBACH; RAULET, 2002).

O balanço entre vários sinais positivos e negativos é importante no desencadeamento e sucesso na resposta imune. Dependendo das citocinas liberadas, os linfócitos T CD4+ podem se diferenciar predominantemente em dois tipos: T-*helper* (Th) Th1 e Th2. Linfócitos T CD4+ tipo Th1 secretam principalmente interferon gama (IFN- γ), cuja função principal é estimular a defesa mediada por fagócitos contra as infecções, especialmente por microrganismos intracelulares. Já os linfócitos tipo Th2 secretam interleucina (IL-4, IL-5), cujas funções principais são estimular reações imunes mediadas por mastócitos/eosinófilos e imunoglobulina E (IgE) (processos alérgicos e parasitários), além de regular para baixo as respostas de Th1 (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MURPHY; REINER, 2002).

A células NK, chamadas de células matadoras naturais, consistem em uma terceira classe de linfócitos e não possuem receptores antígenos-específicos, sendo parte do sistema imune inato. São capazes de reconhecer e matar algumas células anormais, por exemplo, algumas células tumorais e células infectadas por vírus, por meio de mecanismos líticos diretos e pela secreção de IFN- γ . A capacidade tumoricida dessas células é aumentada pelas citocinas, incluindo interferons e interleucinas (IL-2 e IL-12) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Todas essas células da imunidade inata e adquirida, citadas nesta revisão, apresentam antígenos (CD) que são, em geral, complexos proteicos expressos na superfície das células imunológicas, funcionando como receptores das células e caracterizando-as. As duas funções mais comumente atribuídas às várias moléculas CD são estimulação e adesão intercelulares e transdução de sinais que levam à ativação dos linfócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os linfócitos B têm como marcador principal o CD20, altamente específico e sensível (ALVES *et al.*, 1999), que representa a maioria ou todos os linfócitos B (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Na linhagem T, a molécula proteica CD3 é um dos marcadores mais sensíveis e específicos para demonstração de diferenciação T (ALVES *et al.*, 1999), presente em todos os linfócitos T (marcador pan-T), incluindo os linfócitos Th, T regulatórios (Treg) e T citotóxicos. Os marcadores CD4 e CD8 são também marcadores de linfócitos T, sendo CD4 expresso em cerca de 60% das células T maduras CD3⁺, caracterizando os chamados linfócitos T auxiliares ou *Helper*, enquanto o CD8 é expresso em cerca de 30% das células T CD3⁺ (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; NEDERGAARD *et al.*, 2007), caracterizando os linfócitos T citotóxicos. O antígeno CD4 é também expresso nos linfócitos Treg, monócitos, macrófagos e DC (NEDERGAARD *et al.*, 2007), mas é possível distinguir os linfócitos T auxiliares das demais células CD4⁺. As células NK têm como marcador principal o CD 56.

2.3 Aspectos gerais da resposta imune no trato genital inferior

Uma importante barreira anatômica contra a invasão de patógenos no trato genital inferior é a mucosa que reveste a vagina e o colo uterino, que tem o seu próprio sistema imune local e que é definida por alguns autores como sistema

imune mucosal (KOBAYASHI *et al.*, 2000; STANLEY, 2003). O sistema imune prevê proteção do organismo contra ampla variedade de patógenos e tem importante papel na resposta do organismo às células neoplásicas. Ele integra as funções de vários tipos celulares e proteínas contra a invasão de patógenos (NICOL *et al.*, 2008).

O sistema imune mucosal apresenta importante característica, que é a presença dos tecidos linfoides associados à mucosa (MALT), também chamados de folículos linfoides, que têm grande importância na interação entre as APCs e os linfócitos T CD4+. Nesses folículos linfoides, as APCs expressam a porção do antígeno a ser reconhecida pelas células imunes e podem induzir a resposta imune com a ativação dos linfócitos T CD8+ e linfócitos B, ocorrendo, assim, a resposta imune efetiva (KOBAYASHI *et al.*, 2000).

A imunidade celular é a principal forma de defesa contra a infecção viral que afeta o trato genital inferior. Os linfócitos T CD4+, T CD8+, macrófagos e DC são frequentes no colo uterino e encontrados tanto no epitélio escamoso quanto no estroma da mucosa vaginal e colo uterino, de forma isolada ou em agrupamentos (folículos linfoides) (KOBAYASHI *et al.*, 2002; PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005). Os linfócitos T CD8+ são mais abundantes no epitélio, os T CD4+ no estroma e as CLs (tipo de DC) na camada basal do epitélio (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006). Estudos têm mostrado também que o colo uterino apresenta células nTregs dispersas no estroma, logo abaixo da membrana basal do epitélio (ADURTHI *et al.*, 2008; PIERSMA *et al.*, 2007).

O trato genital inferior, em seu estado normal, ou seja, na ausência de qualquer processo infeccioso, apresenta poucos linfócitos B e células NK. Observa-se, ainda, que os linfócitos T e as APCs são predominantes na zona de transformação (ZT), agindo como indutor e efetor da resposta imune celular. Na vagina normal há poucos linfócitos T e APCs (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Em amostras normais (não inflamadas), as células imunes, como linfócitos T CD4+ ($p=0,036$), T CD8+ ($p=0,001$) e DC ($p=0,0002$), são muito mais abundantes na mucosa ectocervical do que na vagina (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Células NK são encontradas na ZT de mulheres infectadas por HPV (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005) e no estroma cervical de pacientes com NIC. No entanto, células epiteliais imortalizadas pelo HPV 16 e linhagens de

células do carcinoma cervical são relativamente resistentes às células NK. As proteínas E6 e E7 do HPV 16 inibem a habilidade das células NK em produzir IFN em ensaios clínicos, sugerindo que a infecção pelo HPV poderia ser controlada pela resposta eficiente dessas células NK (LEE *et al.*, 2001).

Essa abundância de células inflamatórias no trato genital inferior faz com que essa região seja o maior portal para a infecção pelo HIV, ou seja, um sítio propício para replicação e disseminação do HIV (SHACKLETT, 2009).

2.4 Resposta imune ao papilomavírus humano (HPV)

A infecção pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum, com aproximadamente 75% dos adultos sexualmente ativos adquirindo um ou mais tipos de HPV genital durante toda a vida. A mais alta prevalência tem sido mostrada especialmente entre os indivíduos mais jovens (BOSCH *et al.*, 2008; PALEFSKY, 2006; SCHIFFMAN; KJAER, 2003; WEAVER, 2006; WHEELER, 2008).

Dos mais de 100 tipos de HPV descritos, cerca de 40 (SMITH *et al.*, 2007) infectam preferencialmente a mucosa anogenital, onde podem induzir o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais e do cancer (DE VILLIERS, 1997; ZUR HAUSEN, 1996; ZUR HAUSEN, 1999a).

A maior parte dessas infecções passa clinicamente despercebida, pois ocorre *clearance* do ácido desoxirribonucleico (DNA) do HPV num período que varia de quatro a oito meses, com exceção para os HPVs de alto risco, em que esse tempo pode se prolongar para oito a 12 meses (MUNOZ *et al.*, 2009; TROTTIER; FRANCO, 2006; ZUR HAUSEN, 1999b).

No entanto, a resposta imune pode falhar no *clearance* ou no controle da infecção, quando ocorre, então, a infecção persistente e, no caso dos HPVs de alto risco, aumenta-se a probabilidade de progressão para as NIC 2/3 e carcinoma invasor (BOSCH *et al.*, 2008; HO *et al.*, 1998; KOSHIOL *et al.*, 2008; LIAW *et al.*, 2001; MOSCICKI *et al.*, 2006; STANLEY, 2003; WEAVER, 2006; WHEELER, 2008).

O HPV é, portanto, o principal, se não o único, fator etiológico do câncer cervical, além de outros tipos de câncer anogenital e oral (PSYRRI; DIMAIO,

2008). Os subtipos 16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical (BOSCH *et al.*, 1995; BOSCH *et al.*, 2002; CLIFFORD *et al.*, 2003; HEBNER; LAIMINS, 2006; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006; MUNOZ; BOSCH; DE SANJOSE, 2003; WALBOOMERS *et al.*, 1999; ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 2002).

O desenvolvimento do câncer cervical e de suas lesões precursoras (NIC) está associado à integração do genoma do HPV - em especial dos de alto risco oncogênico – com o genoma da célula hospedeira (MUNGER *et al.*, 2004; SYRJANEN *et al.*, 2008; TRIMBLE *et al.*, 2010; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002; ZUR HAUSEN, 2009).

A resposta imune parece ter papel crítico e importante no controle da infecção pelo HPV (BONTKES *et al.*, 2000; KADISH *et al.*, 2002; MOSCICKI *et al.*, 2006; NICOL *et al.*, 2008; STEELE *et al.*, 2005). Ela pode ser sistêmica e local, sendo que a resposta imune local parece ser a mais importante, provavelmente devido ao fato de a infecção pelo HPV ser compartimentada, ou seja, restrita às células epiteliais (PALEFSKY, 2006).

Comparado a outros patógenos, o HPV é pobremente imunogênico devido a várias características estruturais e fisiológicas, como: a) o HPV é de dupla fita de DNA sem ácido ribonucleico (RNA) intermediário para invocar, de maneira rápida, resposta imune inata; b) durante a fase precoce da infecção, o HPV tem a capacidade de passar despercebido pelas próprias células infectadas a partir da produção de proteínas não segregadas; c) inicialmente, as células infectadas pelo HPV são as das camadas mais profundas do epitélio (epitélio basal), que são menos acessíveis ao sistema imune; d) o HPV infecta somente células da pele e mucosa e não induz a morte das mesmas, o que é necessário para efetiva inflamação; e) a apresentação do antígeno (HPV) no âmbito sistêmico é limitada. Como resultado de todas essas características, o HPV é especialista em escapar da detecção imunológica do hospedeiro, induzindo somente resposta imune pobre e lenta (DOOBAR, 2005; DUNN *et al.*, 2002; FRAZER, 2007; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004; STANLEY, 2009).

O HPV infecta a camada basal de células do epitélio escamoso do colo uterino através de microfissuras do epitélio superficial (GUZMÁN-ROJAS *et al.*, 1998; ROBERTS *et al.*, 2007) e todos os subsequentes eventos de replicação e maturação viral ocorrerão no interior das células epiteliais, no sentido base-

superfície (DOOBAR, 2005; DUNN *et al.*, 2002). No entanto, todo esse processo acontece sem que haja efetivo processo inflamatório, que é um sinal de alerta imprescindível para ativar o sistema imune inato. Além disso, não há, ou há pouca, viremia propriamente dita, devido ao fato de todas as etapas do ciclo de vida do HPV ocorrerem exclusivamente no interior das células e, portanto, é pobre a drenagem para os linfonodos regionais, que é onde se inicia a resposta imune adaptativa (STANLEY, 2009).

Ambas as respostas imunes - humoral (BONTKES *et al.*, 1999) e celular (SCOTT; NAKAGAWA; MOSCICKI, 2001) - desempenham papel no controle da infecção pelo HPV. A imunidade humoral não é a que prediz a regressão espontânea da NIC (MATSUMOTO *et al.*, 2006), enquanto a imunidade celular correlaciona-se com bom prognóstico clínico (SARKAR *et al.*, 2005).

Ambas as respostas, imune inata e adaptativa, são mobilizadas para reconhecer a infecção pelo HPV e eliminar as células infectadas através das células imunes e citocinas. A primeira linha de defesa, a resposta inata, origina-se no estroma logo abaixo do epitélio. Essa resposta inespecífica é verificada num primeiro contato, mediado por vários mecanismos, incluindo indução de IFN, ativação de macrófagos e células NK, levando à ativação de resposta imune mais específica (SAHEBALI *et al.*, 2010; UTHAISANGSOOK *et al.*, 2002).

Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e as células NK são os principais efetores na erradicação das células infectadas por vírus. Esses linfócitos apresentam grânulos citotóxicos que contêm produtos líticos chamados granzimes, em especial granzime B, que é um grupo de proteases que levam à lise celular (JENNE; TSCHOPP, 1988; LICHTENHELD *et al.*, 1988).

Em determinadas infecções bacterianas e virais associadas a estímulos inflamatórios potentes, os linfócitos T CD8⁺ podem ser ativados pelas DCs sem a participação de linfócitos T CD4⁺. Em infecções pelo HPV, em razão da ausência de inflamação significativa, a participação dos linfócitos T CD4⁺ na ativação dos linfócitos T CD8⁺ é de fundamental importância. Após serem devidamente estimulados e ativados pelas DCs, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ iniciam sua expansão clonal e migram para o local de agressão, onde desempenham seus papéis na tentativa de erradicar o agente agressor. Alguns desses linfócitos passarão a ter características de células de memória, importantes em novas exposições ao mesmo antígeno (MACIAG, 2005).

Durante a infecção pelo HPV, no entanto, alterações no epitélio podem levar à ineficiente resposta contra esse vírus. Um exemplo é a diminuição significativa das CLs em tecidos infectados pelo HPV 16 - especialmente nos casos das lesões de alto grau e câncer cervical. E a significativa diminuição dessas células no epitélio pode levar o sistema imune a ignorar a presença do vírus (LEHTINEN *et al.*, 1993, MATTHEWS *et al.*, 2003).

Há estudos mostrando que a infecção genital pelo HPV é associada à deficiência da resposta Th1 e à produção de citocinas tipo 2 (Th2 - imunossupressoras). A resposta Th1 é responsável pelo *clearance* do HPV e pela regressão das NICs (CLERICI *et al.*, 1997; KADISH *et al.*, 1997).

A resposta imune celular à infecção pelo HPV tem sido intensamente investigada, mas não completamente esclarecida. A importância da imunidade celular no controle dessa infecção é demonstrada por estudos que ressaltam que a maioria das mulheres acima de 30 anos tem testes para detecção de HPV negativos e somente reduzida proporção de mulheres saudáveis apresenta neoplasia cervical, particularmente NIC 2/3, e câncer. Tal fato é presumivelmente devido à efetiva resposta imune celular ao HPV (PALEFSKY, 2006; SCHIFFMAN, 1992). Outras pesquisas revelam que pacientes com imunossupressão iatrogênica, como as transplantadas renais e infectadas pelo HIV, têm alta incidência de HPV e lesões cervicais (BENTON *et al.*, 1996; PALEFSKY; GILLISON; STRICKLER, 2006; SCOTT; NAKAGAWA; MOSCICKI, 2001; STANLEY, 2009). Similarmente, pacientes infectadas pelo HIV têm aumento da prevalência de infecção pelo HPV na região anogenital, além de mais persistência dos HPVs de alto risco, resultando em elevada incidência de NIC 2/3, com lesões mais persistentes e prolongadas comparadas às não infectadas pelo HIV (COLEMAN *et al.*, 1994; KOSHIOL *et al.*, 2006; MOSCICKI *et al.*, 2004a; MOSCICKI *et al.*, 2004b; SCOTT; NAKAGAWA; MOSCICKI, 2001).

Estudo de De Jong *et al.* (2002) em pacientes com câncer cervical demonstrou que a resposta imune celular (linfócitos T CD4+) específica aos antígenos precoces E2 e E6 do HPV 16 foi prejudicada, sugerindo possível explicação para o desenvolvimento desse câncer. Os autores especularam que esses linfócitos T CD4+ (T *helper*) são imprescindíveis na resposta imune para se evitar a persistência da infecção pelo HPV. Esses achados foram confirmados por estudos anteriores (COLEMAN *et al.*, 1994).

Outros autores associaram regressão das verrugas HPV-induzidas com a resposta desses mesmos linfócitos T CD4+ ao antígeno E6 do HPV (ARANY *et al.*, 1999). O exame histológico de verrugas genitais em processo de regressão revela largo infiltrado de linfócitos T (CD4+ e CD8+), monócitos, macrófagos e granulócitos, no epitélio e estroma (COLEMAN *et al.*, 1994; HILDERS *et al.*, 1993). Outro trabalho que acompanhou mulheres com citologia de baixo grau, sem intervenção prévia, salientou evidente resposta imune mediada pelos linfócitos T específica ao HPV 16, com liberação de IL-2, em que ocorreu frequente regressão das lesões (DE JONG *et al.*, 2002). E, ainda, boa resposta tipo Th1 contra as proteínas E2 e E6 do HPV 16 tem sido detectada em indivíduos saudáveis (WELTERS *et al.*, 2003).

Interessante aspecto é que a maioria das lesões malignas do colo uterino associadas a infecções por HPV ocorre na ZT do epitélio do colo uterino. A causa dessa preferência não é totalmente conhecida. Sabe-se da existência, nessa região, das células imaturas que são mais predisponentes à ação do vírus, mas é provável que fatores imunológicos nesse local contribuam para essa associação. A densidade de CL na ZT é naturalmente reduzida se comparada com a exocérvice, além da expressão de IL-10 (citocina imunossupressora) ser mais abundante na ZT. A quimiocina MIP3- α , que é importante na atração de CLs imaturas para o epitélio, também apresenta expressão reduzida na ZT. Por outro lado, a expressão de TNF- α , que estimula a migração de CL do epitélio mediante redução da expressão de E-caderina, está aumentada na região da ZT. Resultados semelhantes aos observados para a ZT foram descritos em epitélios oriundos de NIC 2/3 e NIC 1 (GIANNINI *et al.*, 2002).

Essas observações enfatizam a importância da resposta imune celular no controle da infecção por HPV e das lesões a ele relacionadas, estimulando uma série de estudos sobre a resposta imune contra antígenos de HPV em pacientes saudáveis, infectadas pelo vírus e com lesões malignas causadas pelo HPV. Há muitas evidências clínicas de que existe resposta imune efetiva contra a infecção pelo HPV e o desenvolvimento das lesões induzidas por este vírus, levando à regressão destas (NICHOLLS *et al.*, 2001; SELVAKUMAR *et al.*, 1997).

2.5 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e câncer cervical (CC)

Em âmbito mundial, o câncer cervical é o segundo mais comum na mulher, superado apenas pelo câncer de mama (BOSCH; DE SANJOSÉ, 2003; FRANCO; HARPER, 2005; FRAZER, 2007; ZUR HAUSEN, 2002).

A estimativa de câncer cervical no Brasil, para o ano de 2010, pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), foi de 18.430 novos casos/ano, com taxa bruta de 18,47 por 100.000 mulheres, representando o segundo lugar em incidência de câncer, após câncer de mama.

O câncer de colo uterino é precedido pelas NICs, chamadas também de lesões pré-neoplásicas, nas quais se encontram atipias e desarranjo das células escamosas, limitada ao epitélio escamoso. E estas estão associadas à infecção pelo HPV (QUEIROZ, 2007; ZUR HAUSEN, 2009).

Reagan e Harmonic (1956) classificaram essas lesões precursoras do câncer cervical de displasias em leve, moderada e acentuada, conforme o comprometimento da espessura do epitélio em seu terço inferior apenas, terço inferior/médio e terço inferior/médio/superior (toda espessura do epitélio), respectivamente.

Nova classificação foi proposta por Richart (1973), denominando-as de NIC e dividindo-as em três grupos:

- NIC 1: as amostras teciduais que apresentavam, histologicamente, perda de polaridade celular, ausência de estratificação epitelial normal, hiperplasia da camada basal e que não excedeu 1/3 da espessura do epitélio.
- NIC 2: as amostras teciduais cuja perda da polaridade celular, falta da normal estratificação epitelial e hiperplasia da camada basal não excederam 2/3 da espessura do epitélio.
- NIC 3: as lesões que apresentavam mais de 2/3 do epitélio acometido por células com pleomorfismo acentuado, cromatina granulosa e nucleomegalia acentuada.

A redução na incidência de câncer e de NIC em modelos animais submetidos à imunoterapia foi observada por alguns autores, sugerindo o controle da infecção pelo sistema imune (DANIEL *et al.*, 2005). Outros autores, por sua

vez, relataram falha da resposta imune em controlar a infecção e prevenir a progressão neoplásica, com registros de anormalidade do sistema imune e comprovação de que o microambiente tumoral também pode ser capaz de suprimir o sistema imune, controlando a progressão da infecção (FERNANDES *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2004).

Essas lesões pré-neoplásicas e o câncer cervical iniciam-se na ZT, uma região delimitada pela mucosa glandular e pela mucosa escamosa original do colo uterino, onde células metaplásicas imaturas se alteram devido à associação de fatores como agentes oncogênicos, distúrbios imunológicos e outros, encontrados principalmente em grupos epidemiológicos específicos (FREGA *et al.*, 2003; SCHIFFMAN *et al.*, 2000; WRIGHT JR.; SCHIFFMAN; 2003). O primeiro estágio de desenvolvimento é a NIC, cujas células neoplásicas estão restritas ao epitélio escamoso e não ultrapassaram a membrana basal. Podem regredir, persistir ou progredir para o câncer invasivo, o que acontece em aproximadamente 1 a 3% dos casos (MICHELIN *et al.*, 2008).

Cerca de 90% das neoplasias intraepiteliais grau 1 (NIC 1), segundo alguns estudos (MOSCICKI *et al.*, 2006), podem regredir espontaneamente e isso é atribuído ao fato de que muitas dessas lesões de baixo grau são induzidas pelos tipos de HPV de baixo risco oncogênico e à resposta imune celular (NICHOLLS *et al.*, 2001; SELVAKUMAR *et al.*, 1997). Nos condilomas em regressão, pode ser encontrado infiltrado de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos, o que demonstra, de maneira geral, resposta imune protetiva tipo Th1 contra as infecções virais (HARARI *et al.*, 2006; MATLOUBIAN; CONCEPCION; AHMED, 1994; WALTER *et al.*, 1995).

As neoplasias intraepiteliais grau 2 e 3 (NIC 2/3) são as de mais risco para evoluir para câncer invasor se não forem tratadas (ZUR HAUSEN, 2000), em que mais de 12% das NIC 3 progridem para o câncer se não tratadas (MELNIKOW *et al.*, 1998; OSTOR, 1993; QUEIROZ, 2007). Alguns autores, contudo, têm evidenciado que aproximadamente 35% das NICs 2/3 associadas a todos os outros tipos de HPV, que não o 16, regredem em torno de quatro a seis meses, sendo que nas associadas ao HPV 16 a taxa de regressão cai para 25% (MELNIKOW *et al.*, 1998; TRIMBLE, 2005; TRIMBLE, 2010).

Algumas pesquisas referem que, tanto nas pacientes imunocompetentes quanto nas imunocomprometidas, o grau de regressão das NIC 1 e NIC 2/3 é

maior quando induzidas pelos HPV de baixo risco, em comparação com as induzidas pelos HPVs de alto risco oncogênico (NOBBENHUIS *et al.*, 2001; SCHUMAN *et al.*, 2003).

Em indivíduos imunocompetentes, o desenvolvimento da infecção pelo HPV e as neoplasias intraepiteliais cervicais grau 1 são muitas vezes reversíveis e o *clearance* do HPV e a regressão das NICs quase sempre ocorrem (SCHIFFMAN; KJAER, 2003). Por exemplo, mais de 90% das infecções pelo HPV 16 incidentes e prevalentes em mulheres imunocompetentes regredem espontaneamente em cinco anos sem tratamento algum, o mesmo não ocorrendo nas mulheres com vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) (KOSHIOL *et al.*, 2006; RICHARDSON *et al.*, 2005).

Além disso, foi demonstrada (LILLO *et al.*, 2005; PALEFSKY *et al.*, 1999) a diferente prevalência dos diversos genótipos de HPV quando se comparam mulheres imunocompetentes com imunossuprimidas, ou seja, a prevalência do HPV 18 aumenta de 15 a 18% para 80%, enquanto a do HPV 16 é similar entre as duas categorias. Isso sugere que a relevância do sistema imune intacto em clarear a infecção do HPV pode diferir entre os diferentes genótipos, ou seja, estes podem ser dotados de diferentes imunogenicidades e podem, diferentemente, induzir imunidade viral.

A ativação da resposta imune do hospedeiro, portanto, parece exercer papel central na resolução da infecção pelo HPV e, conseqüentemente, das lesões de colo e trato anogenital associadas ao HPV. A regressão espontânea ou induzida por tratamento das NICs é, provavelmente, mediada pelo sistema imune celular, particularmente linfócitos T CD4⁺ tipo 1 (Th1) e macrófagos (CLARKE; CHETTY, 2002). Por outro lado, a resposta imune frequentemente falha na prevenção das lesões (PINZON-CHARRY *et al.*, 2005). Enquanto detalhes dessa resposta imune permanecem incertos, há evidências da contribuição dos linfócitos Th (T CD4⁺), T citotóxicos (T CD8⁺) e mecanismos da resposta imune inata (FRAZER, 2004).

A ativação dos linfócitos T focam principalmente as oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, que reconhecem essas proteínas precoces do HPV-16 e 18, têm sido ressaltados entre os linfócitos, infiltrando tumor cervical (NILGES *et al.*, 2003; OERKE *et al.*, 2005; PIERSMA *et al.*, 2008).

Seguindo essa linha, há estudos que reportam que o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas HPV-induzidas e o câncer cervical está associado a defeito na imunidade contra as oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 (DE JONG *et al.*, 2004). Para o HPV 18, diferentes resultados têm sido obtidos em pacientes com NIC 2/3 e câncer cervical. Embora defeitos na imunidade de células T CD4+ contra a oncoproteína E6 dos HPVs 18 tenham sido descritos em pacientes com câncer cervical (WELTERS *et al.*, 2003), outros autores (SERESINI *et al.*, 2007) enfatizaram a presença de células T CD4+ no sangue da vasta maioria de pacientes com NIC 2/3 HPV18+ e, interessantemente, em cerca de 50% do total de pacientes testadas consecutivamente, independentemente do tipo de HPV encontrado. Quando comparada a resposta das células T CD4+ entre pacientes HPV18+ e HPV18-, foi encontrada relação inversa entre a presença do vírus e a intensidade da resposta. Levantou-se a hipótese de que a frequência de HPV 18 pode ser mais significativa do que o que é descrito, tendo sido clareado em uma porção de mulheres infectadas e com doença cervical, graças a essa boa resposta das células T CD4+ ao antígeno E7 desses HPVs.

A resposta imune celular tem importante papel no controle das neoplasias HPV-induzidas. Estas são normalmente transientes e, presumivelmente, regredem como resultado da resposta imune celular (COLEMAN *et al.*, 1994; STANLEY *et al.*, 2003). Observa-se infiltrado de células consistido de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, monócitos, macrófagos e granulócitos (HILDERS *et al.*, 1993). O infiltrado de linfócitos expressa a ativação de marcadores, com liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL12, TNF- α e IFN- γ , caracterizando resposta imune mediada por células do tipo Th1 (STANLEY *et al.*, 2003).

Segundo alguns estudos, nas lesões pré-neoplásicas do colo uterino há diminuição das CLs (HUBERT *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 1999; ZIMMERMANN, 2008). Paralelamente, tem sido mostrado que os linfócitos T CD4+ e T CD8+ são mais frequentes nas NIC grau 2/3 comparado com colo normal, que pode ser indicativo de aumento da atividade imune local (JACOBS *et al.*, 2003). Os linfócitos T CD4+ predominam no estroma logo abaixo da lesão e os T CD8+ predominam no epitélio displásico (KOBAYASHI *et al.*, 2000).

Piersma *et al.* (2007) acreditam que baixos infiltrados de linfócitos T CD3+ e T CD8+ têm sido reportados como sendo marcadores preditivos de doença progressiva do câncer cervical e colorretal (PIERSMA *et al.*, 2007).

Outros estudos sugerem que as células NK podem estar criticamente envolvidas na regulação do crescimento tumoral em modelo animal. Em homens, tem sido destacado que a atividade dessas células NK é deficiente em paciente com tumor avançado (SELTZER; DOYLE; KADISH, 1983).

2.6 Síndrome da imunodeficiência adquirida: considerações gerais e correlação com infecção pelo HPV/NIC

A AIDS, causada pelo HIV, pode, hoje, após mais de 20 anos de sua identificação, ser considerada a maior pandemia do século XXI, com aproximadamente 46 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo que, deste contingente, 50% são mulheres. A maioria dos infectados vive em países do Terceiro Mundo. No Brasil, existem cerca de 600.000 indivíduos infectados pelo HIV, na faixa etária de 15 a 49 anos (LEWI *et al.*, 2003; UNAIDS, 2007).

As mulheres têm significativamente mais risco de adquirir o HIV heterossexualmente que os homens (UNAIDS, 2007). É crescente o aumento da incidência entre mulheres, tendo a proporção entre homens e mulheres infectados reduzido de 20:1 no início da epidemia para números próximos de 2:1 (BRASIL, 2004; LEWI *et al.*, 2003; UNAIDS, 2004).

Há mais ou menos uma década instituiu-se a HAART, que mudou a história da infecção pelo HIV. Com o advento dessas terapias, houve mudanças de morbidade e mortalidade entre os indivíduos portadores do HIV. De maneira geral, além de contribuir para a eliminação de infecções oportunistas, afetou a incidência das neoplasias relacionadas à AIDS (PALEFSKY, 2006). O uso da HAART resulta rápida redução do HIV e reconstituição da taxa sistêmica de linfócitos T CD4+.

A infecção pelo HIV entre as mulheres incide principalmente entre a população sexualmente ativa, o que estabelece margem para a coinfeção por HPV. Estudos como o *Women's Interagency HIV Study* (WIHS), que analisou 2.015 mulheres HIV positivo e 577 controles negativos pareados, demonstrou incidência de 58% de mulheres coinfectadas comparadas com 26% de mulheres positivas para o HPV entre as soronegativas para o HIV ($p=0,02$). O estudo realçou, também, que entre as mulheres soropositivas para o HIV ocorre aumento

da prevalência de infecção pelo HPV bem como alta incidência dos tipos 16 e 18 (LEVI *et al.*, 2004; LYONS; PRENDIVILLE; MULCAHY, 2003).

Vários autores já descreveram a associação entre essas duas infecções virais, relacionando o aumento da expressão da infecção pelo HPV e da NIC entre as mulheres soropositivas para o HIV (AHDIEH *et al.*, 2000; AHDIEH *et al.*, 2001; DUERR *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 1995). E ainda, mais alta prevalência da persistência do HPV e das neoplasias intraepiteliais cervicais nessas mulheres (BALLAS *et al.*, 1990; CARDILLO *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2004).

Há poucos dados que sugerem o efeito direto do HIV na patogênese das neoplasias associadas ao HPV, mas a atenuação que a infecção pelo HIV causa na resposta imune ao HPV permite a persistência das neoplasias intraepiteliais grau 2/3 por mais tempo, o que é importante para a progressão ao câncer cervical (PALEFSKY; GILLISON; STRICKLER, 2006), fazendo com que a incidência das lesões precursoras e do próprio câncer cervical seja mais alta entre as mulheres soropositivas para o HIV, comparadas às soronegativas (FRISCH *et al.*, 2001; HOOTS *et al.*, 2009; PALEFSKY, 2003).

A resposta imune local pode ser especialmente importante, mas de difícil avaliação. Estudos documentaram que o número de CLs está diminuído nas lesões cervicais (NICs) de mulheres soropositivas para o HIV comparadas às soronegativas (LEVI *et al.*, 2005; ZIMMERMANN, 2008). Kobayashi *et al.* (2004) informaram que, nas NICs de mulheres soropositivas para o HIV, a densidade de células imunes (linfócitos T CD4+, macrófagos, neutrófilos e células *natural killer*) e expressão do IFN- γ foram significativamente diminuídas comparado com as NICs de mulheres soronegativas.

As citocinas regulatórias também estão diminuídas nas mulheres soropositivas para o HIV. A análise desses dados indica que a resposta inflamatória está diminuída nas NIC 2/3 das mulheres soropositivas para o HIV (KOBAYASHI *et al.*, 2004; NICOL; FERNANDES; BONECINI-ALMEIDA, 2005).

Não se sabe se no trato genital inferior a coinfeção HPV-HIV afeta a resposta imune do tipo Th1 e Th2 e em que extensão contribui para o aparecimento das NICs (NICOL; FERNANDES; BONECINI-ALMEIDA, 2005).

Na literatura há registros de que a progressão da infecção pelo HIV para AIDS tem sido associada à predominância do perfil de resposta Th2

(imunossupressora) na secreção vaginal, o que contribui para a persistência da infecção pelo HPV (GIANNINI *et al.*, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar a resposta imune celular local pela expressão de linfócitos T (T CD3+, T CD4+, T CD8+), células NK (CD 56+) e linfócitos B (CD 20+), no estroma cervical das pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, portadoras de neoplasia intraepitelial cervical grau 2/3 e grau 1 (NIC 2/3 e NIC 1).

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão de linfócitos T (T CD3+, T CD4+, T CD8+), células NK (CD 56+) e linfócitos B (CD 20+) no estroma cervical, entre as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV.
- Comparar a expressão dessas mesmas células, no estroma cervical, entre os grupos de NIC 2/3 e NIC 1.

4 PACIENTES E MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal realizado a partir de peças de conização do colo uterino apresentando neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grau 1 e grau 2/3, de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV.

Este estudo tem como variáveis resposta ou dependente: *status* HIV e o grau de lesão; e como variáveis explicativas ou independentes: idade, paridade, idade de início da atividade sexual, tabagismo, citologia, colposcopia, biópsia pré-CAF e os marcadores imunológicos: CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20.

4.2 Pacientes

Foram analisados blocos parafinados, pós-conização, de 85 pacientes, entre estas, 47 pacientes soropositivas para o HIV e 38 soronegativas para o HIV.

As pacientes soropositivas para o HIV fazem parte do Programa Multicêntrico para Controle e Prevenção das Lesões Cervicais de Alto Grau e do Câncer Cérvico-Uterino em Mulheres Portadoras do HIV. Esse Programa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) em 2002 e 2007. Estas pacientes são do Setor de Ginecologia do Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz (CTR-DIP Orestes Diniz).

As pacientes soronegativas para o HIV são oriundas do Posto de Atendimento (PAM) da Sagrada família – Serviço de Patologia do Colo, da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Prefeitura de Belo Horizonte (CEP/PBH) em 2008.

Todas as pacientes foram submetidas à CAF, no período de janeiro de 1999 a maio de 2004, por apresentarem algum grau de NIC à biópsia.

Todos os blocos de parafina das 85 pacientes foram obtidos a partir do levantamento de seus números de registro no PAM Sagrada Família, onde elas foram submetidas à CAF. As peças parafinadas que foram encontradas em estoque nos laboratórios de anatomia patológica foram recrutadas para o presente estudo. Tais blocos foram, então, encaminhados ao laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), que tem como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Eddie F.C. Murta e Prof^a. Dr^a. Márcia A. Michelin, para serem estudados pela técnica de imuno-histoquímica para detecção de marcadores imunocelulares como CD3, CD4, CD8, CD20 e CD56.

Para esta pesquisa, foi aprovado um adendo ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Programa Multicêntrico para Controle e Prevenção das Lesões Cervicais de Alto Grau e do Câncer Cérvico-Uterino em Mulheres Portadoras do HIV, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG) em 2002 (COEP 089/02), que permite que as pacientes que já fazem parte do Programa Multicêntrico possam também fazer parte do presente estudo (APÊNDICE B).

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos blocos de parafina de pacientes soropositivas para o HIV e de pacientes soronegativas para o HIV submetidas à CAF. Algumas pacientes apresentavam mais de um bloco parafinado e, nestes casos, foi escolhido o bloco com lesão de mais gravidade.

4.2.2 Critérios de exclusão

Excluíram-se os blocos parafinados que não continham material suficiente para o estudo histopatológico e imuno-histoquímico.

4.3 Método

4.3.1 Teste de triagem sorológica para o vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Todas as pacientes incluídas neste estudo possuíam teste sorológico positivo ou negativo para o HIV.

4.3.2 Exame histopatológico

Como parte do protocolo de atendimento do ambulatório, todas as pacientes atendidas eram submetidas à colheita da citologia oncótica e colposcopia. Em caso de alguma alteração colposcópica, realizava-se a biópsia dirigida da área alterada.

A histopatologia foi baseada no critério morfológico arquitetural e celular, sendo considerada o padrão-ouro de diagnóstico morfológico.

A descrição histopatológica das biópsias pré-CAF foi baseada na classificação de Richart, que reúne as lesões intraepiteliais escamosas em um grupo denominado NIC subdividido em NIC 1, 2 e 3, conforme o grau de lesão (QUADRO 1).

QUADRO 1 - Equivalência de nomenclaturas citológicas e histológicas das lesões pré-invasivas do câncer cervical uterino

Classificação citológica de Papanicolau	Classificação Internacional de Doenças (OMS, 1952-1973)	Classificação de Richart (1968)	Classificação citológica pelo Sistema de Bethesda (1989)	Proposta de classificação histológica análoga ao Sistema Bethesda (Richart, 1990; 2001)
Classe I	-		Normal	-
Classe II	-		Alterações benignas	-
	Displasia leve	NIC I	LSIL	NIC de baixo grau
Classe III	Displasia moderada	NIC II	HSIL	NIC de alto grau
	Displasia acentuada	NIC III	HSIL	NIC de alto grau
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>			
Classe V	Câncer	Câncer	Câncer	Câncer

Fonte: Wright, Kurman e Ferency (2002).

Portanto, as pacientes incluídas neste estudo foram aquelas que tiveram alteração colposcópica, foram submetidas à biópsia do colo, apresentaram algum grau de lesão e foram submetidas à cirurgia de conização de alta frequência (CAF).

4.3.3 Conização por cirurgia de alta frequência (CAF)

Todas as pacientes foram submetidas à CAF no bloco cirúrgico do PAM Sagrada Família, com o porte de pequena cirurgia, no período de 1999 a 2004, por apresentarem biópsia compatível com NIC 1, 2 ou 3. A maioria das biópsias com resultado NIC 1 fazia parte do grupo de mulheres infectadas pelo HIV, visto que, pelo protocolo de atendimento do ambulatório de ginecologia do CTR-DIP Orestes Diniz, mesmo as lesões NIC 1 eram submetidas à CAF.

O aparelho utilizado para a CAF foi o *Wavetronic* 2000 acoplado ao aspirador de fumaça. Em todo o procedimento era retirada a junção

escamocolunar (JEC), com a preocupação de obter-se margem endocervical negativa para a neoplasia.

O material obtido era introduzido em frasco contendo solução de formaldeído a 10%, com volume correspondendo a pelo menos 10 vezes o volume do espécime cirúrgico.

A seguir, o frasco era enviado para o laboratório, onde era incluído em um ou mais blocos de parafina, para posterior exame.

4.3.4 Técnica de imuno-histoquímica

Os blocos de parafina das 85 pacientes selecionadas foram encaminhados para o laboratório do IPON, da UFTM, para serem submetidos à técnica de imuno-histoquímica.

Foram realizados 20 cortes de cada bloco, em micrótomo, de 4 μ m cada e esses cortes foram montados em lâminas silanizadas para a realização da técnica de imuno-histoquímica. Nesse laboratório, as lâminas foram codificadas para que o observador não soubesse a origem das pacientes, ou seja, se eram de pacientes soropositivas ou soronegativas para o HIV, em qualquer das fases do estudo.

FIGURA 1 – Micrótomo.



Os anticorpos utilizados estão descritos a seguir:

- **Anticorpo antiCD3** (*Monoclonal Mouse Antibody*), marca Novocastra™ (*LeicaBiosystems Newcastle*), clone LN10. Código do produto (NCL-L-CD3-565). **Diluição de 1:200** (1 µL de Ac CD3 para 200 µL de BSA 0,1%). A escolha dessa diluição foi feita após testes prévios realizados em tonsila com diluições de 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000.
- **Anticorpo antiCD8** (*Monoclonal Mouse Antibody*), marca Novocastra™ (*LeicaBiosystems Newcastle*), clone 1A 5. Código do produto (NCL-L-CD8-295). **Diluição 1:150**. A escolha dessa diluição foi feita após testes prévios realizados em tonsila, com diluições de 1:40, 1:150, 1:200 e 1:400.
- **Anticorpo antiCD56** (*Monoclonal Mouse Antibody*), marca Novocastra™ (*LeicaBiosystems Newcastle*), clone 1B6, código do produto NCL-L-CD56 – 1B6, Lot. 6004431. **Diluição 1:200**. A escolha dessa diluição foi feita após testes prévios realizados em tonsila, com 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000.
- **Anticorpo antiCD4** (*Monoclonal Mouse Antibody*), marca Novocastra™ (*LeicaBiosystems Newcastle*), clone 4B12, código do produto NCL-L-CD4-368, Lot. 6002825. **Diluição 1:30**. A escolha dessa diluição foi feita após testes prévios realizados em tonsila, com 1:20, 1:40 e 1:200.
- **Anticorpo antiCD20** (*Monoclonal Mouse Antibody*), marca Novocastra™ (*LeicaBiosystems Newcastle*), clone 7D1, código do produto NCL-CD20-7D1, Lot.6003001. **Diluição 1:500**. A escolha dessa diluição foi feita após testes prévios realizados em tonsila, com 1:100, 1:500 e 1:1000 (ANEXO B).

FIGURA 2 – Frasco com anticorpo CD3



A técnica utilizada foi padronizada pelo Laboratório do IPON, da UFTM, e encontra-se descrita a seguir (ANEXO C). O preparo das soluções utilizadas na técnica está no APÊNDICE A.

Como controle interno positivo e negativo das reações, utilizaram-se cortes de tonsila. Foram empregados também, como controle externo, cortes de tonsila já previamente corados com o anticorpo em questão.

A – Preparação dos cortes histológicos: esse procedimento consiste na desparafinização e hidratação dos cortes histológicos. A desparafinização foi realizada deixando as lâminas na estufa a 37°C em *overnight* e, a seguir, a 60°C por 60 min. Após, mergulharam-se as lâminas em xilol aquecido por 10 minutos, dois banhos em xilol à temperatura ambiente por três minutos cada e, depois, um banho em xilol 50% (50 mL de xilol e 50 mL de álcool absoluto) por três minutos. A hidratação dos cortes foi realizada fazendo-se banhos das lâminas em álcool, sendo três banhos em álcool absoluto, um em álcool a 95%, um em álcool a 80% e um em álcool a 70%, de três minutos cada. Depois, lavou-se em água corrente e água destilada.

FIGURA 3 – Estufa a 60°



FIGURA 4 – Processo de hidratação dos cortes em álcool



B – Recuperação ou reativação antigênica: a escolha do método de reativação antigênica seguiu as normas preconizadas pelos fabricantes de cada anticorpo usado. A solução tampão a ser utilizada também dependeu de qual anticorpo primário estava sendo trabalhado, conforme bula e padronização realizada (ANEXO B). Para os anticorpos antiCD3, antiCD8 e antiCD20 foi utilizado o tampão de citrato pH 6,0 (ácido cítrico mono-hidratado) e para os anticorpos antiCD4 e antiCD56, o tampão etilenodiaminotetracetatodossódico (EDTA). As lâminas foram incubadas na solução tampão, previamente aquecido em forno de micro-ondas por 1 minuto, em pequenas jarras de Couplin. Estas foram levadas para a panela de pressão a vapor, da marca Pascal, e deixadas por seis minutos, à temperatura de 98°C. Após isto, foram retiradas e deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos para esfriar e passar por lavagem rápida em solução tampão *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2-7,4, o qual forneceu às lâminas pH mais adequado.

FIGURA 5 – Lâminas em solução tampão:
jarra de Couplin



FIGURA 6 – Panela de pressão Pascal



C – Bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram deixadas em solução de peróxido 1,5% (45 mL de metanol + 5 mL de peróxido de hidrogênio 30%) por 10 minutos e, em seguida, lavadas com solução de tampão PBS. Os cortes das lâminas foram então marcados com caneta própria para essa técnica, fazendo-se um círculo em torno do corte e colocando-se as lâminas nas bandejas de incubação, onde foram realizados todos os próximos procedimentos. Fizeram-se, então, dois banhos de solução salina tris-tampoadada (TBST) de três minutos cada.

FIGURA 7 – Marcação das lâminas com caneta própria para imuno-histoquímica



D – Bloqueio das proteínas endógenas – biotina e avidina: para o bloqueio das proteínas endógenas, utilizou-se leite desnatado, em pó, do tipo Molico[®] (Nestlé), utilizando-se 3 g de leite para cada 100 mL de solução TRIS-HCl. Colocou-se, então, esse preparado de leite Molico[®] sobre os cortes por 10 minutos e banhou-se com solução TBST por dois minutos.

FIGURA 8 – Lâminas, na bandeja úmida de incubação, com solução de leite Molico[®] para bloqueio das proteínas endógenas



E – Incubação do anticorpo primário: a seguir, procedeu-se à incubação do anticorpo primário nas diluições testadas e padronizadas previamente. Durante o período de incubação, as bandejas de incubação úmidas permaneceram fechadas, dentro da estufa, à temperatura de 37°C, por uma hora. Posteriormente, as bandejas permaneceram fechadas, fora da estufa, à temperatura ambiente por mais 30 minutos, para que as lâminas esfriassem. Fizeram-se três banhos das lâminas, de três minutos cada, em solução de TBS.

FIGURA 9 – Frasco de anticorpo primário



FIGURA 10 - Incubação do anticorpo primário



F – Incubação do anticorpo secundário e polímero: o anticorpo secundário foi o mesmo para todas as reações, independentemente do tipo de anticorpo primário, que foi o MACH 4 *Mouse Probe* (UP534L – *Biocare Medical*), incubado por 30 minutos, com bandejas de incubação fechadas, à temperatura ambiente. Procedeu-se à lavagem das lâminas por três vezes, de três minutos cada, com solução de TBST. Após, fez-se a incubação com o polímero MACH 4 HRP *Polymer* (MRH534L – *Biocare medical*), por mais 30 minutos, bandejas de incubação fechadas, à temperatura ambiente. Procedeu-se à lavagem das lâminas por três vezes, de três minutos cada, com solução TBST e, depois, mais um banho com TRIS-HCl pH 7,6, por quatro minutos.

FIGURA 11 – Frascos dos anticorpos secundário e polímero



G – Revelação e contracoloração: a seguir, efetuou-se a incubação das lâminas na solução de diaminobenzidina (DAB), por até cinco minutos. Essa solução dá a coloração marrom às células que contêm o imunomarcador que está sendo pesquisado. Enxaguou-se com água destilada para parar a reação, deixando as lâminas de molho na água destilada até o momento da contracoloração. Realizou-se a contracoloração mergulhando-se as lâminas rapidamente na hematoxilina e lavando-as com água destilada. Fez-se a lavagem em água corrente por um tempo.

FIGURA 12 – Contracoloração: hematoxilina



H – Desidratação do cortes e montagem das lâminas: a desidratação dos cortes foi realizada fazendo-se quatro banhos em álcool (70%; 80%; 95%; absoluto), de dois minutos cada, e dois banhos em xilol, dois minutos cada. Finalmente, colocou-se a lamínula sobre cada lâmina (corte), usando-se uma gota de Ery-Mount.

FIGURA 13 – Processo de desidratação dos cortes



FIGURA 14 – Cortes montados com lamínula



4.3.5 Avaliação microscópica das reações imuno-histoquímicas

Conforme descrito anteriormente, foram realizados 20 cortes de cada bloco parafinado, de modo que um corte de cada bloco foi montado em lâmina, corado por hematoxilina-eosina e examinado pela patologista Dr^a. Sheila Adad, a qual

avaliou a qualidade do corte e o tipo de lesão epitelial presente, classificando segundo Richart. Foi realizada marcação na lâmina com caneta própria para marcar o local da lesão, que serviu de guia para avaliação dos demais cortes quanto ao local onde fazer a leitura da imuno-histoquímica.

Outros cinco cortes de cada paciente (bloco parafinado) foram utilizados para a realização das reações de imuno-histoquímica, sendo um corte para cada marcador (CD3, CD4, CD8, CD56, CD20), cuja técnica já foi descrita anteriormente.

Utilizou-se o microscópio da marca *Olympus* BX41 e os critérios empregados para a avaliação microscópica das reações de imuno-histoquímica seguiram aqueles aceitos pela literatura, como se segue:

- O número de células imunomarcadas pelo método de imuno-histoquímica foi contado por inspeção visual e manual, técnica esta empregada também por Woo *et al.* (2008).
- A expressão de células imunomarcadas (coradas de marrom) foi avaliada no estroma cervical, por método subjetivo ou semiquantitativo, utilizando-se critério de pontuação de zero a três, conforme a quantidade presente, classificando os cortes em:
 - 0 – Ausência de célula imunomarcada
 - 1 – Raras células imunomarcadas
 - 2 – Moderado número de células imunomarcadas
 - 3 – Acentuado número de células imunomarcadas

Esse método subjetivo foi utilizado inicialmente por Coleman e Stanley (1994) e, a seguir, por Alves *et al.* (2010), Georgiannos *et al.* (2003) e Gonçalves, Soares e Donadi (2009).

Para fins de análise estatística, agruparam-se os escores zero (ausência de célula imunomarcada) e um (raras células imunomarcadas) em **baixa expressão** e dois (moderado número de células marcadas) e três (acentuado número de células marcadas) em **alta expressão**. Optou-se por esse termo “expressão”, por ser mais usado nos estudos sobre avaliação de resultados de imuno-histoquímica, como, por exemplo, o de Ahmed *et al.* (2002), Alves *et al.* (2010) e Hayati e Zulkarnaen (2006).

Esse método foi usado, em detrimento do método de contagem objetiva, devido à distribuição desigual e irregular das células imunes ao longo do estroma, de modo que a contagem em campos fixos e preestabelecidos poderia produzir resultados inadequados e errôneos.

Inicialmente, examinou-se a lâmina como um todo com a óptica de 10 (aumento de 100x), para visão geral da lâmina e localização da área de NIC. Com esse mesmo aumento, no estroma subjacente à área de displasia, imediatamente abaixo desta, obteve-se impressão geral da quantidade de células coradas. Em seguida, passou-se para a óptica de 40 (aumento de 400x), para visão mais detalhada, correndo toda a área subjacente à lesão, que variou de 1 a, no máximo, 10 campos ópticos, para então se estabelecer o escore de zero a três, conforme descrito.

Por ser avaliação subjetiva, todas as lâminas foram avaliadas por dois observadores independentes (A.A. e M.M.) e considerou-se a leitura do observador mais experiente, no caso, M.M., coorientadora deste trabalho. Mas é válido ressaltar que ambas as leituras foram colocadas no banco de dados, passaram pelos métodos estatísticos e apresentaram os mesmos resultados, do ponto de vista estatístico.

FIGURA 15 – NIC 3: expressão CD3 no estroma

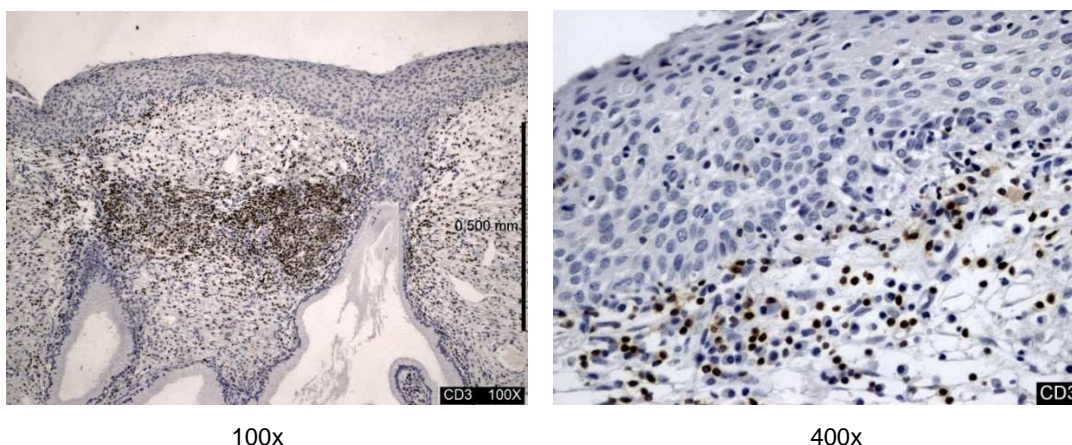
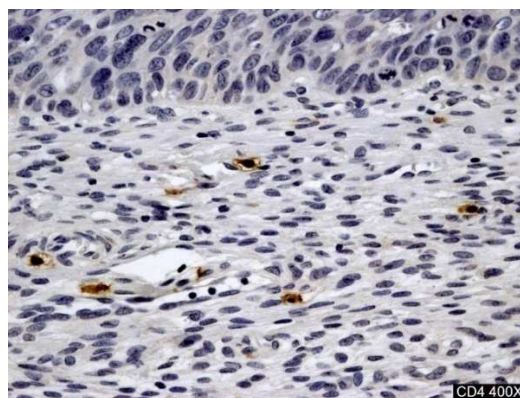


FIGURA 16 – NIC 3: expressão CD4 no estroma

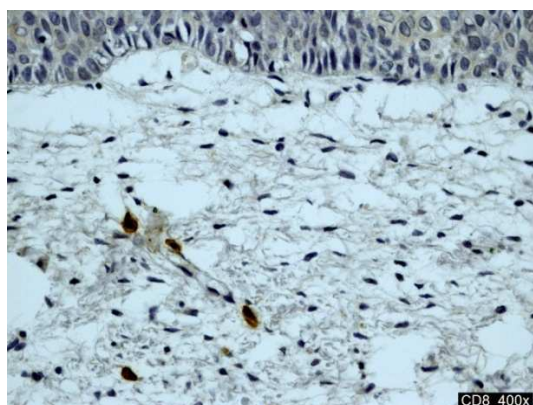


100x

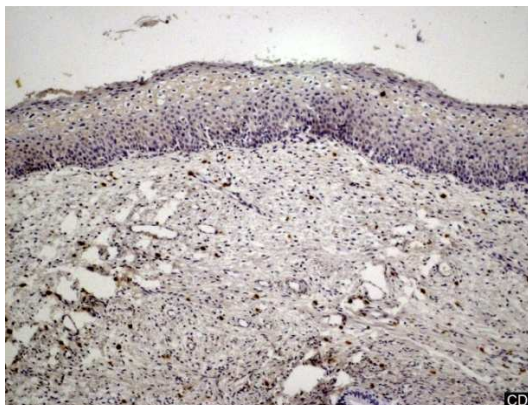


400x

FIGURA 17 – NIC 1: expressão CD8 no estroma

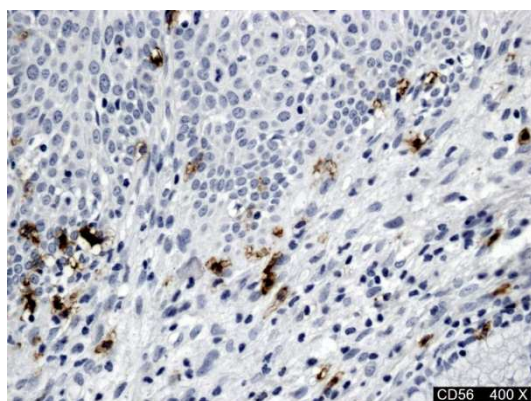


400X

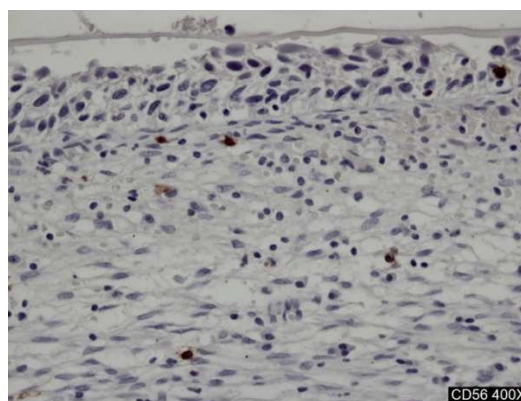


100x

FIGURA 18 – NIC 3: expressão CD56 no estroma



400x



400x

4.4 Análise estatística

4.4.1 Cálculo amostral

A partir do *software* R versão 2.12.1, foi calculado o poder do teste do qui-quadrado, considerando-se os diversos tamanhos do efeito (TAB. 1).

Foi escolhido o tamanho de amostra que correspondesse ao poder 80%, cujo N foi de 88 pacientes. O nível de confiança estatística de 0,05 foi utilizado para todas as análises.

TABELA 1 - Poder do teste para o teste qui-quadrado considerando diversos tamanhos do efeito

Tamanho do efeito	Parâmetros						
	0,1 (Pequeno)	0,15	0,20	0,3 (Médio)	0,35	0,40	0,5 (Grande)
Poder do teste	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Nível de significância	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
N	784	349	196	88	64	49	32

4.4.2 Análise univariada

• Primeira fase

Comparação entre os grupos de pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV e entre os grupos de NIC (NIC 2/3 e NIC 1), a partir de análise de média usando-se teste U-Mann-Whitney para variáveis contínuas. Estas foram transformadas em categóricas e, assim, fez-se análise univariada empregando-se o teste qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher. Foram as seguintes as variáveis: idade, paridade, idade de início de vida sexual, tabagismo, resultado de citologia oncótica, avaliação colposcópica, resultado de biópsia pré-CAF e anatomopatológico da CAF, para verificar se os grupos eram ou não homogêneos. Considerou-se o nível de significância de 0,05.

- **Segunda fase**

Análise univariada dos resultados da imuno-histoquímica para cada imunomarcador testado (CD3, CD4, CD8, CD56, CD20) comparando os dois grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV e os grupos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grau 2/3 e grau 1, usando-se o teste qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher. Considerou-se o nível de significância de 0,05.

4.4.3 Análise multivariada

Foi realizada a análise multivariada por regressão logística para estudo final de associação entre as variáveis significantes das análises univariadas e positividade para o HIV e entre as variáveis significantes e grau de lesão pós-CAF.

Com o objetivo de evitar problemas devido à multicolinearidade, nas regressões múltiplas para o HIV e grau de lesão foram selecionados os potenciais preditores da análise univariada, utilizando nível de significância de 0,20. Para verificar a qualidade do ajuste das regressões logísticas, o teste adotado foi o de Hosmer-Lemeshow.

O *software* empregado na análise foi *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 15.0.

4.5 Considerações éticas

As pesquisas envolvendo seres humanos geram preocupações éticas, pois os voluntários aceitam riscos e inconveniências, com o objetivo de avançar o conhecimento científico e beneficiar os outros.

Durante o desenvolvimento dos estudos, os pesquisadores devem assegurar que os mesmos estejam em concordância com as regulamentações federais. Fazem parte dessas regulamentações o consentimento informado e a apreciação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B) e todo o protocolo do presente estudo foi analisado e aprovado pelo COEP-UFMG em 21 de janeiro de 2010, sob parecer de número ETIC 0526.0.203.000-09 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

A análise dos resultados foi dividida em duas etapas, sendo a primeira descritiva, incluindo os grupos das mulheres soropositivas (n=47) e soronegativas para o HIV (n=38) e os grupos de NIC 2/3 (n=46) e NIC 1 (n=39). Na segunda etapa, foram realizadas análise univariada e multivariada para avaliar as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV e com NIC 2/3 e NIC 1 quanto ao grau de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20, ou seja, resposta imune local (cervical).

5.1 Primeira etapa de análise dos resultados

5.1.1 Caracterização das pacientes quanto à variável HIV

5.1.1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das pacientes estudadas quanto à variável HIV

Das 85 pacientes estudadas, a média de idade foi de $33,98 \pm 8,4$ anos e mediana de 33,0 anos, com idade mínima de 19 anos e máxima de 71 anos. Em relação à paridade, média de $2,3 \pm 1,6$ filhos e mediana de dois filhos, com mínimo de zero e máximo de oito filhos. Quanto à idade de início da vida sexual, a média de idade foi de $17,7 \pm 3,1$ anos e mediana de 17 anos, com mínima de 13 e máxima de 29 anos.

Analisando a TAB. 2, em que se comparam os dois grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, observa-se que a média de idade foi um pouco mais alta no grupo das pacientes soronegativas (35,3 anos) em relação às soropositivas (32,8 anos), mas sem significância estatística ($p=0,25$). As demais variáveis (paridade e início da atividade sexual) apresentaram valores de média e mediana muito semelhantes entre os dois grupos. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto a essas variáveis, demonstrando a homogeneidade dos grupos estudados.

TABELA 2 - Análise de média/ mediana para idade, paridade e início da atividade sexual comparando pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV

	Soropositivas HIV (n=47)		Soronegativas HIV (n=38)		Valor p*
	Média ± dp	Mediana (A)	Média ± dp	Mediana (A)	
Idade (anos)	32,8 ± 7,18	33,0 (21-55)	35,3 ± 9,7	35 (19-71)	0,25
Paridade	2,1 ± 1,45	2,0 (0-8)	2,6 ± 1,8	2 (0-7)	0,24
Início ativ. sexual	18,0 ± 3,71	17,0 (13-29)	17,3 ± 2,01	17,5 (13-21)	0,88

* teste U-Mann-Whitney. dp= desvio-padrão.

Na TAB. 3, foi realizada a dicotomização das variáveis sociodemográficas considerando-se como ponto de corte a mediana do grupo total de pacientes (n=85) para cada variável, não se encontrando diferença significativa entre os grupos.

TABELA 3 - Comparação entre as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV segundo variáveis sociodemográficas

	Soropositivas HIV (n = 47)		Soronegativas HIV (n = 38)		Valor p*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
Idade							
≤ 33 anos	29	61,7	18	47,4	0,19	1,0	
> 33 anos	18	38,3	20	52,6		1,79	0,75-4,25
Tabagismo							
Não	30	63,8	23	60,5	0,76	1,0	
Sim	17	36,2	15	39,5		1,15	0,48-2,78
Paridade							
≤ 2	31	66,0	20	52,6	0,21	1,0	
> 2	16	34,0	18	47,4		1,74	0,73-4,19
Idade início vida sexual							
≤ 17 anos	25	53,2	19	50,0	0,77	1,0	
>17 anos	22	46,8	19	50,0		1,13	0,48-2,68

*Teste qui-quadrado Pearson.

5.1.1.2 Citologia, colposcopia e biópsia realizadas previamente à cirurgia de alta frequência (CAF) e resultado histopatológico da CAF das pacientes estudadas quanto à variável HIV

Analisando os grupos quanto à citologia realizada na época do encaminhamento para a consulta no serviço de patologia do colo, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,27$) (TAB. 4).

A colposcopia realizada previamente à CAF para guiar a biópsia foi indicativa de NIC 2/3 em 81,6% das pacientes soronegativas para o HIV e em 29,8% das soropositivas, com diferença significativa entre os grupos ($p=0,000$). O mesmo ocorreu com o resultado da biópsia pré-CAF, em que houve predomínio de NIC 2 e 3 nas soronegativas para o HIV (81,6%) e de NIC 1 nas soropositivas (78,7%), estando compatível com a colposcopia prévia, com diferença também significativa entre os grupos ($p=0,000$) (TAB. 4).

Após a CAF, no grupo das pacientes soropositivas para o HIV houve 22 casos (46,8%) de NIC 2/3 e 25 casos (53,2%) de NIC 1. No grupo das soronegativas para o HIV, apuraram-se 24 casos (63,2%) de NIC 2/3 e 14 casos (36,8%) de NIC 1 (TAB. 4).

Observa-se que a frequência de NIC 2 e 3 foi mais alta no grupo das soronegativas para o HIV (63,2%) e de NIC 1 no grupo das soropositivas para o HIV (53,2%), visto que o protocolo de conduta nessas pacientes soropositivas, na época, previa a CAF nas NIC 1. Após a CAF, as diferenças dos graus de NIC entre os grupos não foram significativas ($p=0,13$) (TAB. 4).

TABELA 4 - Comparação entre as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, segundo citologia, colposcopia, resultado da biópsia e histopatológico da CAF

	Soropositivas		Soronegativas		Valor p*	OR	IC a 95%
	HIV (n=47)		HIV (n=38)				
	n	%	n	%			
Citologia							
Alterada	29	61,7	25	65,8	0,27**	0,58	0,22-1,52
Normal	18	38,3	9	23,7		1,0	
ASCUS			4	10,5		---	
Colposcopia							
Grau II	14	29,8	31	81,6	0,000	0,10	0,03-0,27
Grau I	33	70,2	7	18,4		1,0	
Biópsia							
NIC 2/3	10	21,3	31	81,6	0,000	0,06	0,02-0,18
NIC 1	37	78,7	7	18,4		1,0	
CAF							
NIC 2/3	22	46,8	24	63,2	0,13	0,51	0,21-1,23
NIC 1	25	53,2	14	36,8		1,0	

* Teste qui-quadrado Pearson.

**valor p excluindo os 4 casos de ASCUS.

Em relação à caracterização das mulheres soropositivas para o HIV, quanto à imunidade sistêmica (contagem de linfócitos CD4⁺ sistêmico) e carga viral do HIV pôde-se constatar valor médio de linfócitos T CD4⁺ sanguíneo de 292,87 células/mm³ com 50% das pacientes apresentando T CD4⁺ de até 266 células/mm³. O valor mínimo do T CD4⁺ foi de 23 células/mm³ e o máximo de 745 células/mm³; 25% das mulheres apresentavam T CD4⁺ de até 171 células/mm³. Quanto à carga viral, verificou-se média de 5.013 cópias/mL, variando de zero a 7.638 cópias/mL (TAB. 5). Apenas uma paciente não estava fazendo uso de HAART.

TABELA 5 - Medidas descritivas para T CD4+ e carga viral das pacientes soropositivas para o HIV

Variáveis	N	Média	Desvio	Mín.	1ªQ	Mediana	3ªQ	Máx.
T CD4+(células/mm ³)	47	292,87	172,47	23,0	171,0	266,0	412,0	745,0
Carga viral (cópias/mL)	47	5.013	2.333	0,0	3194	5416	6944	7.638

5.1.2 Caracterização das pacientes quanto à variável grau de NIC da CAF (NIC 2/3 e NIC 1)

Analisando a TAB. 6, em que se comparam os dois grupos de pacientes com NIC 2/3 e NIC 1, infere-se que a média e a mediana de idade foram um pouco mais altas no grupo de pacientes com NIC 2/3 (35,02 anos/ 35 anos) em relação às pacientes com NIC 1 (32,7 anos/ 31,5 anos), mas sem significância estatística ($p=0,25$). As demais variáveis (paridade e idade de início da atividade sexual) apresentaram valores de média e mediana muito semelhantes entre os dois grupos. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto a essas variáveis, demonstrando homogeneidade dos grupos estudados.

TABELA 6 - Análise de média/mediana para idade, paridade e início da atividade sexual comparando as mulheres portadoras de NIC 2/3 e NIC 1

	NIC 2/3 (n=46) Média ± dp Mediana (A)	NIC 1 (n=39) Média ± dp Mediana (A)	Valor p*
Idade (anos)	35,02 ± 9,5 35 (19-71)	32,68 ± 6,8 31,5 (21-49)	0,28
Paridade	2,57 ± 1,77 2,0 (0-8)	2,03 ± 1,4 2 (0-6)	0,17
Início atividade sexual	17,66 ± 3,48 17,0 (13-29)	17,76 ± 2,54 17 (14-25)	0,56

* teste U-Mann-Whitney.

5.1.2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das pacientes estudadas quanto à variável grau de NIC da CAF

Os grupos de pacientes com NIC 2/3 e NIC 1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto às variáveis idade ($p=0,42$), paridade ($p=0,25$), idade de início de atividade sexual ($p=0,72$) e tabagismo ($P=0,45$) (TAB. 7).

TABELA 7 - Comparação entre as pacientes com NIC 2/3 e NIC 1 segundo variáveis sociodemográficas

Variáveis	NIC 2/3 (n= 46)		NIC 1 (n= 39)		Valor P*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
Idade							
≤ 30	15	32,6	16	41	0,42	1	0,60-3,50
> 30	31	67,4	23	59		1,44	
Tabagismo							
Não	27	58,7	26	66,7	0,45	1	0,58-3,42
Sim	19	41,3	13	33,3		1,41	
Paridade							
≤2	25	54,3	26	66,7	0,25	1	0,69-4,06
>2	21	45,7	13	33,3		1,68	
Idade início vida sexual							
≤ 17 anos	23	50	21	53,8	0,72	1,17	0,50-2,74
> 17 anos	23	50	18	46,2		1	

*Teste qui-quadrado Pearson.

5.1.2.2 Citologia, colposcopia e biópsia realizadas previamente à cirurgia de alta frequência (CAF) e resultado histopatológico da CAF das pacientes estudadas quanto à variável grau de NIC da CAF

Analisando os grupos de NIC 2/3 e NIC 1 na CAF, encontrou-se diferença significativa entre os mesmos quanto a: citologia ($p=0,041$), colposcopia ($p=0,043$) e biópsia ($p=0,046$) (TAB. 8).

A chance de uma paciente NIC 2/3 na CAF ter apresentado citologia prévia alterada é de aproximadamente 2,7 vezes a chance de outra com NIC 1. Da mesma maneira, a chance de uma paciente NIC 2/3 na CAF ter apresentado colposcopia indicativa de NIC 2/3 é de aproximadamente 2,5 vezes a chance de outra com NIC 1.

TABELA 8 - Comparação entre as pacientes com NIC 2/3 e NIC 1 segundo citologia, colposcopia, resultado da biópsia e *status* do HIV

Variáveis	NIC 2/3 (n=47)		NIC 1 (n= 38)		Valor P	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
Citologia							
Normal	10	21,3	17	44,7	0,041	1	1,03-6,93
Alterada	33	70,2	21	55,3		2,7	
ASCUS*	4	8,5					
Colposcopia							
Grau 1	17	37,0	23	59,0	0,043	1	1,02-5,88
Grau 2	29	63,0	16	41,0		2,5	
Biópsia pré-CAF							
NIC 1	19	41,3	24	63,2	0,046	1	1,01-5,89
NIC 2/3	27	58,7	14	36,8		2,6	
HIV							
Negativo	24	52,2	14	35,9	0,133	1	0,21-1,23
Positivo	22	47,8	25	64,1		0,5	

* Teste qui-quadrado Pearson .

**valor p excluindo os 4 casos de ASCUS.

5.2 Segunda etapa de análise dos resultados

Nesta etapa realizou-se a análise univariada dos imunomarcadores em relação ao *status* HIV e ao grau de neoplasia intraepitelial cervical da biópsia da CAF usando-se o teste do qui-quadrado de Pearson e teste exato de *Fisher*. Considerou-se o nível de significância de 0,05. As variáveis que apresentaram $p < 0,20$ nessa fase foram levadas para um modelo multivariado por regressão logística.

5.2.1 Análise univariada do padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20 em relação à presença ou não do HIV

5.2.1.1 Contagem de células positivas para o marcador CD3 (linfócitos totais)

Das 85 pacientes, 52 (61,2%) tiveram baixa expressão para o marcador CD3 e 33 (38,8%) tiveram alta expressão. Destas 33, 20 (42,6%) eram soropositivas para o HIV e 13 (34,2 %) soronegativas.

Comparando os dois grupos, portanto, observa-se que as pacientes soropositivas para o HIV tiveram um pouco mais de expressão desse marcador em relação às soronegativas, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,43$) (TAB. 9).

5.2.1.2 Contagem de células positivas para o marcador CD4 (linfócito T)

Do total de 85 pacientes, 45 (52,9%) tiveram baixa expressão para o marcador CD4 e 39 (45,9%) tiveram alta expressão, sendo que uma (2,1%) não apresentou resultado (*missing*). Das 39 pacientes com alta expressão, 22 (46,9%) eram soropositivas para o HIV e 17 (44,7%) soronegativas.

Comparando os dois grupos, portanto, observa-se que ambos tiveram expressão muito semelhante desse marcador e que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,78$) (TAB. 9).

5.2.1.3 Contagem de células positivas para o marcador CD8 (linfócito T)

Tiveram baixa expressão 49 (57,6%) das 85 pacientes; e 35 (41,2%) tiveram alta expressão. Uma paciente (1,2%) não apresentou resultado (*missing*). No grupo das soropositivas para o HIV, a proporção de alta e baixa expressão para CD8 foi semelhante. Já no grupo das soronegativas, apenas 29% das pacientes tiveram alta expressão.

Comparando os dois grupos, portanto, observa-se que as pacientes soronegativas para o HIV tiveram menor expressão desse marcador em relação às soropositivas, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$) (*Odds ratio* - $OR=0,37$; $IC95\%= 0,15-0,92$) (TAB. 9).

5.2.1.4 Contagem de células positivas para o marcador CD56 (células *natural killer*)

Entre as 85 pacientes, foram constatadas 68 (80,0%) com baixa expressão; 15 (17,6%) tiveram alta expressão e duas (2,4%) não apresentaram resultado (*missing*). Portanto, a baixa expressão predominou em ambos os grupos, mas mais significativo nas soropositivas para o HIV. Das 15 pacientes com alta expressão, quatro (8,5%) eram soropositivas e 11 (29,0%) soronegativas para o HIV.

Comparando os dois grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$) ($OR=4,17$; $IC95\%=1,20-14,47$), com menor expressão desse marcador em pacientes soropositivas (TAB. 9).

5.2.1.5 Contagem de células positivas para o marcador CD20 (linfócitos B)

Foram 44 pacientes (51,8%) que tiveram baixa expressão e 37 (43,5%) que exibiram alta expressão para CD20, entre as 85 avaliadas. E quatro (4,7%) não apresentaram resultado (*missing*), sendo duas de cada grupo (soropositivas e soronegativas para o HIV). Ambos os grupos de pacientes, soropositivas e

soronegativas para o HIV, tiveram mais ou menos a mesma proporção de baixa e alta expressão. Das 45 pacientes soropositivas para o HIV, 22 (46,8%) tiveram alta expressão. Das 36 pacientes soronegativas, 15 (39,5%) tiveram alta expressão, mostrando-se, portanto, um pouco mais expressivo nas soropositivas.

Comparando os dois grupos, portanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,51$) (TAB. 9).

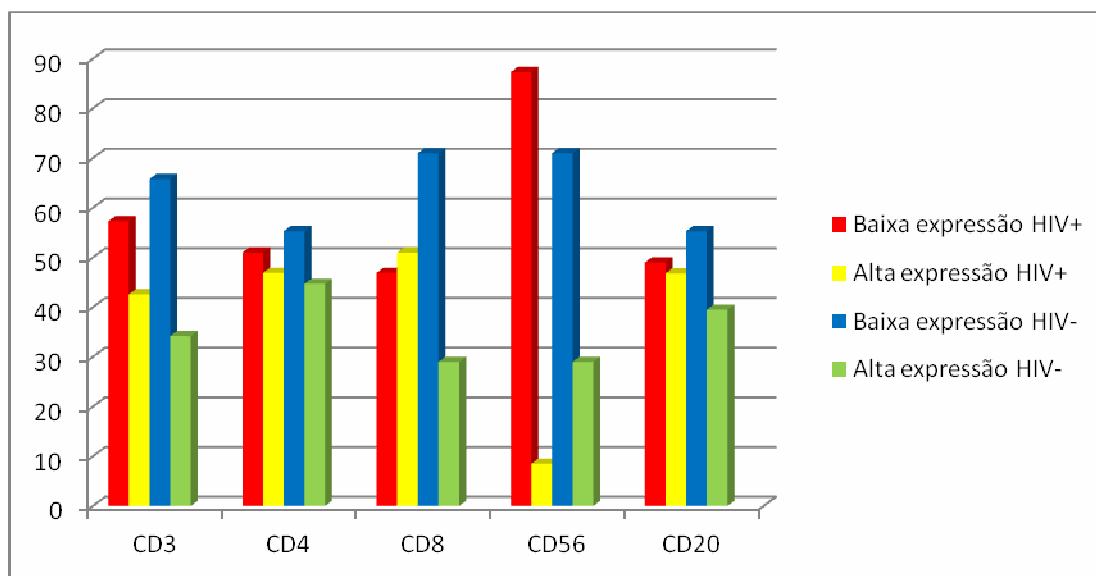
TABELA 9 - Comparação entre pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV quanto ao padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20

	Soropositivas HIV (n=47)		Soronegativas HIV (n=38)		Valor p*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
CD 3							
Baixa expressão	27	57,4	25	65,8	0,43	0,70	0,29-1,70
Alta expressão	20	42,6	13	34,2		1,0	
CD 4							
Baixa expressão	24	51,0	21	55,3	0,78	0,88	0,37-2,09
Alta expressão	22	46,9	17	44,7		1,0	
<i>Missing</i>	1	2,1					
CD 8							
Baixa expressão	22	46,9	27	71,0	0,03	0,37	0,15-0,92
Alta expressão	24	51,0	11	29,0		1,0	
<i>Missing</i>	1	2,1					
CD 56							
Baixa expressão	41	87,3	27	71,0	0,01	4,17	1,20-14,47
Alta expressão	4	8,5	11	29,0		1,0	
<i>Missing</i>	2	4,2					
CD 20							
Baixa expressão	23	49,0	21	55,3	0,51	0,75	0,31-1,81
Alta expressão	22	46,8	15	39,5		1,0	
<i>Missing</i>	2	4,2	2	5,3			

*Teste qui-quadrado Pearson.

No GRÁF. 1 percebe-se o padrão de expressão para cada marcador imunológico nas pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV.

GRÁFICO 1 - Distribuição do padrão de expressão dos imunomarcadores CD3, CD4, CD8, CD56, CD20 nas pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV



Valor p: CD3 = 0,43 CD4 = 0,78 CD8 = 0,03 CD56 = 0,01 CD20 = 0,51.

5.2.2 Análise univariada do padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20 em relação aos graus de NIC (NIC 2/3 e NIC 1)

5.2.2.1 Contagem de células positivas para o marcador CD3 (linfócitos totais)

Na análise do grau de lesão, registrou-se que a baixa expressão ocorreu um pouco mais nas NIC 2/3, sendo que, entre as 46 pacientes com diagnóstico de NIC 2/3, 30 (65,2%) tiveram baixa expressão; e nas 39 pacientes com NIC 1, 22 (56,4%) tiveram baixa expressão.

Comparando os dois grupos de NIC 2/3 e NIC 1 não houve diferença estatisticamente significativa quanto à expressão dos linfócitos CD3⁺ (p=0,40) (TAB. 10).

5.2.2.2 Contagem de células positivas para o marcador CD4 (linfócito T)

A baixa expressão predominou nas NIC 1, conforme a análise do grau de lesão, sendo que entre as 39 pacientes com NIC 1, 23 (59,0%) tiveram baixa expressão. Já as NIC 2/3 tiveram um pouco mais de alta expressão (50%) comparado com as NIC 1 (41%).

Na comparação entre os dois grupos de NIC 2/3 e NIC 1, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à expressão dos linfócitos CD4⁺ ($p=0,35$) (TAB. 10).

5.2.2.3 Contagem de células positivas para o marcador CD8 (linfócito T)

O grau de lesão foi analisado e evidenciou-se que as NIC 2/3 e NIC 1 tiveram proporções semelhantes de baixa expressão: 56,5% (NIC 2/3) e 59,0% (NIC 1). A alta expressão foi um pouco mais expressiva nas NIC 2/3 (43,5%).

Comparando os dois grupos de NIC 2/3 e NIC 1, não se detectou diferença estatisticamente significativa quanto à expressão dos linfócitos CD8⁺ ($p=0,71$) (TAB. 10).

5.2.2.4 Contagem de células positivas para o marcador CD56 (células *natural killer*)

A análise do grau de lesão revelou que a baixa expressão predominou tanto nas NIC 2/3 (76,1%) quanto nas NIC 1 (84,6%). Já a alta expressão foi mais acentuada nas NIC 2/3 (23,9%) e em apenas quatro (10,3%) das pacientes com NIC 1.

Os dois grupos de NIC 2/3 e NIC 1 foram comparados, não se obtendo diferença estatisticamente significativa quanto à expressão das células CD56⁺ ($p=0,12$) (TAB. 10).

5.2.2.5 Contagem de células positivas para o marcador CD20 (linfócitos B)

Verificou-se, na análise do grau de NIC, que a baixa expressão predominou nas NIC 1 (64,1%). Nas 46 pacientes com NIC 2/3, houve predomínio de alta expressão (52,2%) comparadas às NIC 1 (33,3%).

A comparação entre os dois grupos de NIC 2/3 e NIC 1 não identificou diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$) (TAB. 10).

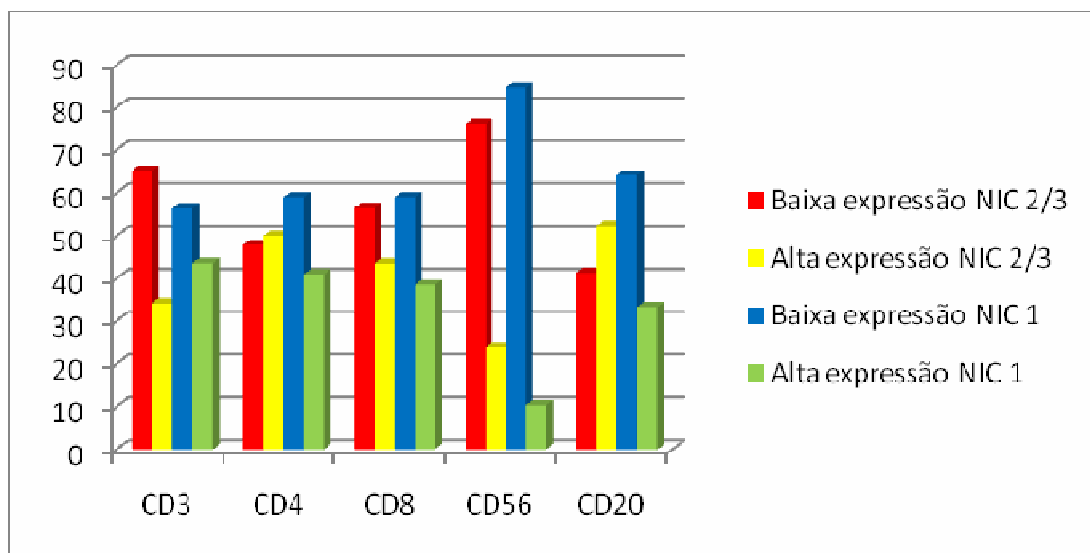
TABELA 10 - Comparação dos grupos de NIC 2/3 e NIC 1 quanto ao padrão de expressão dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20

	NIC 2/3 (n=46)		NIC 1 (n=39)		Valor p*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
CD 3							
Baixa expressão	30	65,2	22	56,4	0,40	1,45	0,60-3,48
Alta Expressão	16	34,8	17	43,6		1,0	
CD 4							
Baixa expressão	22	47,8	23	59,0	0,35	0,66	0,28-1,58
Alta expressão	23	50,0	16	41,0		1,0	
<i>Missing</i>	1	2,2					
CD 8							
Baixa expressão	26	56,5	23	59,0	0,71	0,85	0,35-2,03
Alta expressão	20	43,5	15	38,4		1,0	
<i>Missing</i>			1	2,6			
CD 56							
Baixa expressão	35	76,1	33	84,6	0,12	0,39	0,11-1,33
Alta expressão	11	23,9	4	10,3		1,0	
<i>Missing</i>			2	5,1			
CD 20							
Baixa expressão	19	41,3	25	64,1	0,05	0,41	0,17-1,01
Alta expressão	24	52,2	13	33,3		1,0	
<i>Missing</i>	3	6,5	1	2,6			

*Teste qui-quadrado Pearson e Teste Exato de Fisher.

No GRÁF. 2 destaca-se o padrão de expressão para cada marcador imunológico, nos grupos de pacientes com NIC 2/3 e NIC 1.

GRÁFICO 2 - Distribuição do padrão de expressão para CD3, CD4, CD8, CD56, CD20 nas NIC 2/3 e NIC 1



Valor p: CD3 = 0,40 CD4 = 0,35 CD8 = 0,71 CD56 = 0,12 CD20 = 0,05.

Na TAB. 11 pode-se analisar o padrão de expressão alta e baixa de cada marcador imunológico em relação às duas variáveis-resposta - *status* do HIV e grau de neoplasia -, concomitantemente. Observa-se, em relação ao marcador CD8, que na análise univariada (TAB. 9) houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$), com expressão mais baixa nas soronegativas para o HIV e não houve diferença ($p=0,71$) entre os graus de NIC (TAB. 10). Na TAB. 11 constata-se que só houve diferença estatisticamente significativa de CD8 entre as pacientes soropositivas e soronegativas, nos casos de NIC 2/3, mostrando possível interação entre os fatores HIV e grau de NIC.

Em relação ao marcador CD56, este mostrou diferença estatisticamente significativa entre as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV (TAB. 9), com menor expressão nas soropositivas ($p=0,01$), e não foi significativamente diferente para o grau de NIC ($p=0,12$) (TAB. 10). E na TAB. 11 deixou de ser estatisticamente significativa a diferença entre as pacientes soropositivas e soronegativas, quando separadas por grau de NIC, mostrando também possível interação entre as variáveis HIV e grau de NIC ou, talvez por ter diminuído o tamanho da amostra dos grupos de comparação, interferindo no valor p. E, ainda,

a TAB. 9, no tocante ao marcador CD20, mostra que não foi significativamente diferente entre as pacientes soropositivas e soronegativas e teve valor p limítrofe ($p=0,05$) quando comparados os grupos de grau de NIC, com predominância da baixa expressão nas NIC 1 (TAB. 10). Confirmando isto, na TAB. 11 esse valor p limítrofe só ocorreu nos casos de NIC 1, mostrando uma possível interação entre as variáveis grau de NIC e HIV.

TABELA 11 - Padrão de expressão alta e baixa dos marcadores imunológicos CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20, relacionado ao *status* HIV e grau de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) da CAF

Grau de NIC	Marcador e grau de expressão	Soropositivas HIV (n=47)		Soronegativas HIV (n=38)		Valor p*	OR	IC a 95%
		n	%	n	%			
NIC 2/3	CD 3							
	Baixa expressão	13	27,7	17	44,7	0,40	0,59	0,17-2,02
	Alta expressão	9	19,1	7	18,4		1,0	
NIC 1	CD 3							
	Baixa expressão	14	29,8	8	21,1	0,95	0,95	0,25-3,57
	Alta expressão	11	23,4	6	15,8		1,0	
NIC 2/3	CD 4							
	Baixa expressão	10	21,3	12	31,6	0,87	0,91	0,28-2,93
	Alta expressão	11	23,4	12	31,6		1,0	
	<i>Missing</i>	1	2,1					
NIC 1	CD 4							
	Baixa expressão	14	29,8	9	23,7	0,71	0,88	0,18-2,72
	Alta expressão	11	23,4	5	13,1		1,0	
NIC 2/3	CD 8							
	Baixa expressão	9	19,1	17	44,8	0,04	0,28	0,08-0,97
	Alta expressão	13	27,7	7	18,4		1,0	
NIC 1	CD 8							
	Baixa expressão	13	27,7	10	26,3	0,29	0,47	0,11-1,94
	Alta expressão	11	23,4	4	10,5		1,0	
	<i>Missing</i>	1	2,1					
NIC 2/3	CD 56							
	Baixa expressão	19	40,4	16	42,1	0,12	3,16	0,72-3,97
	Alta expressão	3	6,4	8	21,0		1,0	
NIC 1	CD 56							
	Baixa expressão	22	46,9	11	29,0	0,11	6,00	0,56-4,57
	Alta expressão	1	2,1	3	7,9		1,0	
	<i>Missing</i>	2	4,2					
NIC 2/3	CD 20							
	Baixa expressão	10	21,3	9	23,7	0,65	1,31	0,39-4,38
	Alta expressão	11	23,4	13	34,2		1,0	
	<i>Missing</i>	1	2,1	2	5,3			
NIC 1	CD 20							
	Baixa expressão	13	27,6	12	31,6	0,05	0,19	0,03-1,08
	Alta expressão	11	23,4	2	5,3		1,0	
	<i>Missing</i>	1	2,1					

*Teste qui-quadrado Pearson e Teste exato de Fisher.

5.2.3 Avaliação de interação

Avaliando a OR da análise univariada para cada marcador em relação ao *status* HIV (TAB. 9) e grau de NIC (TAB. 10), isoladamente e comparando com as ORs da TAB. 11, na qual se associam *status* HIV, grau de NIC e marcadores, apuraram-se possíveis interações entre as variáveis-resposta *status* HIV e grau de NIC devido a variações da OR (TAB. 11).

Diante de discordância das ORs das análises univariadas com as ORs da associação *status* HIV x grau de NIC, testaram-se possíveis interações (TAB. 12).

TABELA 12 - *Odds ratio* (OR) para cada marcador das análises univariadas com *status* HIV e grau de NIC *versus* OR da interação (*status* HIV x grau de NIC)

	OR univariada		OR interação
	HIV	NIC	HIV X NIC
CD3 – NIC 2/3	0,70	1,45	0,59
CD3 - NIC 1	-	-	0,95
CD56 - NIC 2/3	4,17	0,39	3,16
CD56 - NIC 1	-	-	6,00
CD20 - NIC 2/3	0,75	0,41	1,31
CD20 - NIC 1	-	-	0,19

5.2.4 Análise multivariada

5.2.4.1 Quanto ao *status* HIV

Foi realizada análise multivariada por regressão logística, incluindo as variáveis idade; marcadores CD3, CD8, CD56 e CD20; grau de NIC (CAF); e as interações grau de NIC x CD3; grau de NIC x CD56; grau de NIC x CD20. As variáveis idade, grau de NIC, CD56 e CD8 entraram no modelo porque tiveram valor $p < 0,20$ (TAB. 3, 5 e 9). As variáveis CD3 e CD20 que não tiveram $p < 0,20$ entraram isoladamente e com a variável grau de NIC para se pesquisar interação

da variável-resposta grau de NIC com a variável-resposta HIV para estes marcadores. As variáveis colposcopia e biópsia pré-CAF, apesar de terem tido valor $p < 0,20$ na análise univariada, não foram incluídas no modelo de análise multivariada. Tanto a colposcopia quanto a biópsia pré-CAF apresentaram importante viés, como já foi citado anteriormente, pois há muito mais NIC 1 no grupo das pacientes soropositivas para o HIV em relação às soronegativas. Isso não condiz com a realidade geral, pois na época era protocolo do serviço realizar CAF nas NIC 1, com $p = 0,000$ ao comparar os grupos de soropositivas e soronegativas para o HIV. Tratava-se, portanto, de uma particularidade do grupo de pesquisa em questão, levando a um viés de seleção. Decidiu-se, portanto, não levar em consideração tais variáveis para a regressão logística (TAB. 13).

TABELA 13 - Modelo inicial da análise multivariada, segundo a presença ou não do HIV

Variável	OR	IC 95%	Valor p
Idade	1,70	0,63-4,60	0,29
≤ 33 anos x > 33 anos			
Marcador CD8	0,31	0,10-0,92	0,03
Baixa x alta expressão			
Marcador CD56	2,98	0,56-15,71	0,20
Baixa x alta expressão			
Grau de NIC	4,19	0,08-225,7	0,48
NIC 2/3 x NIC 1			
Marcador CD3	0,76	0,17-3,34	0,71
Baixa x alta expressão			
Marcador CD20	1,33	0,34-5,22	0,68
Baixa x alta expressão			
Grau de NIC x CD3	1,75	0,19-15,82	0,62
NIC 2/3 x Baixa expressão			
Grau de NIC x CD56	1,76	0,09-34,9	0,71
NIC 2/3 x Baixa expressão			
Grau de NIC x CD20	0,12	0,01-1,34	0,09
NIC 2/3 x Baixa expressão			

* Teste Hosmer e Lemeshow – $p = 0,50$.

As variáveis sem significância estatística ($p > 0,05$) foram sendo retiradas, uma a uma, em ordem decrescente de valor p , na sequência: marcador CD3, marcador CD20, CAF x marcador CD3, CAF x marcador CD56, grau de NIC da CAF, idade e grau de NIC x CD20.

O modelo final apresentou duas variáveis com associação independente para a infecção pelo HIV, que foram os marcadores CD8 e CD56. A chance de expressão baixa do marcador CD8 ocorrer nas pacientes soronegativas para o HIV foi de 0,34 vezes a chance de ocorrer nas soropositivas (IC95% = 0,13-0,87. E a chance de baixa expressão do marcador CD56 ocorrer nas pacientes soropositivas para o HIV foi de 4,48 vezes a chance das pacientes soronegativas (IC95% = 1,23-16,3) (TAB. 14).

TABELA 14 - Modelo final da análise multivariada, segundo a presença ou não do HIV

Variável	OR	IC 95%	Valor p
Linfócito T CD8⁺ (expressão baixa)	0,34	0,13-0,87	0,02
Células NK CD56⁺ (expressão baixa)	4,48	1,23-16,3	0,02

* Teste Hosmer e Lemeshow – $p = 0,89$.

5.2.4.2 Quanto ao grau de NIC da CAF

Foi realizada análise multivariada por regressão logística, incluindo as variáveis: citologia; marcador CD56; *status* HIV; marcador CD3; marcador CD20; e as interações HIV x marcador CD3; HIV x marcador CD56; HIV x marcador CD20. As variáveis citologia, *status* HIV, marcador CD20 e CD56 entraram no modelo porque apresentaram valor $p < 0,20$ nas análises univariadas (TAB. 8 e 10). A variável CD3, que não teve $p < 0,20$, entrou isoladamente e com a variável HIV para testarmos prováveis interações da variável-resposta HIV com a variável-resposta grau de NIC para estes marcadores (CD3 x HIV, CD20 x HIV, CD56 x HIV). As variáveis colposcopia e biópsia pré-CAF não foram inseridas no modelo, pelo mesmo motivo citado para a variável HIV (TAB. 15).

TABELA 15 - Modelo inicial da análise multivariada, segundo o grau de NIC (CAF)

Variável	OR	IC 95%	Valor p
Citologia	2,33	0,72-7,55	0,16
Alterada x normal			
Marcador CD56	0,28	0,02-3,30	0,31
Baixa x alta expressão			
HIV	1,54	0,03-77,52	0,83
Positivo x negativo			
Marcador CD3	0,88	0,22-3,50	0,85
Baixa x alta expressão			
Marcador CD20	0,65	0,18-2,37	0,52
Baixa x alta expressão			
Status HIV x CD3	3,08	0,31-30,80	0,34
Positivo x baixa expressão			
Status HIV x CD56	4,20	0,18-99,01	0,37
Positivo x baixa expressão			
Status HIV x CD20	0,16	0,01-2,08	0,16
Positivo x baixa expressão			

* Teste Hosmer e Lemeshow – p=0,84.

As variáveis sem significância estatística ($p > 0,05$) foram sendo retiradas, uma a uma, em ordem decrescente de valor p, na sequência: CD3, HIV, CD56 x HIV, CD56, CD20, citologia.

O modelo final apresentou duas variáveis de associação independente para o grau de lesão, que foi marcador CD3 x HIV e marcador CD20 x HIV. A chance das pacientes soropositivas para o HIV com NIC 2/3 ter baixa expressão do marcador CD3 foi de 4,79 vezes a chance de acontecer nas pacientes com NIC 1 (IC95%=1,02-22,50). A chance das pacientes soropositivas para o HIV com NIC 1 ter baixa expressão do marcador CD20 foi de 0,12 vezes a chance de ser constatado nas pacientes com NIC 2/3 (IC95%=0,02-0,61) (TAB. 16).

TABELA 16 - Modelo final da análise multivariada, segundo o grau de NIC (CAF)

Variável	OR	IC 95%	Valor p
Marcador CD3 x HIV (Baixa expressão x HIV positivo)	4,79	1,02-22,50	0,04
Marcador CD20 x HIV (Baixa expressão x HIV positivo)	0,12	0,02-0,61	0,01

* Teste Hosmer e Lemeshow – $p=0,72$.

6 DISCUSSÃO

A resposta imune local é muito complexa e os diferentes tipos de células interagem e influenciam uns aos outros. Linfócito T CD3+, por exemplo, é um forte preditor de prognóstico (MALUF *et al.*, 2008) e a razão disto pode ser a importância de vários tipos de células imunes, e não um em particular. Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) são muito importantes no sistema imune de defesa, mas seu efeito é dependente de outras células, incluindo os linfócitos T auxiliares (CD4⁺). No câncer cervical, segundo alguns autores, as densidades peritumorais dos linfócitos CD3+ e CD8+ são fortes preditores de regressão (BETHWAITE *et al.*, 1996; CHAO *et al.*, 1999). Desse modo, a baixa densidade dessas células sugere que as pacientes devem ser controladas cuidadosamente e a avaliação da sua densidade peritumoral é então usada como preditor de recidiva.

A persistência da infecção pelo HPV é imprescindível para a persistência das lesões precursoras (NIC) e conseqüente evolução do câncer cervical. E essa persistência se deve, entre outros fatores, à falha do sistema imune do hospedeiro (DE JONG *et al.*, 2004), que parece ser o fator crítico em determinar o curso da infecção e, conseqüentemente, a evolução das NICs. Confirmando, nas mulheres imunossuprimidas a infecção pelo HPV é detectada mais frequentemente, a incidência de NIC é mais alta e o risco de recorrência após tratamento é também mais elevado, o que mostra a importância da resposta imune (AHDIEH *et al.*, 2000; FRUCHTER *et al.*, 1996; LEVI *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2009; MAIMAN, 1998; PENN, 1986; ZIMMERMANN; MELO, 2002).

6.1 Análise dos grupos de pacientes HIV-positivo e HIV-negativo quanto aos aspectos clínicos e epidemiológicos estudados

Analisando as características clínicas e epidemiológicas dos dois grupos de mulheres soropositivas e soronegativas para o HIV, observa-se certa

homogeneidade dos grupos, o que é adequado do ponto de vista de pesquisa, lembrando que todas as pacientes apresentam algum grau de displasia cervical.

A média de idade de todas as pacientes (n=85) foi de 34 anos, sendo a idade mínima de 19 e máxima de 71 anos, em consonância com alguns estudos, como o de De Jong *et al.* (2004), Maluf *et al.* (2008) e Nimako *et al.* (1997). Ao individualizar os grupos, no das mulheres soropositivas para o HIV a média foi de 32,8 anos, com mínima de 21 e máxima de 55 anos, coincidindo com Kobayashi *et al.* (2004), em que a média de idade foi de 32 anos, variando de 21 a 46 anos. No grupo das soronegativas, a média foi de 35,3 anos, com mínima de 19 e máxima de 71 anos, corroborando Gonçalves, Soares e Donadi (2009), que também obtiveram média de idade entre as soronegativas de 36 anos, porém a média nas soropositivas foi menor, de 29 anos.

A faixa etária encontrada no presente estudo está de acordo com a de maior frequência de ocorrência das NICs, que é entre 20 e 49 anos, com pico maior entre 45 e 49 anos (MCMURRAY *et al.*, 2001), e coincidindo com a literatura, que referencia média de idade de 30 a 35 anos (ADURTHI *et al.*, 2008; AERSSSENS *et al.*, 2008; AHMED *et al.*, 2002; GILLES *et al.*, 2005;). Monnier-Benoit *et al.* (2006) também descreveram média de idade das pacientes com NIC de 35 anos.

Quanto à variável paridade, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com média de dois partos, como os estudos de Lodi *et al.* (2010), Gilles *et al.* (2005) e Bezerra *et al.* (2005), este último tendo ressaltado que quanto menos paridade, mais alto o percentual de mulheres com lesões cervicais. Outros estudos mostram que a multiparidade está associada à NIC 2 e NIC 3 e a câncer cervical quando há exposição e persistência do HPV de alto risco oncogênico (HILDESHEIM *et al.*, 2001; MUNOZ *et al.*, 2002).

Quanto à idade de início da vida sexual, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (soropositivas e soronegativas para o HIV), com a idade variando de 17 a 18 anos, em ambos os grupos.

Já é bem definido que o tabagismo faz parte do grupo de fatores de risco para o câncer cervical. Considerável número de mecanismos biológicos tem sido proposto para explicar tal fato e uma das hipóteses é de que os metabólitos do cigarro diminui a resposta imune local, aumentando a probabilidade de mais persistência do HPV e ocorrência de NICs. Há poucos trabalhos específicos sobre

os efeitos do cigarro em relação aos parâmetros imunes, mas o estudo prospectivo de Szarewski *et al.* (2001) avaliou os efeitos da parada do tabagismo nos níveis de linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) e CLs no colo uterino. Encontraram essa associação com aumento progressivo no número dessas células com a diminuição progressiva do número de cigarros consumidos e associação entre tabagismo pesado e persistência do HPV. No presente estudo, a proporção de fumantes e não fumantes nos grupos de soropositivas foi praticamente a mesma (36,2%/63,8%, respectivamente) e soronegativas (39,5%/60,5%) para o HIV. Desse modo, essa influência sobre a resposta imune local, se realmente existe, ocorreu igualmente nos dois grupos. Já a proporção de fumantes foi um pouco mais alta no grupo de NIC 2/3 (41%) em relação ao grupo de NIC 1 (33,3%), condizente com a situação de ser fator de risco para NIC 2/3.

Analisando os resultados de citologia realizada previamente à CAF, verificaram-se resultados normais em 38% das pacientes soropositivas para o HIV e em 23,7% das soronegativas, representando altos índices de resultados falso-negativos, visto que todas as pacientes deste estudo apresentavam algum grau de NIC na biópsia e na CAF. Estes achados estão de acordo com os de Fahey *et al.* (1995) e McGrory *et al.* (1999), que indicam a citologia oncótica como exame de baixa sensibilidade, variando de 30 a 87%, e especificidade variando de 86 a 100%. Fahey *et al.* (1995) ressaltaram, ainda, graves limitações do exame como ferramenta diagnóstica em populações com alta prevalência para NIC.

Os resultados da colposcopia e da biópsia pré-CAF mostraram-se compatíveis com os resultados da citologia oncótica, destacando-se alto percentual de colposcopia sugestiva de alteração grau II e NIC 2/3 nas pacientes soronegativas para o HIV e colposcopia grau I e NIC 1 nas soropositivas. Quando as pacientes foram submetidas à CAF, houve inversão do diagnóstico, com o agravamento das lesões no grupo de pacientes soropositivas para o HIV, o que pode se dever à multicentricidade das lesões no colo e também à discrepância de diagnóstico entre biópsia e CAF interobservador (interpatologista).

Embora a acurácia diagnóstica da colposcopia esteja bem-establishada (JORDAN, 1985) e, há vários anos, a biópsia dirigida pela colposcopia seja considerada forma mais adequada de se obter confirmação histológica de neoplasia intraepitelial cervical (BELLER; KHATAMEE, 1966; KIRKUP; HILL, 1980), alguns estudos enfatizam agravamento do grau da lesão quando

realizadas técnicas excisionais, em relação à biópsia prévia em mulheres infectadas pelo HIV (McINDOE *et al.*, 1989). E, ainda, que a biópsia dirigida pela colposcopia não melhora a acurácia diagnóstica na paciente soropositiva para o HIV comparada com a paciente soronegativa (BUXTON *et al.*, 1991; DEL PRIORE *et al.*, 1996; NAPPI *et al.*, 2005).

Das 47 pacientes soropositivas, apenas uma (2,1%) não era usuária de HAART. Sabe-se que a incidência de neoplasia do colo uterino não sofreu alteração significativa após o início do uso de HAART (BROCKMEYER; BARTHEL, 1998; GATES; KAPLAN, 2002).

Permanece controverso se o uso da terapia antirretroviral tem impacto na evolução das anormalidades cervicais, mas há dados da era pré-HAART que sugerem que as NICs nas mulheres infectadas pelo HIV apresentavam comportamento mais agressivo e com mais lesões de alto grau que entre mulheres não infectadas pelo HIV. Alguns autores sugeriram que as mulheres tratadas com HAART apresentaram regressão mais precoce dessas lesões (HEARD *et al.*, 2004; MOOREA *et al.*, 2002). Tal fato está, certamente, relacionado à persistência do HPV (AHDIEH *et al.*, 2000; AHDIEH *et al.*, 2001). Fife *et al.* (2009) relatam que com o uso das HAARTs houve declínio na detecção do HPV de 66 para 49%, após 96 semanas de seguimento de 146 mulheres soropositivas para o HIV. Outro estudo, entretanto, mostrou que a HAART não reduziu a prevalência e a persistência da infecção pelo HPV de alto risco ou não influenciou na evolução das NICs, comparando mulheres soropositivas tratadas e não tratadas (LILLO *et al.*, 2001).

O que se sabe é que essas terapias antirretrovirais reduzem a carga viral do HIV e, conseqüentemente, melhoram a imunidade sistêmica (RACHID; SCHECHTER, 2001). O valor da mediana do nível de linfócitos T CD4⁺ no sangue das pacientes soropositivas para o HIV era de 266 células / mm³, variando de 23 a 745 células/mm³, mostrando que eram pacientes que estavam com imunidade razoavelmente preservada. Além disso, as pacientes do presente estudo são uma pequena amostra de pacientes soropositivas que estão inseridas em um centro de tratamento especializado em HIV, recebendo atendimento em todas as áreas e que têm acesso ao que há de melhor no tratamento, o que traz a elas condições muito próximas das pacientes soronegativas.

Não foram encontrados, na literatura, dados quanto à influência das HAARTs na imunidade local (cervical). Apesar de aqui não se ter estudado especificamente a interferência das HAARTs na imunidade local, tem-se que admitir que pode ter interferido no fato de não se ter identificado diferença estatisticamente significativa na expressão dos marcadores imunológicos locais entre os grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, visto que a quase totalidade das nossas pacientes era de usuárias de HAART, com exceção de uma.

As pacientes também foram analisadas quanto ao grau de NIC, ou seja, todas as incluídas neste estudo foram distribuídas em dois grupos - o de NIC 2/3 e o de NIC 1 - de modo que em cada grupo havia pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV. Houve 46 (54,1%) casos de NIC 2/3 e 39 (45,9%) de NIC 1. No grupo das pacientes com NIC 2/3, foram 47,8% de pacientes soropositivas para o HIV e no grupo de pacientes com NIC 1, 64,1% de pacientes soropositivas. Essa predominância de soropositivas no grupo de NIC 1 se deve ao fato de que, na época, era protocolo no serviço de atendimento a essas pacientes, a indicação de CAF nas NICs 1, baseado em estudos como o de Soncini e Condemi (2003), que informaram que as NICs são significativamente mais frequentes e agressivas nas mulheres soropositivas para o HIV (38%), comparadas às soronegativas (12%) o que foi posteriormente confirmado por outros autores (BERRÉBI; BADIOU; DUCLUSAUD, 2008).

No entanto, estudos de caso-controle, como o de Moodley *et al.* (2006), confirmam que mulheres soropositivas para o HIV têm risco mais alto de infecção pelo HPV de alto risco (OR=4,6; intervalo de confiança - IC95% = 2,8-7,5) e NIC (OR = 41,3; IC95% = 18,8-90,5), mas não de câncer cervical invasor (OR = 1,17; IC95% = 0,8-1,9), achado este confirmado por publicação recente de nosso grupo de pesquisa, que mostrou incidência de NIC 1, à biópsia guiada por colposcopia alterada, de 72,3% e de NIC 2 e 3 de 27,7%, não tendo sido encontrado caso de câncer cervical invasor (LIMA *et al.*, 2009). Achados destes e outros estudos permitiram mudar o protocolo de conduta frente a estas lesões, no qual são acompanhadas as pacientes com NIC 1 de 6/6 meses e a indicação de tratamento (CAF) fica reservada para os casos de NIC 1 persistente (quatro exames consecutivos, semestrais, com NIC 1) ou recidivante (reaparecimento de NIC 1 após um ou mais exames normais no seguimento).

Não se detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de NIC 2/3 e NIC 1 quanto às variáveis idade, paridade, início de atividade sexual, número de parceiros e tabagismo. Quanto às variáveis citologia, colposcopia e biópsia pré-CAF, inferiu-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com achados compatíveis com o esperado. Verificou-se maior proporção de citologia alterada, colposcopia com alterações maiores e biópsia de NIC 2/3 no grupo de NIC 2/3; e o inverso disto no grupo de NIC 1, demonstrando boa correlação colpo-cito-histológica.

6.2 Análise dos marcadores CD3, CD4, CD8, CD56 e CD20 em relação à presença do HIV e em relação ao grau de lesão

6.2.1 Considerações gerais

O trato genital feminino contém todos os elementos essenciais para uma efetiva resposta imune aos patógenos genitais, comprovado por vários estudos já realizados, como o de Givan *et al.* (1997), que estimaram que os leucócitos presentes no trato genital representam 6 a 20% do total de células localizadas nas trompas de Falópio, endométrio, colo e mucosa cervical. E os linfócitos T correspondem a cerca de 50% de todos os leucócitos, com os linfócitos T CD8⁺ predominando sobre os linfócitos T CD4⁺, achado este confirmado por Johansson *et al.* (1999), que inclusive mostrou que a concentração dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ se dá principalmente logo abaixo do epitélio do colo uterino e vagina, bem como as células apresentadoras de antígenos.

É importante ressaltar a limitação da avaliação da resposta imune local pela contagem dessas células, como realizado no presente estudo, visto que esse microambiente imunológico pode ser afetado por hormônios, processos inflamatórios e infecciosos locais (EDWARDS *et al.*, 1995; PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005). Nos casos das cervicites e vaginites, pode haver aumento do número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no epitélio propriamente dito, sendo que no presente estudo a avaliação foi feita no estroma, no qual essa interferência pode ser menor (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005).

No colo uterino, vários estudos mostram mais concentração de linfócitos T, predominantemente T CD8⁺, e linfócitos B na JEC, que é a região onde ocorre a infecção pelo HPV e início das neoplasias intraepiteliais cervicais. A zona de transformação é o sítio de maior indução da imunidade celular. Estudos imunológicos sugerem o envolvimento dos linfócitos T nas lesões cervicais HPV-induzidas, mostrando, inclusive, o papel importante desses linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) no controle da infecção pelo HPV (BENTON *et al.*, 1996; COLEMAN *et al.*, 1994).

6.2.2 Técnica de imuno-histoquímica

O método escolhido para a realização deste estudo é, ainda, o mais usado para a pesquisa de imunomarcadores celulares e opção de vários outros pesquisadores, como Adurthi *et al.* (2008), Alves *et al.* (2010), Gonçalves, Soares e Donadi (2009), Kobayashi *et al.* (2004), Maluf *et al.* (2008), Monnier-Benoit *et al.* (2006), Nedergaard *et al.* (2007), Pudney, Quayle e Anderson (2005) e Woo *et al.* (2008). Essa técnica tem suas limitações, principalmente devido ao alto custo dos reagentes (anticorpos) e por depender de adequada padronização na concentração do anticorpo e escolha dos tampões a serem usados, para que funcione e fique adequada. Além do mais, depende muito das condições da peça a ser estudada, que, por sua vez, vai depender das condições e do tempo de armazenamento e qualidade da parafina em que foi conservada. Os passos que precedem a incubação dos anticorpos primários e secundários são fundamentais para que a técnica funcione como um todo e transcorra adequadamente.

Procurou-se diminuir as possibilidades de vieses, optando por anticorpos de qualidade, que foram da marca Novocastra, considerada excelente. A padronização prévia foi realizada com critério, com controles e todo o processo foi efetuado pelas mesmas pessoas, sendo cada marcador testado sempre na mesma bateria de exame (mesmo dia), diminuindo, assim, as interferências externas.

6.2.3 Imunomarcador CD3

É bom lembrar que o marcador CD 3 está presente em toda a população de linfócitos T, inclusive nos T auxiliares (CD 4⁺) e nos T citotóxicos (CD 8⁺). O marcador CD4 está presente em 60% dos linfócitos CD3⁺ e o marcador CD8 em 30% dos linfócitos CD3⁺.

Nossos achados mostram que a baixa expressão dos linfócitos T CD3⁺ predominou tanto nos grupos de soropositivas e soronegativas para o HIV quanto nas lesões de baixo e alto grau, mas um pouco mais (baixa expressão) nas pacientes soronegativas e nas lesões de alto grau, sem significância estatística. Seria esperada depleção desses linfócitos nas soropositivas para o HIV, por se tratar exatamente das células-alvo do HIV. No entanto, encontrou-se que essa baixa expressão dos linfócitos T CD3⁺ juntamente com a presença do HIV está mais associada às NICs 2/3 (OR=4,8), com força de associação positiva.

O estudo de Maluf *et al.* (2008) assevera que a forte expressão de linfócitos T CD3⁺ ocorreu mais nas pacientes com NIC 3 recorrente, sendo relacionado como preditor de mau prognóstico. A presente pesquisa, no entanto, mostra o inverso, cuja baixa expressão do CD3 é que esteve mais associada às NICs 2/3, mas teve-se a interferência do HIV, ou seja, a interação da baixa expressão com a presença do HIV. O estudo de Maluf *et al.* (2008) não avaliou pacientes soropositivas para o HIV.

Além disso, esta investigação não objetivou avaliar a associação da expressão dos imunomarcadores com evolução ou recorrência das neoplasias intraepiteliais e talvez por isso não se tenha encontrado essa predominância de linfócitos CD3⁺ nas nossas pacientes de NIC 3, em que não se tem essa informação exata quanto a serem recorrentes ou não.

Edwards *et al.* (1995) salientaram que a concentração desses linfócitos T CD3⁺ foi quatro vezes maior nas lesões invasoras, em relação às pré-neoplásicas. Em nosso estudo não existiram pacientes com lesões invasoras.

Nesta revisão não foram encontrados estudos comparando a expressão desse marcador (CD3) entre os grupos de soropositivas e soronegativas para o HIV.

6.2.4 Imunomarcador CD4

Analisando os grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do marcador CD4 (linfócitos T CD4⁺) com proporções semelhantes de alta e baixa expressão em soronegativas e soropositivas.

Seria esperada menor expressão desse marcador nas soropositivas, visto que estas apresentam diminuição sistêmica dos linfócitos T CD4⁺ e é sugerido que essa depleção seja causada pelo efeito direto da infecção pelo HIV ou por mecanismos imunológicos. No entanto, o estudo de Nicol *et al.* (2002) encontrou significativo número de linfócitos positivos para CD4 no colo uterino de pacientes coinfectadas HIV-HPV, achado esse controverso com o que é encontrado no sangue periférico. Essa coinfeção HIV-HPV é que pode ter determinado esse aumento de linfócitos T CD4⁺ local, pois há várias pesquisas que ressaltam diferenças qualitativas e quantitativas na resposta imune local de mulheres infectadas pelo HPV (COLEMAN *et al.*, 1994; TAY *et al.*, 1987). Poucos estudos demonstram essa diferença na coinfeção HIV-HPV. Na nossa análise também não foi pesquisada a presença do HPV paralelamente, não sendo possível, portanto, avaliar essa interferência do HPV na expressão dos linfócitos T CD4⁺. Poder-se-ia até partir do raciocínio de que, sabendo-se que as pacientes soropositivas para o HIV têm mais persistência do HPV, portanto, mais exposição a esse antígeno, haveria maior aporte local dos linfócitos T CD4. Ou seja, o efeito imunossupressor do HIV seria neutralizado pelo efeito imunoestimulador do HPV, eliminando a diferença de expressão desses linfócitos entre os dois grupos.

Em relação ao grau de lesão, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa na expressão dos linfócitos entre os grupos de NIC 2/3 e NIC 1, observou-se discreta predominância de alta expressão no grupo de NIC 2/3 (50%) em relação ao grupo de NIC 1 (41%) e de baixa expressão no grupo de NIC 1 (59%) em relação ao de NIC 2/3 (47,8%). Isso também foi documentado por Alves *et al.* (2010), com metodologia semelhante à do presente estudo e que descreve mais quantidade de linfócitos T CD4⁺ em amostras de NIC 2/3 e carcinoma, com $p=0,04$. Esse trabalho, inclusive, mostra a interferência do efeito do HPV, em que foi encontrada mais expressão de linfócitos T CD4 nas

amostras com alta carga viral do HPV. Mais uma pesquisa, portanto, mostrando a interferência do HPV.

Em contrapartida, outros autores mostram o inverso: predominância de maior expressão de T CD4+ nas lesões verrugosas e NIC 1 (COLEMAN; BIRLEY *et al.*, 1994; HONG *et al.*, 1997; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006).

Avaliações feitas com deficiência de linfócitos T CD4 resultaram em elevada prevalência de HPV, presença de lesões pré-invasivas e alto risco de progressão, evidenciando que esse tipo celular é importante para o controle da replicação viral e a supressão da transformação maligna (ARANY *et al.*, 1999; PALEFSKY, 1998; PETRY *et al.*, 1994).

Associação significativa entre o número de células imunocompetentes e o grau da neoplasia intraepitelial cervical foi demonstrada por alguns estudos, indicando que a resposta imune no estroma é fator-chave para a regressão da lesão ou sua progressão para o câncer cervical (MALUF *et al.*, 2008). Monnier-Benoit *et al.* (2006), avaliando populações celulares em lesões malignas e pré-malignas do colo uterino, verificaram que a quantidade de linfócitos T CD4 era maior nas NIC 1 e menor nas NIC 2/3 e câncer invasivo, controverso em relação aos nossos achados. E reportaram, ainda, que os linfócitos predominaram no estroma e epitélio das NICs 1, que regrediram, com alta taxa de CD4⁺/CD8⁺, comparado com as NICs 1, que progrediram, NICs 3 e câncer invasor.

6.2.5 Imunomarcador CD8

Analisando os grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV quanto à expressão para CD8 (linfócitos T CD8⁺), detectou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, devido à predominante baixa expressão no grupo das soronegativas para o HIV ($p=0,04$). Mas, de qualquer maneira, obteve-se alta expressão de linfócitos T CD8 em pelo menos 51% das pacientes soropositivas, o que não deixa de ser considerável. Essa baixa expressão predominante nas pacientes soronegativas para o HIV ocorreu tanto nas NICs 2/3 quanto nas NICs 1 (TAB. 11), mas com significância estatística apenas no grupo de NIC 2/3, ou seja, com expressiva baixa expressão de CD8 nas soronegativas com NIC 2/3. Na análise multivariada, a baixa

expressão do marcador CD8 apresentou força de associação negativa (OR=0,34) com a infecção pelo HIV.

É interessante ressaltar que, na análise univariada, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de linfócitos T CD8 entre os grupos de NIC 2/3 e NIC 1, com leve predominância da baixa expressão em ambos os grupos, principalmente no grupo de NIC 1.

Gonçalves, Soares e Donadi (2009) adotaram metodologia bem parecida com a do presente estudo, com 82 pacientes, das quais 35 eram soropositivas para o HIV, que também usaram a imuno-histoquímica para pesquisa de CD4 e CD8. No entanto, pesquisaram paralelamente HPV 16 e 18. E puderam observar que a presença do HPV 16 levou a importante diminuição na expressão dos linfócitos T CD8 nas pacientes soronegativas e soropositivas, mas principalmente nas soronegativas. Tal achado poderia ser uma das explicações para os nossos achados de importante diminuição na expressão de T CD8+ nas pacientes soronegativas, até porque no grupo das soronegativas houve expressiva proporção de NIC 2/3, em que a persistência do HPV é maior e é alta a prevalência do HPV 16. Mas não se pôde comprovar tal suposição, por não se ter pesquisado o HPV. Eles também relataram, como outros autores, expressão de linfócitos T CD8+ mais intensa, tanto estromal quanto epitelial, nas NICs 2/3 das pacientes soropositivas ($p=0,004$). Outros estudos com esses mesmos achados em relação ao HPV 16 foram os de Ahmed *et al.* (2002) e Bell *et al.* (2000).

Para Bell *et al.* (1995), o recrutamento de linfócitos ocorre nas mudanças neoplásicas do colo, presumivelmente devido à expressão do antígeno HPV, levando ao infiltrado de linfócitos B e T CD8+, resultando em decréscimo de células NK e linfócitos T CD4+. Tal decréscimo é mais devido ao influxo de linfócitos T CD8+ do que à diminuição do número absoluto de T CD4+ e células NK.

A metodologia empregada por Ahmed *et al.* (2001), que é semelhante à do presente estudo, revela aumento global de linfócitos T CD8+ na presença do HIV, ressaltando proporções significativamente aumentadas de linfócitos CD8+ em amostras de NIC. E essas proporções foram ainda mais altas nos casos de infecção do HIV. Esses autores, portanto, relacionaram esse aumento de linfócitos T CD8+ mais à presença de NIC do que do HIV. No entanto, havia um grupo de pacientes com colo normal sem HIV associado e eles descreveram esse

aumento global dos linfócitos T CD8⁺ nas soropositivas com NIC em relação ao grupo sem lesão/ HIV. No nosso estudo não teve esse grupo (colo normal sem HIV associado) para comparação, o que pode ter limitado a essa observação quanto à real interferência do HIV e da NIC na expressão desses linfócitos T CD8.

Adurthi *et al.* (2008) também manifestaram mais infiltrado de linfócitos T CD8⁺ nas lesões de alto grau (NIC 3) comparado às cervicites e a colos normais, sendo superado apenas pelo carcinoma invasor ($p < 0,001$)

Essa predominância de linfócitos T CD8⁺ no grupo de NIC 2/3 das pacientes soropositivas para o HIV foi referida por Kobayashi *et al.* (2002), que a associaram à pior resposta clínica nessas pacientes. Edwards *et al.* (1995) também constataram mais infiltrado de linfócitos T CD8⁺ nas lesões em evolução para invasão.

A distribuição de células imunocompetentes no trato genital inferior das mulheres soropositivas para o HIV foi identificada por Olaitan *et al.* (1996). Eles encontraram aumentado número de linfócitos T CD8⁺, mas reduzida habilidade citolítica, realçando limitada capacidade funcional quanto à produção de citocinas antivirais como IFN- γ .

Alves *et al.* (2010) também registraram predominância de linfócitos T CD8⁺ nas NICs 2/3 em relação às NICs 1 e colo normal, com significância estatística ($p = 0,02$), mas associado à carga viral acima de 100 unidades relativas de luz/ leitura dos contos positivos (RLU/PCB). Ou seja, mais um estudo que aborda a associação da resposta imune local com o HPV, principalmente em amostras cuja replicação viral está ocorrendo, o que se verifica principalmente nas lesões HPV-induzidas iniciais.

Outros estudos também têm confirmado esse aumento de linfócitos T CD8⁺ na presença de NIC, como Coleman *et al.* (1994), Edwards *et al.* (1995), Tay *et al.* (1987) e Woo *et al.* (2008). Esses autores sugerem que o aumento dos linfócitos T CD8⁺ é mais consequência do que causa das NICs.

Ao avaliar os linfócitos T CD8⁺, deve-se considerar que, para essas células estarem presentes, o reconhecimento antigênico e ativação realizada pelos linfócitos T CD4⁺ provavelmente já ocorreram. Esse fato permite a produção de citocinas cruciais para o recrutamento e ativação das células T CD8⁺. Concordando com esses achados, alguns pesquisadores observaram marcante presença desses linfócitos em amostras de NIC 2/3 e deduziram que o início da

fase efetora da resposta imune (T CD4) poderia já ter ocorrido nas NICs 2/3. Nas etapas anteriores, ou seja, nas NICs 1, poderiam estar ausentes os sinais necessários para a ativação de linfócitos T CD8⁺, como produção de IL-2 e presença de moléculas coestimulatórias (FRAZER, 2009).

O estudo de Kobayashi *et al.* (2004), usando metodologia muito semelhante a esta, que avaliou a imunidade cervical nas neoplasias intraepiteliais cervicais, teve um grupo de pacientes com colo normal, sem lesão. Puderam ver que, comparado ao colo normal, a expressão dessas células nas soropositivas com NIC 2/3 foi bem mais significativa, indicando efetiva capacidade de extravasão e emigração de linfócitos para as áreas de neoplasia intraepitelial cervical. E, ainda, que, a despeito da imunossupressão da paciente, as neoplasias de grau 2/3 são caracterizadas por um complexo infiltrado de células imunes tanto da resposta imune inata quanto da adquirida. A resposta imune local é caracterizada pela presença aumentada de todas essas células imunes descritas, além de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados. No entanto, por se tratar de um estudo transversal, e não de uma coorte, o papel funcional desse infiltrado linfocítico nas neoplasias intraepiteliais não pôde ser apurado, mas tudo indica que ambas as respostas imunes - inata e adquirida - são ativadas pelas neoplasias intraepiteliais cervicais. Baseando nos achados de Kobayashi *et al.* (2004), que consideraram também interleucinas, a infecção pelo HIV poderia suprimir propriedades funcionais da resposta imune local, incluindo produção de IFN- γ e citocinas regulatórias.

Isto poderia servir de base para nossos resultados, em que não foram detectadas, de maneira geral, diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão dos linfócitos entre os grupos de soropositivas e soronegativas para o HIV, visto que todas as pacientes apresentavam neoplasia intraepitelial cervical, a não ser de linfócitos T CD8⁺, que foram predominantemente menos expressivos nas soronegativas para o HIV.

6.2.6 Imunomarcador CD56

Analisando o padrão de expressão para CD 56, presente nas células NK, observou-se significância estatística entre os grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV. Apesar dos dois grupos não terem tido marcante expressão dessas células, 87,3% das pacientes do grupo das soropositivas tiveram baixa expressão. Ou seja, houve importante decréscimo dessas células nessas pacientes em relação às soronegativas, em consonância com Kobayashi *et al.* (2004), com metodologia bem parecida com a do presente estudo e que também notificaram densidades de células NK atenuadas nas soropositivas comparadas às soronegativas para o HIV.

Na análise univariada, inclusive, a baixa expressão para CD56 (NK) manifestou força de associação positiva com a presença do HIV. A chance da baixa expressão para CD56 ocorrer nas pacientes soropositivas foi de 4,5 vezes a chance da alta expressão ou de ocorrer nas soronegativas.

O presente estudo não encontrou relação estatística entre células NK (CD 56⁺) e os achados histopatológicos ($p=0,12$), comparado aos resultados de Alves *et al.* (2010). Nesse estudo, as células NK estavam presentes em pequenas quantidades nas NICs 1/2/3 e com qualquer carga viral sem significância estatística, confirmando nossos achados.

Em ambos houve baixa expressão dessas células tanto nas NICs 1 quanto nas NICs 2/3, apesar de ter havido um pouco mais de expressão nas NICs 2/3, mas sem significância estatística. Esses dados comparam-se aos de Woo *et al.* (2008), que acusaram mais predominância de células NK no estroma nas NICs 2/3, mas também sem significância estatística.

Bell *et al.* (1995), comparando colo normal ($n=20$) com colo displásico ($n=19$), descobriram células NK significativamente diminuídas no epitélio displásico ($p=0,03$), comparando com colo normal. Acredita-se que o recrutamento de linfócitos ocorre nas mudanças neoplásicas do colo, presumivelmente devido à expressão do antígeno HPV, levando a infiltrado de linfócitos B e T CD8⁺, resultando em decréscimo de células NK e linfócitos T CD4⁺. Tal decréscimo é mais devido ao influxo de linfócitos T CD8⁺ do que à diminuição do número absoluto de T CD4⁺ e células NK. Em contrapartida, Takehara *et al.* (1996) apuraram aumento das células NK concomitantemente ao

aumento do grau de lesão, sendo que o número dessas células estava aumentado quando comparado ao colo normal.

As células NK, conforme Frazer (2009), estavam presentes nas lesões com alta carga viral (HPV), mostrando que a existência dessas células é de grande importância nas fases iniciais da infecção, quando a paciente ainda não tem alteração neoplásica ou esta é de baixo grau. Ou seja, as células NK são atraídas para eliminar as células infectadas, que é o papel da imunidade inata. Nosso estudo não avaliou o HPV, não podendo, portanto, fazer esse tipo de avaliação.

Segundo Wu, Coleman e Higgins (1994), a progressão da lesão para a forma maligna costuma ser acompanhada pela resistência das células neoplásicas à lise pela célula NK, fato reversível a partir da imunoterapia. A resistência à lise das células neoplásicas pode acontecer pela diminuição da expressão de moléculas de classe I (MHC I), necessária ao reconhecimento da célula-alvo pela célula NK ou mesmo pela produção de fatores supressores da NK (GEORGOPOULOS; PROFFITT; BLAIR, 2000). A modulação da resposta imune poderia, então, estimular a expressão de MHC I ou a produção de citocinas tóxicas para a célula-alvo, por parte da NK.

Quanto aos achados de Wu, Coleman e Higgins (1994) comuns ao nosso estudo, foram: densidades de células NK atenuadas nas soropositivas comparadas às soronegativas para o HIV, além de maior expressão dos linfócitos T CD8⁺ nas soropositivas para o HIV

6.2.7 Imunomarcador CD20

O CD20 é o principal marcador dos linfócitos B, os quais estão envolvidos na imunidade humoral, que tem sido caracterizada no trato genital feminino. Kutteh *et al.* (1999) evidenciaram células plasmáticas secretando IgG e IgA na lâmina própria da endocérvice e vagina.

No presente estudo, observando os grupos de pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, obteve-se uma expressão ligeiramente predominante nas soropositivas para o HIV, mas sem significância estatística. Petter *et al.* (2000) demonstraram que as pacientes soropositivas para o HIV manifestaram forte resposta sorológica (humoral) anti-HPV, maior que nas soronegativas. A

provável explicação é de que as pacientes soropositivas para o HIV são expostas intensamente, por mais longo período de tempo, ao antígeno-HPV, o que desencadearia a produção dos anticorpos. Além disso, essas pacientes soropositivas apresentam mais deficiência na imunidade celular, o que, inclusive, facilita a ocorrência do completo ciclo de vida do HPV e subsequente indução dos anticorpos. Deste modo, nas pacientes soropositivas essa imunidade humoral é mais bem detectada (CARTER *et al.*, 1996; HEIM *et al.*, 1995; KIRNBAUER *et al.*, 1994), confirmando os nossos achados de um pouco mais de expressão dos linfócitos B nas soropositivas para o HIV em relação às soronegativas.

Comparando as pacientes dos grupos de grau NIC, as NICs 1 tiveram mais predominância de baixa expressão de CD20 em relação às NICs 2/3, com significância estatística limítrofe ($p=0,05$). Quando foram avaliadas o grau de expressão deste marcador com o status HIV e grau de NIC concomitantemente, observamos que a baixa expressão predominou com este $p=0,05$ (limítrofe), somente nas NICs 1. E confirmando tudo isso, a análise multivariada mostrou uma interação destas duas variáveis-resposta, HIV e grau de NIC, em relação ao grau de expressão dos linfócitos B. Ou seja, estas duas variáveis, baixa expressão e presença do HIV, juntas, mostraram uma força de associação negativa para NIC 1. Paralelamente aos achados de Petter *et al.* (2000), esta baixa expressão de CD20 poderia ser vista como vantajosa, visto que a alta expressão denota presença do HPV, e conseqüentemente, maior ocorrência de NIC e evolução para NIC 2/3.

Bell *et al.* (1995), comparando colo normal ($n=20$) e colo displásico ($n=19$), constataram linfócitos B sem diferença significativa entre colo displásico e normal.

Há poucas publicações a respeito da pesquisa direta dos linfócitos B CD20+, da imunidade humoral contra HPV e, conseqüentemente, das lesões HPV-induzidas, em mulheres soropositivas para HIV. Encontra-se muito mais informações sobre as imunoglobulinas (anticorpos) - IgA, IgM, IgG -, que são produtos diretos dos linfócitos B maduros, os plasmócitos.

6.3 Considerações finais

Na tentativa de encontrar algumas respostas para os presentes achados, particularmente em relação aos linfócitos T CD8+, viu-se que teria sido interessante se se tivesse correlacionado os dados deste estudo com informações sobre o HPV, se presente ou não, e quais os subtipos presentes. Como visto e descrito, todas essas células pesquisadas apresentam resposta imunológica ao HPV, que é o principal antígeno em questão, sendo a ocorrência ou não das NICs nada mais que, além de outros fatores, a consequência da interação do HPV com a resposta imunológica do hospedeiro.

O material usado neste trabalho foi parte do material usado em pesquisas anteriores por membros do nosso grupo e, inclusive, na pesquisa realizada por Lodi *et al.* (2010), em que foi pesquisado o HPV. Mas as nossas pacientes não foram exatamente as daquela pesquisa e, portanto, não tínhamos as informações sobre o HPV em todas as pacientes. Decidiu-se, então, não utilizar aqui essas informações, ficando a proposta de dar continuidade a este, futuramente, pesquisando-se o HPV.

Estudos como o de Santos *et al.* (2003) demonstraram que a carga viral do HPV de alto risco oncogênico pode ser usada como marcador de progressão para lesão pré-neoplásica e a investigação dessas células (T CD4+, T CD8+, NK) poderia elucidar melhor essa relação do agente infeccioso em questão e o sistema imune do hospedeiro.

Outra questão levantada nesta investigação foi a possibilidade de avaliar-se a progressão das lesões e sua recidiva, comparando com a resposta imune local em estudo longitudinal (coorte histórica, por exemplo). Woo *et al.* (2008) têm um braço constituído de uma coorte que enfatizou que os casos de lesões que regrediram tinham taxa CD8⁺/CD4⁺ mais alta comparados aos casos que progrediram. Em consonância, outros trabalhos salientaram que a mais alta taxa CD8⁺/CD4⁺ pode ser preditora de melhores resultados clínicos no colo uterino. Maluf *et al.* (2008) relataram que a forte expressão de linfócitos T CD3+ ocorreu mais nas pacientes com NIC 3 recorrentes, sendo relacionada como preditora de mau prognóstico.

E, por fim, entendeu-se que a caracterização da população de células no trato genital inferior, incluindo as responsáveis pela indução e função efetora da

imunidade celular, pode ser útil do ponto de vista de pesquisa, como, por exemplo, para o desenvolvimento de vacinas, na estratégia de tentar induzir imunidade local protetora.

7 CONCLUSÕES

- A baixa expressão dos linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B CD20⁺ e células NK CD56⁺ predominou tanto nas pacientes soropositivas quanto nas soronegativas para o HIV, sendo que as pacientes soronegativas tiveram menor expressão de linfócitos T CD8⁺ e as pacientes soropositivas menor expressão de células natural Killer CD56⁺.
- A baixa expressão dos linfócitos T CD3⁺ foi predominante nas pacientes com NIC 2/3. A baixa expressão dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T CD20⁺ e células NK (CD56⁺) foi predominante nas pacientes com NIC 1.
- Comparando as pacientes soropositivas e soronegativas para o HIV, encontrou-se que as células NK (CD56⁺) estão significativamente diminuídas nas pacientes soropositivas e os linfócitos T CD8⁺ significativamente diminuídos nas soronegativas para o HIV.
- Comparando os grupos de NIC, reconheceu-se que houve interação das variáveis-resposta HIV e grau de NIC na expressão dos linfócitos T CD3⁺ e T CD20⁺, em que a baixa expressão dos linfócitos T CD3⁺ com a presença do HIV associou-se às pacientes com NIC 2/3 e a baixa expressão dos linfócitos B (CD20⁺) com o HIV teve associação com pacientes com NIC 1.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 107 p.

ADURTHI, S. *et al.* Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Am J Repr Immunol**, v. 60, p. 55-65, 2008.

AERSSSENS, A. *et al.* Natural history and clearance of HPV after treatment of precancerous cervical lesions. **Histopathology**, v. 52, p. 381-86, 2008.

AHDIEH, L. *et al.* Cervical neoplasia and repeated positivity of human Papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and – seronegative women. **Am J Epidemiol**, v. 151, p. 1148-57, 2000.

AHDIEH, L. *et al.* Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human Papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. **J Infect Dis**, v. 184, p. 682-690, 2001.

AHMED, S.M. *et al.* Immunity in the female lower genital tract and the impact of HIV infection. **Scand J Immunol**, v. 54, p. 225-38, 2001.

AHMED, S.M. *et al.* The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV⁺ and HIV⁻ subjects. **Scand J Immunol**, v. 56, p. 204-11, 2002.

ALVES, D.B. *et al.* Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43 (4), p. 425-9, 2010.

ALVES, V.A.F. *et al.* **Manual de imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia**. São Paulo, cap.3; p.23-29, 1999.

ARANY, I. *et al.* Enhancement of the innate and cellular immune response in patients with genital warts treated with topical imiquimod cream 5%. **Antiviral Res**, v. 43, p. 55-63, 1999.

BALLAS, Z.K. *et al.* A patient with simultaneous absence of “classical” natural killer cells (CD3+, CD16+, and NKH1+) and expansion of CD3+, CD4-, CD8-, NKH1+ subset. **J Allergy Clin Immunol**, v. 85, p. 453-9, 1990.

BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BELL, M.C. *et al.* HIV⁺ patients have increased lymphocyte infiltrates in CIN lesions. **Gynecol Oncol**, v. 76, p. 315-9, 2000.

BELL, M.C. *et al.* CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. **Journal of Clinical Immunology**, v. 15, p. 130-36, 1995;

BELLER, F.K.; KHATAMEE, M. Evaluation of punch biopsy of the cervix under direct colposcopic observation (target punch biopsy). **Obstetric Gynecology**, v. 28, p. 622-25, 1966.

BENTON, E.C. *et al.* Human Papillomavirus in the immunosupressed. *In*. LACEY, C. (ed.). Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses. **Leeds; Leeds University Press**, p. 271-9, 1996.

BERRÉBI, A.; BADIOU, W.; DUCLUSAUD, A. Fréquence, persistance et récidence dès lésions à HPV du col utérin chez lês patientes séropositives pour le VIH. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 36, p. 521-24, 2008.

BETHWAITE, P.B. *et al.* Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. **Pathology**, v. 28, p. 321-27, 1996.

BEZERRA, S.J.S. *et al.* Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **J Brás DST**, v. 17, n.2, p.143-48, 2005.

BONTKES, H.J. *et al.* Human Papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. **Int J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 92-8, 2000.

BONTKES, H.J. *et al.* Immune responses against human Papillomavirus type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia: systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. **J Gen Virol**, v. 80, p. 409-417, 1999.

BOSCH, F.X.; de SANJOSÉ, S. Human papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 31, p. 3-13, 2003.

BOSCH, F.X. *et al.* Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v. 26 (Suppl 10), p. K1-16, 2008.

BOSCH, F.X. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 796-802, 1995.

BOSCH, F.X. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, p. 244-65, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados de aids do Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde Programa Nacional de DST e Aids, Brasília – DF, 2004. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: outubro de 2011.

BROCKMEYER, N.; BARTHEL, B. Clinical manifestation and therapies of AIDS associated tumors. **Eur J Med Res**, v. 23, p. 127-147, 1998.

BUXTON, E.J. *et al.* Colposcopically directed punch biopsy: a potentially misleading investigation. **Br J Obstetric & Gynaecology**, v. 98, p. 1273-76, 1991.

CARDILLO, M. *et al.* CD4 T cell count, viral load and squamous intraepithelial lesions in women infected with the human immunodeficiency virus. **Cancer**, v. 93, p. 111-4, 2001.

CARTER, J.J. *et al.* The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 927-36, 1996.

CHAO, H.T. *et al.* Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 20; p. 136-40, 1999.

CLARKE, B.; CHETTY, R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, n. 1, p. 19-24, 2002.

CLERICI, M. *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human Papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 3, p. 245-250, 1997.

CLIFFORD, G.M. *et al.* Human Papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 63-73, 2003.

COLEMAN, N.; BIRLEY, H.D. *et al.* Immunological events in regressing genital warts. **Am J Clin Pathol**, v. 102, n. 6, p. 768-74, 1994.

COLEMAN, N. *et al.* Characterization and functional analysis of the expression of vascular adhesion molecules in human papillomavirus-related disease of the cervix. **Cancer**, v. 74, p. 884-92, 1994.

COLEMAN, N.; STANLEY, M.A. Analysis of HLA-DR expression on keratinocytes in cervical neoplasia. **Int J Cancer**, v. 56, n. 3, p. 314-9, 1994.

DANIEL, D. *et al.* CD4+ T-cell-mediated antigen-specific immunotherapy in a mouse model of cervical cancer. **Cancer Res**, v. 65, p. 2018-25, 2005.

DE JONG, A. *et al.* Frequent detection of human Papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. **Cancer Res**, v. 62, p. 472-9, 2002.

DE JONG, A. *et al.* Human Papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5449-55, 2004.

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

DEL PRIORE, G. *et al.* Colposcopic biopsies versus loop electrosurgical excision procedure cone histology in human immunodeficiency virus-positive women. **J Reprod Med**, v. 41, p. 653-657, 1996.

DIEFENBACH, A.; RAULET, D.H. The innate immune response tumors and its role in the induction of T-cell immunity. **Immunol Rev**, v. 188, p. 9-21, 2002.

DOOBAR, J. The Papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, v. 32 (Suppl 1), p. S7-15, 2005.

DUERR, A. *et al.* Human Papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 184, p. 584-590, 2001.

DUNN, G.P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 991-998, 2002.

EDWARDS, R.P. *et al.* T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion. **Cancer**, v. 76, p. 1411-5, 1995.

FAHEY, M.T. *et al.* Meta-analysis of pap test accuracy. **Am J Epidemiol**, v. 141, n. 7, p. 680-89, 1995.

FERNANDES, P.C Jr *et al.* Circulating neutrophil may play a role in the host response in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, n. 5, p. 1068-74, 2007.

FIFE, K.H. *et al.* Prevalence and persistence of cervical human papillomavirus infection in HIV-positive women initiating highly active antiretroviral therapy. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 51, n. 3, p. 274-82, 2009.

FRANCO, E.L.; HARPER, D.M. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. **Vaccine**, v. 23, p. 2388-94, 2005.

FRAZER, I.H. Correlating immunity with protection for HPV infection. **Int J Infect Dis**, v. 11(Suppl 2), p. S10-S16, 2007.

FRAZER, I.H. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. **Virol**, v. 384, p. 410-14, 2009.

FRAZER, I.H. Prevention of cervical cancer through Papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 46-54, 2004.

FREGA, A. *et al.* Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human Papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. **Cancer Lett**, v. 196, p. 127-134, 2003.

FRISCH, M. *et al.* Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. **JAMA**, v. 285, p. 1736-45, 2001.

FRUCHTER, R.G. *et al.* Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. **Obstet Gynecol**, v. 87, p. 338-44, 1996.

GATES, A.E.; KAPLAN, L.D. AIDS malignancies in era of highly active antiretroviral therapy. **Oncology**, v. 16, p. 657-65, 2002.

GEORGOPOULOS, N.T.; PROFFITT, J.L.; BLAIR, G.E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP 1 and LMP2 genes by human Papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene**, v. 19, p. 4930-35, 2000.

GIANNINI, S.L. *et al.* 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. 183-9, 1998.

GIANNINI, S.I. *et al.* Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Int J Cancer**, v. 97, p. 654-9, 2002.

GILLES, C. *et al.* Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. **Gynecol Oncol**, v. 96, p. 112-118, 2005.

GIVAN, A.L. *et al.* Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. **Am J Reprod Immunol**, v. 38, p. 350-59, 1997.

GONÇALVES, M.A.; SOARES, E.G.; DONADI, E.A. The influence of human Papillomavirus type and HIV status on the lymphomononuclear cell profile in patients with cervical intraepithelial lesions of different severity, **Infect Agent Cancer**, v. 4, p. 11, 2009.

GUZMÁN-ROJAS, L. *et al.* Perspectiva para El desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra câncer cervico-uterino. **Salud Publica Mex**, v. 40, p. 38-46, 1998.

HARARI, A. *et al.* Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. **Immunol Rev**, v. 211, p. 236-54, 2006.

HAYATI, A.R.; ZULKARNAEN, M. An Immunohistochemical Study of CD1a and CD83-Positive Infiltrating Dendritic Cell Density in Cervical Neoplasia. **Int J Gyn Pathol**, v. 26, p. 83-88, 2006.

HEBNER, C.M.; LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**, v. 16, p. 83-97, 2006.

HEARD, I. *et al.* The impact of HIV antiviral therapy on human papillomavirus (HPV) infections and HPV-related diseases. **Antiviral Therapy**, v. 9, p. 13-22, 2004.

HEIM, K. *et al.* Serum IgG, IgM, and IgA reactivity to human Papillomavirus types 11 and 6 virus like particles in different gynecologic patient groups. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 395-402, 1995.

HILDERS, C.G. *et al.* Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma. **Lab Invest**, v. 60, p. 651-9, 1993.

HILDESHEIM, A. *et al.* HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **Br J Cancer**, v. 84, n. 9, p. 1219-26, 2001.

HO, G.Y. *et al.* Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med**, v. 338, p. 423-8, 1998.

HONG, K. *et al.* Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts. **J Virol**, v. 71, n. 9, p. 6427-32, 1997.

HOOTS, B.E. *et al.* Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **Int J Cancer**, v. 124, p. 2375-83, 2009.

HUBERT, P. *et al.* Colonization of in vitro formed cervical human Papillomavirus associated (pre) neoplastic lesions with dendritic cells. **Am J Pathol**, v. 154, p. 775-84, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2010**. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=mapa_neoplasia.asp. Acesso em: outubro de 2011.

JACOBS, N. *et al.* Distinct T cell subsets and cytokine production in cultures derived from transformation zone and squamous intraepithelial lesion biopsies of the uterine cervix. **Am J Reprod Immunol**, v. 49, p. 6-13, 2003.

JANEWAY JR, C.A. *et al.* **Imunobiologia**: O sistema imune na saúde e na doença. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 101p.

JENNE, D.E.; TSCHOPP, J. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. **Immunol Rev**, v. 103, p. 53-71, 1988.

JOHANSSON, E.L. *et al.* Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. **Immunology**, v. 96, p. 272-7, 1999.

JORDAN, J.A. Management of CIN, VAIN and VIN. In: SHEPHERD, J.H.; MONAGHAN, J.M. editors. **Clin Gynaecol Oncol**, Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.38-53, 1985.

KADISH, A.S. *et al.* Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human Papillomavirus (HPV) infection is association with cell-mediated immune responses to an type 16 E7 peptide. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 5, p. 483-8, 2002.

KADISH, S.A. *et al.* Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome to HPV infection and associated neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, p. 1285-93, 1997.

KIRKUP, W.; HILL, A.S. The accuracy of colposcopically directed biopsy in patients with suspected intraepithelial neoplasia of the cervix. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 87, p. 1-4, 1980.

KIRNBAUER, R. *et al.* A virus like particle enzyme linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, p. 494-99, 1994.

KOBAYASHI, A. *et al.* Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Res**, v. 64, p. 6766-74, 2004.

KOBAYASHI, A. *et al.* Lymphoid follicles are generated in high-grade cervical dysplasia and have differing characteristics depending on HIV status. **Am J Pathol**, v. 160, p. 151-64, 2002.

KOBAYASHI, A. *et al.* Recent developments in understanding the immune response to Human Papilloma Virus infection and cervical neoplasia. **Oncol Nurs Forum**, v. 27, n. 4, p. 643-51, 2000.

KOSHIOL, J. *et al.* Persistent human Papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **Am J Epidemiol**, v. 168, n. 2, p. 123-37, 2008.

KOSHIOL, J.E. *et al.* Time to clearance of human Papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. **Int J Cancer**, v.119, n. 7, p. 1623-9, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (ed.). **Robins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1592, 2005.

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 211-22, 2004.

KUTTEH, W.H. Mucosal immunity in the female reproductive tract. In: Ogra, P.L.; Mestecky, J.; Lamm, M.E.; Strober, W.; Bienenstock, J.; McGhee, J.R., (eds.), **Mucosal Immunology**. New York: Academic Press, p. 1423-35, 1999.

LEE, B.N. *et al.* Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4⁺ T cells of human with human papillomavirus-related high grade squamous intraepithelial lesions. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 2, p. 239-44, 2004.

LEE, S.J. *et al.* Both E6 and E7 oncoproteins of human Papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. **J Immunol**, v. 167, p. 497-504, 2001.

LEHTINEN, M. *et al.* Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. **APMIS**, v. 101, n. 11, p. 833-7, 1993.

LEVI, G. *et al.* Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 31, n. 2, p. 178-84, 2005.

LEVI, J.E. *et al.* Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecol Oncol**, v. 92, n. 1, p. 225-31, 2004.

LEVI, J.E. *et al.* Prevalence of human Papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 9, p. 3341-5, 2002.

LEWI, D.S. *et al.* Síndrome da imunodeficiência adquirida. *In*: BORGES, D.R.; ROTHSCHILD, H.A. (ed.). **Atualização terapêutica**. São Paulo: Artes Médicas, p. 288-93, 2003.

LIAW, K.L. *et al.* A prospective study of human Papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. **J Infect Dis**, v. 183, n. 1, p. 8-15, 2001.

LICHTENHELD, M.G. *et al.* Structure and function of human perforin. **Nature**, v. 335, p. 448-51, 1988.

LILLO, F.B. *et al.* Determination of human Papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 3, p. 451-7, 2005.

LILLO, F.B. *et al.* Human papillomavirus infection and associated cervical disease in human immunodeficiency virus-infected women: effect of highly active antiretroviral therapy. **J Infect Dis**, v. 184, n. 5, p. 547-51, 2001.

LIMA, M.I. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. **Int J Gynecol Obstet**, v. 104, p. 100-4, 2009.

LODI, C.T. *et al.* Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization in HIV-infected and noninfected women. **Arch Gynecol Obstet**, v. 284, p. 191-197, 2010.

LYONS, F.; PRENDIVILLE, W.; MULCAHY, F. Cervical disease in Hiv-1-positive women: a review. **Int J STD AIDS**, v. 15, n. 2, p. 89-92, 2003.

MACIAG, P.C. Imunologia das infecções por papilomavirus humano e lesões genitais. *In*: MARTINS, N.V.; RIBALTA, J.C.L.. (ed.). **Patologia do trato genital inferior**. 1. ed.,cap. 8, São Paulo: Roca, p. 79-105, 2005.

MAIMAN, M. Managment of cervical neoplasia in human immunodeficiency vírus-infected women. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 23, p. 43-9, 1998.

MALUF P.J. *et al.* T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Arch Gynecol Obstet**, v. 278, n. 6, p. 525-30, 2008.

MATLOUBIAN, M.; CONCEPCION, R.J.; AHMED, R. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. **J Virol**, v. 68, n. 12, p. 8056-63, 1994.

MATSUMOTO, K. *et al.* IgG antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Lett**, v. 231, n. 2, p. 309-13, 2006.

MATTHEWS, K. *et al.* Depletion of Langerhans cells in human Papillomavirus type 16-infected skin is associated with E-6 mediated down regulation of E-cadherin. **J Virol**, v. 77, n. 15, p. 8378-85, 2003.

McGRORY, D.C. *et al.* **Evaluation of cervical cytology**. Evidence Report Technology Assessment, Rockville, p. 1-6, 1999.

McINDOE, G.A. *et al.* Laser excision rather than vaporization: the treatment of choice for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet Gynecol**, v. 74, p. 165-68, 1989.

McMURRAY, H.R. *et al.* Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 1, p. 15-33, 2001.

MELNIKOW, J.J. *et al.* Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol**, v. 92, p. 727-35, 1998.

MICHELIN, M.A. *et al.* Resposta imune nas lesões intraepiteliais do colo uterino. **Femina**, v. 36, n. 1, p. 9-13, 2008.

MONNIER-BENOIT, S. *et al.* Immunohistochemical analysis of CD4⁺ CD8⁺ T cell subsets in high risk human Papillomavirus – associated pre-malignant lesions of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, v. 102, n. 1, p. 22-31, 2006.

MOODLEY, J.R. *et al.* HIV and pre-neoplastic and neoplastic lesions of the cervix in South Africa: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 6, p. 135, 2006.

MOOREA, A.L. *et al.* Highly Active Antiretroviral Therapy and cervical intraepithelial neoplasia. **AIDS**, v. 16, p. 927-929, 2002.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Persistence of human Papillomavirus infection in HIV-infected and uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. **J Infect Dis**, v. 190, n. 1, p. 37-45, 2004a.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Risk of high-grade squamous intraepithelial lesion in HIV-infected adolescents. **J Infect Dis**, v. 190, n. 8, p. 1413-21, 2004b.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Updating the natural history of HPV and anogenital cancer: chapter 5. **Vaccine**, v. 24 (Suppl 3), p. 42-51, 2006.

MOTA, F. *et al.* The antigen presenting environment in normal and human Papillomavirus (HPV) related premalignant cervical epithelium. **Clin Exp Immunol**, v. 116, n. 1, p. 33-40, 1999.

MUNGER, K. *et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **J Virol**, v. 78, n. 21, p. 11451-60, 2004.

MUNOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSE, S. Epidemiologic classification of human Papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 518-27, 2003.

MUNOZ, N. *et al.* Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. **Br J Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1184-90, 2009.

MUNOZ, N. *et al.* Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1080-1, 2002.

MURPHY, K.M.; REINER, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 12, p. 933-44, 2002.

NAPPI, I. *et al.* Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence and progression, in treated and untreated women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 121, p. 226-32, 2005.

NEDERGAARD, B.S. *et al.* Low density of CD3, CD4 and CD8 cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. **Br J Cancer**, v. 97, n. 8, p.1135-8, 2007.

NICHOLLS, P.K. *et al.* Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. **Virology**, v. 283, n. 1, p. 31-9, 2001.

NICOL, A.F. *et al.* Cervical immunity response induced by HPV and the influence of HIV-1 co-infection. **XIV International AIDS Conference**, Monduzzi Editore, Barcelona, p. 117-21, 2002.

NICOL, A.F. *et al.* Immune factors involved in the cervical immune response in the HIV/HPV co-infection. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 1, p. 84-8, 2008.

NICOL, A.F.; FERNANDES, A.T.; BONECINI-ALMEIDA, M.D.A.G. Immune response in cervical dysplasia induced by human Papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection – Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2005.

NILGES, K. *et al.* Human Papillomavirus type 16 E7 peptide-directed CD8+ T cells from patients with cervical cancer are cross-reactive with the coronavirus NS2 protein. **L Virol**, v. 77, n. 9, p. 5464-74, 2003.

NIMAKO, M. *et al.* Human Papillomavirus-specific Cytotoxic T Lymphocytes in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia grade III. **Cancer Res**, v. 57, p. 4855-61, 1997.

NOBBENHUIS, M.A. *et al.* Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. **Lancet**, v. 358, n. 9295, p. 1782-1783, 2001.

OERKE, S. *et al.* Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 114, n. 5, p. 766-78, 2005.

OLAITAN, A.E. *et al.* The distribution of immunocompetent cells in the genital tract of HIV-positive women. **AIDS**, v. 10, p. 759-64, 1996.

OSTOR, A.G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol**, v. 12, p. 186-92, 1993.

PALEFSKY, J.M. Biology of HPV in HIV infection. **Adv Dent Res**, v. 19, n. 1, p. 99-105, 2006.

PALEFSKY, J.M. *et al.* Cervicovaginal human Papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 3, p. 226-36, 1999.

PALEFSKY, J.M.; GILLISON, M.L.; STRICKLER, H.D. HPV vaccines in immunocompromised women and men. **Vaccine**, v. 24 (Suppl 3), p. S3/140-6, 2006.

PALEFSKY, J.M. HPV vaccines in immunocompromised women and men. **Curr Opin Oncol**, v. 15, p. 382-88, 2003.

PALEFSKY, J.M. Human Papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 28, p. 15-20, 1998.

PENN, I. Cancers of the anogenital region in renal transplant recipients. Analyses of 65 cases. **Cancer (Phila)**, v. 58, p. 611-6, 1986.

PETRY, K.U. *et al.* Cellular immunodeficiency enhances the progression of human Papillomavirus-associated cervical lesion. **Int J Cancer**, v. 57, p. 836-40, 1994.

PETTER, A. *et al.* Specific serum IgG, IgM and IgA antibodies to human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 and 31 virus-like particles in human immunodeficiency virus-seropositive women. **J Gen Virol**, v. 81, p. 701-08, 2000.

PIERSMA, S.J. *et al.* 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**, v. 67, n. 1, p. 354-61, 2007.

PIERSMA, S.J. *et al.* Human papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and DP as a restriction element. **Int J Cancer**, v. 122, n. 3, p. 486-94, 2008.

PINZON-CHARRY, A. *et al.* Population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. **Neoplasia**, v. 7, n. 12, p. 1112-22, 2005.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human Papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5, n. 1, p. 24-31, 2008.

PUDNEY, J.; QUAYLE, A.J.; ANDERSON, D.J. Immunological Microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. **Biol Reprod**, v. 73, n. 6, p. 1253-63, 2005.

QUEIROZ, C.M.P. **HPV: epidemiologia e oncogênese.** Curso de atualização dos aspectos diagnósticos e prognósticos em lesões induzidas pelo HPV no colo uterino e na coinfeção HPV-HIV, p. 11-5, 2007.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV / AIDS.** Revinter. 1-189, 2001.

REAGAN, J.W.; HARMONIC, M.J. Dysplasia of the uterine cervix. New York: **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, p. 662-682, 1956.

RICHARDSON, H. *et al.* Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human Papillomavirus infections in a cohort of university students. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 5, p. 1149-56, 2005.

RICHART, R.M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathol Annu**, v. 8, p. 301-28, 1973.

ROBERTS, J.N. *et al.* Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by monoxinol-9 and inhibited by carrageenan. **Nat Med**, v. 13, n. 7, p. 857-61, 2007.

SANTOS, A.L.F. *et al.* Human papillomavirus viral load in predicting high grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. **São Paulo Med J**, v. 121, p. 238-43, 2003.

SAHEBALI, S. *et al.* Stromal issues in cervical cancer: a review of the role and function of basement membrane, stroma, immune response and angiogenesis in cervical cancer development. **Eur J Cancer Prev**, v. 19, n. 3, p. 204-15, 2010.

SARKAR, A.K. *et al.* Inverse correlation of cellular immune responses specific to synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in a cross-sectional study. **Gynecol Oncol**, v. 99 (3 suppl 1), p. S251-61, 2005.

SCHIFFMAN, M.H. *et al.* HPV DNA testing in cervical cancer screening results from women in a high-risk province of Costa Rica. **JAMA**, v. 283, n. 1, p. 87-93, 2000.

SCHIFFMAN, M.H.; KJAER, S.K. Chapter 2: Natural history of anogenital human Papillomavirus infection and neoplasia. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 31, p. 14-9, 2003.

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. 394-8, 1992.

SCHUMAN, P. *et al.* Longitudinal study of cervical squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. **J Infect Dis**, v. 188, n. 1, p. 128-36, 2003.

SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A.B. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 2, p. 209-20, 2001.

SELTZER, V.; DOYLE, A.; KADISH, A.S. Natural cytotoxicity in malignant and premalignant cervical neoplasia and enhancement of cytotoxicity with interferon. **Gynecol Oncol**, v. 15, n. 3, p. 340-9, 1983.

SELVAKUMAR, R. *et al.* Regression of papillomas induced by cottontail rabbit Papillomavirus is associated with infiltration of CD8⁺ cells and persistence of viral DNA after regression. **J Virol**, v. 71, n. 7, p. 5540-8, 1997.

SERESINI, S. *et al.* IFN-gamma produced by human papilloma virus-18 E6-specific CD4⁺ T cells predicts the clinical outcome after surgery in patients with high-grade cervical lesions. **J Immunol**, v. 179, n. 10, p. 7176-83, 2007.

SHACKLETT, B.L. Cell-mediated Immunity to HIV in the Female Reproductive Tract. **J Reprod Immunol**, v. 83, n. 1-2, p. 190-5, 2009.

SMITH, J.S. *et al.* Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621-32, 2007.

SONCINI, E.; CONDEMI, V. Intraepithelial cervical carcinoma and HIV, Prevalence, risk factors and prevention strategies. **Minerva Gynecol**, v. 55, n. 1, p. 51-5, 2003.

STANLEY, M.A. *et al.* Cell mediated immunity and lower genital tract neoplasia. **RCGO monograph**; 2003.

STANLEY, M.A. Genital human papillomavirus infection-current and prospective therapies. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 31, p. 117-24, 2003.

STANLEY, M.A. Immune responses to human Papilloma viruses. **Indian J Med Res**, v. 130, n. 3, p. 266-76, 2009.

STANLEY, M.A. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24 (Suppl1), p. S16-22, 2006.

STEELE, J.C. *et al.* T-cell responses to human Papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. **Br J Cancer**, v. 93, n. 2, p. 248-59, 2005.

SUN, X.W. *et al.* Human Papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstet Gynecol**, v. 85 (5 Pt 1), p. 680-6, 1995.

SZAREWSKI, A. *et al.* The effect of stopping smoking on cervical Langerhans' cells and lymphocytes. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 108, p. 295-303, 2001.

SYRJANEN, S. *et al.* The history of papillomavirus research. **Cent Eur J Public Health**, v. 16, p. 7-13, 2008.

TAKEHARA, K. *et al.* Local immune responses in uterine cervical carcinogenesis. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v. 48, n.11, p. 1063-70, 1996.

TAY, S.K. *et al.* Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 94, p. 16-21, 1987.

TRIMBLE, C.L. *et al.* Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T Cells from dysplastic epithelium. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p. 7107-14, 2010.

TRIMBLE, C.L. *et al.* Spontaneous regression of high- grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 13, p. 4717-23, 2005.

TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. The epidemiology of genital human Papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24 (Suppl 1), p. S1-15, 2006.

UNAIDS. **AIDS epidemic update**. 2007. Disponível em: [http://data.unaids.org/pub/FactSheet/2008/\(epi07_fs_regionalsummary_subsafrica_en.pdf\)](http://data.unaids.org/pub/FactSheet/2008/(epi07_fs_regionalsummary_subsafrica_en.pdf)).

UNAIDS. **Report on the global AIDS epidemic**. 2004. Disponível em://www.unaids.org/bangkok2004.

UTHAISANGSOOK, S. *et al.* Innate immunity and its role against infections. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 88, n. 3, p. 253-64, 2002.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **Eur J Cancer**, v. 38, n. 17, p. 2229-42, 2002.

WALBOOMERS, J.M. *et al.* Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v. 189, n. 1, p. 12-9, 1999.

WALTER, E.A. *et al.* Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. **N Engl J Med**, v. 333, n. 16, p. 1038-44, 1995.

WEAVER, B.A. Epidemiology and natural history of genital human Papillomavirus infection. **J Am Osteopath Assoc**, v. 106 (3 Suppl 1), p. S2-8, 2006.

WELTERS, M.J. *et al.* Frequent display of human Papillomavirus type 16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. **Cancer Res**, v. 63, n. 3, p. 636- 41, 2003.

WHEELER, C.M. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 519-36, 2008.

WOO, Y.L. *et al.* Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. **BJOG**, v. 115, n. 13, p. 1616-21, 2008.

WRIGHT, T.C.; KURMAN, R.J.; FERENCY, A. Precancerous lesions of the cervix. *In*: KURMAN, R.J. (ed.). **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract**. 5th ed. Baltimore: Springer Verlag, p. 253-324, 2002.

WRIGHT JR., T.C.; SCHIFFMAN, M. Adding a test for human Papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. **N Engl J Med**, v. 348, p. 489-490, 2003.

WU, R.; COLEMAN, N.; HIGGINS, G. Lymphocyte-mediated cytotoxicity to HPV 16 infected cervical keratinocytes. *In*: STANLEY, M.A. (ed.). **Immunology of human papillomaviruses**. Plenum Press, p. 255-59, 1994.

ZIMMERMMANN, J.B.; MELO, V.H. Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano na cérvix uterina de pacientes infectadas com o vírus da imunodeficiência humana e sua associação com o grau das lesões do colo uterino. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 24, n. 6, p. 419, 2002.

ZIMMERMMANN, J.B. **Resposta imune local às lesões HPV-induzidas do colo uterino em pacientes portadoras e não portadoras do vírus da**

imunodeficiência humana. 2008. 99f. (Doutorado em Ginecologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 9, p. 690-8, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**, v.1288 (2), p.F55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc Assoc Am Physicians**, v.111, p.581-7, 1999a.

ZUR HAUSEN, H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human Papillomavirus genotypes. **Semin Cancer Biol**, v.9(6), p.405-11, 1999b.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260-5, 2009.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – Preparo das soluções utilizadas durante técnica de imunohistoquímica

1 – TAMPÃO CITRATO pH 6,0

- Ácido cítrico mono-hidratado - 2,1 g
- Água destilada - 1 litro

Dissolver o ácido cítrico em água destilada. Acertar o pH da solução com NaOH 2N.

2 – SOLUÇÃO TAMPÃO PBS (*Phosphate buffered saline*)

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ – 1,38 g
- H_2HPO_4 – 6,96 g
- NaCl – 7,2 g
- Diluí-los em 1 litro de água destilada, checar o pH e guardar na geladeira

3 – SOLUÇÃO TAMPÃO TBS

Solução estoque: 6,06 g de Tris HCl
1,39 g de Tris base
100 mL de água destilada

Solução estoque: solução salina de 0,15 M
0,89 g de NaCl
100 mL de água destilada

Solução para uso: TBS 1/10: diluir uma parte de Tris HCl pH 7,6 em 9 partes de solução salina 0,15 M.

4 – SOLUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (50 mL)

- Peróxido de hidrogênio – 5 mL
- Metanol – 45 mL

5 – SOLUÇÃO TRIS-HCl 20 mM

- Tris – 2,4 g
- Cloreto de sódio – 8,5 g
- Completar volume para 1.000 mL com água destilada e acertar pH para 7,4 usando solução de HCl

6 – Leite desnatado a 10%

- Tris HCl 1x – pH 7,6 – 200 mL
- Leite desnatado Molico – 10 g

7 – DAB (Diaminobenzidina)

- DAB sólido (pastilhas ou em pó) – 25 mg
- Tampão Tris-HCl 20Mm – 100 mL
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 volumes
- Conservar em geladeira

No momento do uso: 1 mL do tampão + 1 gota de DAB

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido - adendo

Título do projeto: “PROGRAMA MULTICÊNTRICO PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DAS LESÕES CERVICAIS DE ALTO RISCO E DO CÂNCER CÉRVICO-UTERINO EM MULHERES PORTADORAS DO HIV”, aprovado pelo COEP em 2002 (COEP 089/02).

Este adendo permitirá que as pacientes voluntárias que participam do Programa Multicêntrico possam também participar do estudo “Resposta imune local associada ao HPV e/ou à Neoplasia Intraepitelial Cervical, em mulheres portadoras e não portadoras do HIV”.

Está sendo feito estudo no estado de Minas Gerais com as mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) para detectar lesões que levam ao câncer no colo uterino dessas mulheres.

Este estudo está sendo patrocinado pela FAPEMIG. O Dr. Victor Hugo de Melo é o coordenador desta pesquisa na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no estado de Minas Gerais.

Você está sendo convidada para completar sua participação neste estudo. Este aditivo de termo de consentimento lhe dará informações sobre o complemento do estudo. Você poderá fazer perguntas a qualquer momento. Se você decidir entrar no estudo será solicitado que assine este aditivo de termo de consentimento.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença que destrói o sistema imunológico do organismo (defesas do organismo para combater as infecções), deixando uma pessoa incapaz de lutar contra doenças que ameaçam a vida.

Pretendemos com este estudo obter informações sobre a associação que existe entre a diminuição das defesas do organismo e a presença do papilomavírus humano (HPV), outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), levando a lesões pré-cancerosas e cancerosas no colo uterino das mulheres portadoras do HIV. Além disto, temos como objetivo avaliar a resposta imune local (no colo uterino) associada à presença do HPV e/ou às lesões pré-cancerosas. Isto significa que vamos avaliar também as defesas locais (vaginal e colo uterino) aos tipos de HPV que são cancerígenos.

Estas informações serão usadas para melhorar o acompanhamento e tratamento das lesões no colo uterino, prevenindo o câncer, porque mais de 80% das mulheres infectadas pelo HIV são portadoras do HPV (vírus que pode causar o câncer no colo uterino).

Os procedimentos realizados neste estudo são os mesmos que você receberia caso opte por não participar dele.

O QUE EU PRECISO FAZER NAS VISITAS DO ESTUDO?

Se você decidir participar neste estudo, serão colhidas informações sobre a sua saúde e relacionadas a ela em todas as suas consultas.

QUE EXAMES E ANÁLISES DE LABORATÓRIO SERÃO FEITOS NAS VISITAS DO ESTUDO?

Será realizado um exame ginecológico completo com coleta de material para citologia oncológica (igual à realizada anualmente para prevenção do câncer do colo uterino em qualquer mulher), coleta de material para PCR para HPV (feita com a mesma espátula usada para colher a citologia oncológica). Caso haja alteração do exame colposcópico do colo uterino, será feita a biópsia para realização do exame histopatológico (o qual determinará presença ou não da lesão pré-cancerosa) e do exame de imuno-histoquímica para avaliação da resposta imune local.

Necessitaremos que você faça exames de sangue que ajudarão o seu médico a acompanhar como agem as defesas do seu corpo para auxiliar na resposta ao tratamento ginecológico que se fizer necessário para a sua cura ou melhor controle da lesão pré-cancerosa.

QUANTAS MULHERES PARTICIPARÃO DESTA ESTUDO E DURANTE QUANTO TEMPO?

Estima-se a participação de aproximadamente 400 mulheres.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTA ESTUDO?

Não há riscos importantes na coleta do material para prevenção do câncer do colo uterino, apenas leve desconforto ou cólica leve.

Quando houver necessidade de biópsia no colo uterino você poderá sentir cólica leve, raramente poderá ocorrer sangramento aumentado e/ou desmaio.

Caso necessite de cauterização química ou de eletrocauterização, poderá sentir um pouco de dor em cólicas, que será minimizada, dependendo da região a ser tratada, com anestésicos locais.

Como em todo procedimento médico, existe a possibilidade de insucesso no diagnóstico e tratamento dessas lesões. Sabe-se que nas mulheres portadoras do HIV a porcentagem de recidiva (retorno) das lesões do colo uterino é mais alta do que nas mulheres não portadoras do HIV. Mas, todos os esforços serão feitos no sentido de minimizar as complicações decorrentes dessa condição.

HÁ BENEFÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

Sim. Para você, de imediato: terá a possibilidade de diagnóstico e tratamento de suas lesões no colo uterino.

Para os médicos: as informações obtidas neste estudo poderão ajudá-los a descobrir mais sobre as lesões pré-cancerosas no colo uterino das mulheres portadoras do HIV. Pretende-se saber se há associação da carga viral do HIV (quantidade do vírus no sangue) ou da contagem de linfócitos CD4 (são as células da defesa do corpo) com a presença dessas lesões no colo uterino e com a infecção pelo HPV. Espera-se que com esses conhecimentos seja mais fácil cuidar das pacientes portadoras do HIV, contribuindo para a redução desse câncer cérvico-uterino e melhora na qualidade da vida sexual dessas pacientes.

CONFIDENCIALIDADE

Serão feitos esforços no sentido de manter os prontuários médicos confidenciais, embora não se possa garantir absoluta confidencialidade. Os resultados dos seus exames serão mantidos em sigilo. Entretanto, esses prontuários poderão ser vistos por indivíduos que trabalham neste estudo e os

resultados poderão ser publicados em revistas científicas. Você não será pessoalmente identificada em publicação alguma resultante da informação obtida neste estudo.

HÁ ALGUM CUSTO PARA MIM?

Não há qualquer custo para você relacionado às visitas clínicas, exames ou testes de laboratório em conexão com o estudo.

EU RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Você não receberá qualquer tipo de remuneração (pagamento) por estar neste estudo. Da mesma forma, não existe remuneração para os pesquisadores.

O QUE ACONTECERÁ SE EU SOFRER LESÃO?

Se você sofrer algum tipo de lesão em consequência deste estudo, o ambulatório ao qual você está sendo acompanhada em qualquer uma das diversas cidades de Minas Gerais (unidades clínicas) envolvidas neste estudo dispensará a você o tratamento necessário e imediato da lesão. Será comunicado onde você poderá receber tratamento adicional das lesões se for o caso. Você não estará renunciando a qualquer direito legal ao assinar este termo de consentimento.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS POR PARTICIPAR DA PESQUISA?

Sua participação na pesquisa é completamente voluntária. Você tem o direito de recusar a participar a qualquer momento, sem prejuízo ao seu tratamento.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este termo de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em tomar parte neste estudo. Estou ciente de que eu posso sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos.

Nome da paciente

Assinatura da paciente

Data: ____ / ____ / ____

Coordenador do Projeto
Prof. Dr. Victor Hugo de Melo
Belo Horizonte
Fone: (31) 9968-2401/ (31) 3273-5233

Médico Local
Cidade / Telefone
Data: ____ / ____ / ____

ANEXO A – Parecer ético

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0526.0.203.000-09

**Interessado(a): Prof. Victor Hugo de Melo
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de janeiro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Resposta imune local associada ao HPV e/ou à neoplasia intra-epitelial cervical, em mulheres portadoras e não-portadoras do HIV"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B - Relação dos anticorpos testados com diferentes tampões e diferentes diluições para fim de padronização da técnica de imunohistoquímica a ser utilizada no presente estudo

Anticorpos	Rec. Antigênica	Controle	Diluição	Escolhido
CD3	Citrato	Tonsila	1:200, 1:500, 1:1000	Citrato, Diluição 1:200
	Tris – EDTA	Tonsila	1:200, 1:500, 1:1000	
	EDTA	Tonsila	1:200, 1:500, 1:1000	
CD4	Citrato	Tonsila	1:20, 1:200	EDTA, Diluição 1:30
	EDTA	Tonsila	1:20, 1:200	
CD8	Citrato	Tonsila	1:40, 1:200, 1:400	Citrato, Diluição 1:150
	Tris – EDTA	Tonsila	1:40, 1:200, 1:400	
	EDTA	Tonsila	1:40, 1:200, 1:400	
CD20	Citrato	Tonsila	1:100, 1:500	Citrato, Diluição 1:500
	EDTA	Tonsila	1:100, 1:500	
CD56	Citrato	Tonsila	1:200, 1:500, 1:1000	EDTA, Diluição 1:200
	Tris – EDTA	Tonsila	1:200, 1:500, 1:1000	
	EDTA	Tonsila	1:200, 1:500, 1:1000	

ANEXO C - Técnica de imuno-histoquímica

SILANIZAÇÃO

Usa-se a solução de silano 6% em acetona: 94 mL de acetona + 6 mL de silano.

- 1- Colocar a lâmina em solução de silano por 3 minutos.
- 2- Lavar com água destilada: 3 banhos rápidos
- 3- Deixar por 1 minuto em água destilada
- 4- Secar a lâmina em estufa ou em temperatura ambiente.

PREPARO DO CORTE

- 1- Foi realizado corte de 4 μ m, sendo o mesmo colocado em água fria.
- 2- O corte é, em seguida, mergulhado em água quente e colocado na lâmina silanizada.
- 3- Secar em estufa durante 1 hora na temperatura de 40-60°.

DESPARAFINAÇÃO

- 1- As lâminas são colocadas em estufa, *overnight*, na temperatura de 37°.
- 2- A temperatura da estufa é elevada a 60° pelo período de 1 hora.
- 3- Aquecer a solução de xilol, em estufa, por 10 min a 60°.
- 4- Mergulhar as lâminas no xilol aquecido por 10 min.
- 5- Fazer dois banhos em xilol, de 3 minutos cada, em temperatura ambiente.
- 6- Fazer um banho em xilol 50% (50 mL de xilol em 50 mL de álcool absoluto) durante 3 minutos.

HIDRATAÇÃO

- 1- Três banhos de 3 minutos cada em álcool absoluto
- 2- Um banho de 3 minutos em álcool 95%
- 3- Um banho de 3 minutos em álcool 80%
- 4- Um banho de 3 minutos em álcool 70%
- 5- Lavar em água corrente
- 6- Dois banhos em água destilada

REATIVAÇÃO ANTIGÊNICA

- 1- O tampão a ser utilizado depende de qual anticorpo primário está sendo trabalhado. As seguintes soluções podem ser usadas: citrato, EDTA e TRIS EDTA.
- 2- Colocar o tampão em jarra de Couplin e aquecer por 1 minuto em micro-ondas.
- 3- Tirar as lâminas da água destilada e colocar no tampão.
- 4- Tampar a jarra e colocá-la na panela Pascal. Deixar por 6 minutos na pressão em temperatura de 98°C.
- 5- Tirar da panela e deixar em temperatura ambiente por 20 minutos.
- 6- Desprezar o tampão e fazer lavagem rápida em solução PBS.
- 7- Mergulhar em PBS por 5 minutos.

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA

- 1- Colocar as lâminas por um período de 10 minutos em solução de peróxido 1,5% (45 mL de metanol + 5 mL de peróxido 30%)
- 2- Desprezar a solução e fazer banho em PBS por 3 minutos.
- 3- Marcar os cortes com caneta e colocar as lâminas na bandeja de incubação.
- 4- Banhar com TBST por 2 minutos. Escorrer e colocar novamente a solução por 3 minutos.

BLOQUEIO DA AVIDINA

- 1- Colocar Molico[®] (3 g de molico em 100 mL de TRIS HCL) por 10 minutos.
- 2- Banhar com TBS por 2 minutos

ANTICORPO PRIMÁRIO

- 1- Foi realizada a padronização de cada anticorpo, sendo a diluição específica para cada anticorpo utilizado.
- 2- Colocar o anticorpo sobre o corte e deixar as lâminas na estufa por 1 hora em temperatura de 37°C ou em *overnight* na geladeira.
- 3- Tirar da estufa e deixar as lâminas em temperatura ambiente por 30 minutos.
- 4- Fazer 3 banhos, de 3 minutos cada, em solução de TBS na bandeja de incubação.

ANTICORPO SECUNDÁRIO

- 1- Colocar *Mach 4 Mouse Probe* (UP534L- *Biocare medical*) em temperatura ambiente por 30 minutos. Manter a bandeja de incubação fechada.
- 2- Fazer 3 banhos de 3 minutos cada com solução de TBS.

POLÍMERO

- 1- Colocar *Mach 4 HRP Polymer* (MRH534L - *Biocare medical*) em temperatura ambiente por 30 minutos. Manter a bandeja de incubação fechada.
- 2- Fazer 3 banhos de 3 minutos cada com solução de TBS.
- 3- Fazer banho com TRIS HCL $Ph=7,6$ por 4 minutos.

REVELAÇÃO-CROMÓGENO

- 1- Cobrir o corte com DAB e deixar por 6 minutos.
- 2- Enxaguar com água destilada para parar a reação.
- 3- Mergulhar as lâminas em recipiente com água destilada.

CONTRACORAR

- 1- Desprezar a água e colocar as lâminas em solução de hematoxilina por 10 segundos.

- 2- Desprezar HE em outro recipiente e lavar as lâminas em água corrente.

DESIDRATAÇÃO

- 1- Fazer um banho em álcool 70% por 2 minutos
- 2- Fazer um banho em álcool 80% por 2 minutos
- 3- Fazer um banho em álcool 95% por 2 minutos
- 4- Fazer dois banhos em álcool absoluto por 2 minutos cada

DIAFANIZAÇÃO

- 1- Fazer dois banhos, de dois minutos cada, em solução de xilol.

MONTAGEM

- 1- Colocar 1 gota de Ever-Mount na lamínula
- 2- Deixar secar.