

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO ESTROMA CERVICAL
DE MULHERES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)**

MIRIAN VIVIANE MACIEL BARROS GUIMARÃES

Belo Horizonte
2011

MIRIAN VIVIANE MACIEL BARROS GUIMARÃES

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO ESTROMA CERVICAL
DE MULHERES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)
COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo de Melo.

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

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, Márcia Mendonça Carneiro e Maria Inês Miranda Lima, aprovou a defesa da dissertação intitulada **“EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO ESTROMA CERVICAL, DE MULHERES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV, COM NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL”** apresentada pela mestrandia **MIRIAN VIVIANE MACIEL BARROS GUIMARÃES**, para o btenção 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

Profa. Márcia Mendonça Carneiro

Dra. Maria Inês Miranda Lima



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
www.ufmg.br/medicina



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MIRIAN VIVIANE MACIEL BARROS GUIMARÃES, nº de registro 2009655359. No dia **dezesseis 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: **"EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO ESTROMA CERVICAL, DE MULHERES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV, 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/Coordenadora	Instituição: UFTM	Indicação: <u>apto</u>
Profa. Márcia Mendonça Carneiro	Instituição: UFMG	Indicação: <u>apta</u>
Dra. Maria Inês Miranda Lima	Instituição: Santa Casa	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 [assinatura]

Profa. Márcia Antoniazzi Michelin [assinatura]

Profa. Márcia Mendonça Carneiro [assinatura]

Dra. Maria Inês Miranda Lima [assinatura]

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador [assinatura]

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

[assinatura]
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

A minha querida mãe,
exemplo de determinação, amor, dedicação e perseverança.

Ao meu pai,
sempre presente em sua essência durante todos os momentos de minha vida.

Exemplo de doçura, pai amoroso
que hoje certamente estaria transbordando de alegria e orgulho.

Ao meu marido,
pelo incentivo, companheirismo e compreensão
pelos tantos momentos de ausência.

Aos meus filhos, Maria Eduarda e Arthur,
razão para sempre buscar o caminho certo.

Aos meus irmãos,
pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Victor Hugo de Melo, pela dedicação extrema e por acreditar que este trabalho daria bons frutos.

À Professora Dr^a. Márcia Michelin Antoniazi, minha coorientadora, que nos recebeu em seu laboratório e nos forneceu todo o suporte necessário para desenvolver este projeto.

Ao Professor Dr. Eddie Fernando Candido Murta, que, assim como a Professora Márcia, disponibilizou todos os recursos necessários para o desenvolvimento do nosso projeto.

À Prof^a. Dr^a. Sheila Jorge Adad, que avaliou todos os diagnósticos histopatológicos.

A todos os funcionários e alunos do IPON, em especial à Pâmela Cândido, sem a qual não seria possível a realização das lâminas. Acompanhou-nos em todo o processo com generosidade e dedicação.

À Cláudia Teixeira da Costa Lodi, por ter me introduzido nesse universo. Agradeço pelos vários finais de semana em que prestou preciosa ajuda na organização do banco de dados e na avaliação estatística.

À Adriana Almeida Souza Lucena, minha amiga e companheira de mestrado, pelo incentivo e palavras de apoio.

Ao Dr. Moisés Salgado Pedrosa, meu amigo, pelo auxílio na leitura e pela realização das fotos das lâminas de imuno-histoquímica.

À Prof^a. Helenice Gobbi, que gentilmente cedeu seu laboratório para a leitura das lâminas.

Ao grupo de pesquisa, em especial Nara Chartunni P. Teixeira, Ângela Cristina Labanca, Maria Inês Miranda Lima, Benito Ceccato, Helena Souza Rabelo, Fabyola Jorge Cruz, Jannette Rodrigues Campos, Iracema Maria Ribeiro da Fonseca e Gustavo Alvarenga. Todos sempre presentes no decorrer desta caminhada.

À ABG Consultoria Estatística, que revisou toda a análise estatística.

À Professora Magda Barbosa Roquette Taranto, pela colaboração e revisão do Português.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que o estudo tivesse êxito, em especial à minha funcionária Maria de Lourdes Alves de Souza Meireles, que cuidou de meus filhos com carinho e dedicação.

Às pacientes, por representarem a razão do desenvolvimento do nosso trabalho.

RESUMO

Objetivo: avaliar se existe diferença na resposta imune no estroma cervical, a partir da expressão imuno-histoquímica das citocinas interleucina (IL) IL-4, IL-12, interferon gama (IFN- γ) e fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) de mulheres infectadas e não infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com neoplasia intraepitelial cervical (NIC). O objetivo secundário foi avaliar se existe diferença na resposta imune local entre as NICs de baixo e alto grau no colo uterino. **Método:** estudo transversal realizado a partir de material obtido por conização do colo uterino de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV com NIC. A conização foi realizada pela cirurgia de alta frequência (CAF), entre janeiro de 1999 e maio de 2004. A avaliação das citocinas no estroma cervical foi feita com base na imuno-histoquímica. Para a análise estatística usou-se teste Qui-quadrado para comparação das variáveis categóricas e os testes U-Mann-Whitney e Qui-Quadrado para avaliar se existiam associações, considerando-se o nível de significância de 0,05. A análise multivariada foi feita por regressão logística. Nas regressões múltiplas para HIV e grau da lesão, foram selecionados os potenciais preditores na análise univariada, utilizando nível de 0,20 de significância. Para verificar a qualidade do ajuste das regressões logísticas, foi realizado o teste de Hosmer-Lemeshow. **Resultado:** em relação ao *status* do HIV, não foram encontradas diferenças na imunidade local entre as mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. Porém, ao avaliar a interação entre o HIV e o grau da NIC, foi significativa a associação da expressão de IL-12 em mulheres infectadas pelo HIV e com NIC de alto grau no colo uterino ($P=0,016$) e IL-4 com as infectadas pelo HIV com NIC de baixo grau ($P=0,0456$). Quanto ao grau de lesão, houve associação entre TGF- β e NIC alto grau tanto no grupo de mulheres infectadas quanto no grupo de mulheres não infectadas ($P=0,000$). **Conclusão:** detectou-se interação entre HIV e o grau da NIC, uma vez que houve mudança de expressão de IL-12 e de IL-4 na presença do HIV. Em relação ao grau de lesão, houve predomínio de TGF- β nas NICs de alto grau, refletindo predomínio de ambiente imunorregulatório.

Palavras-chave: Neoplasia intraepitelial cervical. Vírus da imunodeficiência humana. Imuno-histoquímica. Citocinas. IFN- γ e TGF- β .

ABSTRACT

Objective: To investigate whether there are differences in the immune response by means of a immunohistochemical analysis of cytokines expression (IL-4, IL-12, IFN- γ and TGF- β) in the cervical stroma of women with CIN lesions, both HIV-infected and HIV non-infected. The secondary objective is to investigate whether there are differences in the local immune response between high and low grade CINs. **Methods:** This was a cross-sectional study which analyzed cone specimens of CIN lesions in both HIV-infected and HIV non-infected women. Conization by loop electrosurgical excision procedure was performed from January 1999 to May 2004. An immunohistochemical analysis was conducted to assess cytokine expression. The chi-square test was used to compare categorical variables and the U-Mann-Whitney and chi-square were used to test for associations, with $p=0.05$. The multivariate analysis was done using logistic regression. In multiple regressions for HIV and lesion grade, the potential predictors for the univariate analysis were selected with a level of significance of 0.20. Hosmer-Lemeshow test was chosen to test for the goodness of fit for logistic regression. **Results:** In relation to HIV status, no differences were found in the local immunity when HIV-infected and HIV non-infected women were compared. However, when the interaction between HIV and CIN grade was evaluated, there was a significant association of IL-2 expression in HIV-infected women and with high grade CIN ($P=0,016$) and association of IL-4 (0,0456) in HIV-infected women and with low grade CIN. As for lesion grade, there was an association between TGF- β and high grade CIN in both HIV-infected and HIV non-infected women ($P=0,000$). **Conclusion:** There seems to be an interaction between HIV and CIN grade since a change in the expression of IL-12 and IL-4 in HIV infection was found. As far as lesion grade is concerned, there is a prevalence of TGF- β in high grade CIN, possibly reflecting the prevalence of an immunoregulatory environment.

Keywords: Cervical Intraepithelial Neoplasia. Human Immunodeficiency Virus. Immunohistochemistry. Cytokines. IFN- γ and TGF- β .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ASCUS	Atipias de significado indeterminado em células escamosas
BSA	Soroalbumina bovina
CAF	Cirurgia de alta frequência
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CEP/PBH	Comitê de ética em pesquisa da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte
COEP	Comitê de ética em pesquisa
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias
DAB	<i>Diaminobenzidina</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dp	Desvio-padrão
DST	Doença sexualmente transmissível
EDTA	<i>Etilenodiaminotetracetatodossódico</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
h	Hora
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HERS	<i>HIV Epidemiology Research Study</i>
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
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
Min	Minutos
mL	Mililitro
NaCL	Cloreto de sódio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	<i>Natural Killer</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PAM	Posto de Atendimento Médico
PBH	Prefeitura Municipal de Belo Horizonte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial de hidrogênio
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
SMSA	Secretaria Municipal de Saúde
STAT	Sinais transdutores e ativadores de transcrição
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
Th	<i>T helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSBT	<i>Tris buffer saline Tween</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Resumo dos quatro perfis de resposta imune com respectivas citocinas características de cada perfil e citocinas que induzem a diferenciação dos perfis.....	30
FIGURA 2 - Micrótomo utilizado nos cortes.....	44
FIGURA 3 - Bancada utilizada para desparafinização e hidratação das lâminas.....	45
FIGURA 4 - Reativação antigênica.....	46
FIGURA 5 - Marcação com caneta.....	46
FIGURA 6 - Bloqueio da biotina.....	47
FIGURA 7 - Anticorpo primário.....	48
FIGURA 8 - Anticorpo secundário e polímero.....	49
FIGURA 9 - Lâminas prontas secando em temperatura ambiente.....	50
FIGURA 10 - Marcação para TGF- β	51
FIGURA 11 - Marcação para IFN- γ	51
FIGURA 12 - Marcação para IL-12.....	52
FIGURA 13 - Marcação para IL-4.....	52

Gráficos

GRÁFICO 1 - Logaritmo das razões de chance para comparação dos grupos HIV positivo e negativo entre as variáveis idade, paridade, atividade sexual, grau da lesão, citologia, colposcopia, biópsia e tabagismo.....	59
GRÁFICO 2 - Logaritmo das razões de chance para comparação dos grupos NIC1 e NIC 2/3 entre as variáveis idade, paridade, atividade sexual, grau da lesão, citologia, colposcopia, biópsia e tabagismo.....	63
GRÁFICO 3 - <i>Boxplot</i> para as variáveis respostas entre a variável grau da lesão, considerando-se somente os indivíduos HIV negativo.....	65
GRÁFICO 4 - <i>Boxplot</i> para as variáveis respostas entre a variável grau da	

lesão, considerando somente os indivíduos HIV positivo.....	66
GRÁFICO 5 - Interação entre os fatores HIV e grau da lesão para as variáveis da resposta imune.....	69

Quadros

QUADRO 1 - Principais citocinas e suas funções.....	31
QUADRO 2 - Conclusões dos principais estudos sobre resposta imune local.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise de média e mediana para idade, paridade e início da atividade sexual entre as pacientes infectadas e não infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.....	55
TABELA 2 - Medidas descritivas para linfócitos TCD4+ e carga viral entre as mulheres infectadas pelo HIV.....	56
TABELA 3 - Análise de média e mediana para idade, paridade e início da atividade sexual entre as mulheres portadoras de NIC 2/3 e NIC 1	56
TABELA 4 - Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a variável vírus da imunodeficiência humana.....	57
TABELA 5 - Comparação entre citologia, colposcopia, resultado da biópsia e histopatológico da CAF, segundo o vírus da imunodeficiência humana.....	58
TABELA 6- Avaliação das citocinas locais segundo o vírus da imunodeficiência humana.....	60
TABELA 7 - Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo o grau da lesão.....	61
TABELA 8 - Comparação entre citologia, colposcopia, resultado da biópsia e <i>status</i> do HIV segundo o grau da lesão.....	62
TABELA 9 - Avaliação da resposta imune em relação ao grau da lesão.....	64
TABELA 10 - Avaliação da resposta imune segundo o grau de lesão em pacientes negativas para o HIV.....	65
TABELA 11 - Avaliação das citocinas locais quanto ao grau da lesão no grupo de mulheres infectadas pelo HIV.....	66
TABELA 12 - Avaliação das citocinas locais nas mulheres portadoras de NIC 1 segundo o HIV.....	67
TABELA 13 - Avaliação das citocinas locais nas mulheres portadoras de NIC 2/3 segundo o HIV.....	67
TABELA 14 - Regressão logística para HIV: modelo completo.....	70
TABELA 15 - Regressão logística para HIV: modelo final.....	70

TABELA 16 - Regressão logística para grau da lesão: modelo completo.....	72
TABELA 17 - Regressão logística para grau da lesão: modelo final.....	72

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Papilomavírus humano (HPV).....	21
2.2 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC).....	23
2.3 Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	24
2.4 Coinfecção HIV/HPV.....	25
2.5 NIC e HIV.....	27
2.6 Resposta imune.....	28
2.6.1 Resposta imune a HPV/ NIC/ HIV.....	33
3 OBJETIVOS.....	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 Desenho do estudo.....	39
4.2 Pacientes.....	39
4.2.1 Critérios de inclusão.....	40
4.2.2 Critérios de exclusão.....	41
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 Contagem celular.....	50
4.4 Análise estatística.....	52
4.4.1 Cálculo amostral.....	52
4.4.2 Metodologia da análise.....	53
4.4.2.1 Análise descritiva dos grupos.....	53

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.

4.4.2.2 Análise univariada.....	53
4.4.2.3 Análise multivariada.....	54
4.5 Considerações éticas.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Análise descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV.....	55
5.2 Análise descritiva dos grupos em relação ao grau da lesão.....	56
5.3 Análise univariada em relação ao HIV.....	57
5.3.1 Análise univariada das citocinas em relação ao HIV.....	59
5.4 Análise univariada quanto ao grau de lesão.....	60
5.4.1 Análise das variáveis da resposta imune segundo o grau na NIC.....	63
5.5 Avaliação das citocinas dentro de cada grupo de mulheres infectadas ou não pelo HIV.....	64
5.6 Avaliação das citocinas pelo grau da lesão segundo a presença ou não do HIV.....	66
5.7 Análise multivariada: modelagem estatística.....	69
6 DISCUSSÃO.....	73
6.1 Análise dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV..	73
6.2 Análise descritiva dos grupos quanto ao grau de lesão.....	75
6.3 O método de imuno-histoquímica.....	76
6.4 Análise dos grupos em relação à resposta imune local e o grau de lesão na presença ou não do HIV.....	77
6.4.1 TGF- β	78
6.4.2 IL-12.....	80
6.4.3 IL-4.....	81
6.4.4 IFN- γ	83
6.5 Considerações finais.....	86
7 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS E APÊNDICES.....	103

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical ainda representa sério problema de saúde pública em todo o mundo. A cada ano, cerca de 500.000 mulheres desenvolvem essa doença e cerca de 230.000 morrem em sua decorrência (PARKING *et al.*, 2005). Em 2008, o câncer cervical foi responsável por 275.000 mortes, das quais 88% ocorreram em países em desenvolvimento: 53.000 na África, 31.400 na América Latina e Caribe e 159.800 na Ásia (FERLAY *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo dados do Instituto do Câncer (INCA), o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (23/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000), ocupa a segunda posição mais frequente e nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000), a terceira (INCA, 2010).

O câncer cervical humano é o primeiro a ser reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo 100% atribuído a um agente infeccioso, o papilomavirus humano (HPV) de alto risco oncogênico (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2007). O HPV é considerado o principal agente etiológico para quase todos os cânceres cervicais, alguns cânceres anogenitais e proporção significativa de cânceres da cavidade oral (PSYRRI; DiMAIO, 2008). Os primeiros relatos que mostravam essa associação datam do final dos anos 70, por Zur Hausen (1976) e Zur Hausen *et al.* (1975).

A infecção pelo HPV constitui condição necessária para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical e do carcinoma cervical (ZUR HAUSEN, 1999). Entretanto, a infecção pelo HPV, por si só, não é causa suficiente para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intraepiteliais. Outros fatores estão envolvidos, como a persistência viral, tipo do vírus presente, tabagismo, multiplicidade de parceiros, uso de contraceptivos, coinfeção por outros agentes infecciosos como vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecção pelo herpes vírus e *Chlamydia trachomatis* (MORENO *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2002; WALLING *et al.*, 2002).

Estudos referem que a imunidade celular mediada do hospedeiro, tanto sistêmica quanto local, representa importante determinante do curso da infecção pelo HPV (KADISH *et al*, 1997; WU; KURMAN, 1997). A elevada prevalência de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) em pacientes com síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) sugere a importância da resposta imune, em especial a ação dos linfócitos T, na prevenção e controle das lesões associadas ao HPV (BENTON; SHAHIDULLAH; HUNTER, 1992; PALEFSKY; HOLLY, 2003).

A resposta imune celular aferida no sangue periférico parece ser um epifenômeno, uma vez que a resposta mais relevante é local. Os parâmetros da imunidade, tais como os níveis séricos de citocinas, não necessariamente correspondem aos níveis produzidos no colo uterino, o que estabelece a importância do estudo da imunidade local para o entendimento da resposta do hospedeiro em relação à infecção cervical pelo HPV. A resposta imune possui importante papel no microambiente cervical, sendo que muitos mecanismos dessa resposta podem ser afetados, levando à persistência viral e ao desenvolvimento do câncer (TINDLE, 2002). Desta forma, é importante o conhecimento do papel das citocinas na história natural do HPV.

Entre indivíduos HIV positivo, os níveis de linfócitos TCD4+ são usados como marcadores de imunossupressão, porém isso reflete um efeito sistêmico do HIV no sistema imune e possui pouca relação com a infecção anogenital para o HPV (PALEFSKY *et al.*, 2001). Melhor entendimento da relação entre HPV/HIV é importante, devido ao alto número de homens e mulheres duplamente infectados.

A ideia deste trabalho surgiu após pesquisa realizada por um membro do nosso grupo, que avaliou a existência de células de Langerhans no epitélio de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV e concluiu que as mesmas estavam diminuídas no grupo das infectadas (ZIMMERMANN, 2008). Outros dois estudos de nosso grupo de pesquisa, avaliaram os fatores de risco para a recidiva das neoplasias intraepiteliais cervicais, sendo que um deles avaliou o HPV. A conclusão do estudo mostrou que o HIV estava relacionado à recidiva das lesões (LIMA *et al.*, 2009; LODI *et al.*, 2011). Ficaram intrigantes perguntas a serem

respondidas: de que forma o HIV estaria contribuindo? Haveria desequilíbrio da imunidade local? Como aferir?

O primeiro passo para avaliar essas mesmas pacientes era escolher uma técnica de pesquisa que fosse plausível, uma vez que se tratava de peças parafinadas e já estocadas há algum tempo. Por esse motivo, após estudar sobre o assunto e discutir com a coorientadora, Professora Márcia Antoniazzi Michelin, ficou decidido usar a técnica de imuno-histoquímica. Em seguida, buscaram-se as mesmas pacientes que foram avaliadas no trabalho anterior e, em nova parceria com o Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), este projeto foi desenvolvido. Nesse momento decidiu-se analisar a resposta imune local a partir da aferição de citocinas-chaves dos padrões atualmente mais estudados e conhecidos. A ideia original era avaliar todas as pacientes que participaram do estudo anterior.

Medir a resposta imune local é desafiante e o entendimento da interação em nível molecular entre os linfócitos e as células transformadas pelo HPV é de suma importância para o desenvolvimento de imunoterapias. Além disso, não é claro se a coinfeção HIV/HPV afeta a síntese de citocinas tipo 1 e tipo 2 e a medida que isso contribui para o desenvolvimento das lesões intraepiteliais escamosas. O presente estudo tem relevância no entendimento da interação na imunidade celular local, investigada por meio das citocinas presentes no estroma logo abaixo do epitélio displásico.

Baseado nessas observações, este estudo tem como objetivo avaliar a resposta imune local, com ênfase na análise de citocinas, a partir do método de imuno-histoquímica em peças parafinadas provenientes de cirurgia de alta frequência (CAF) de pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV e portadoras de NIC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papilomavírus humano (HPV)

O papilomavirus humano (HPV) é o agente sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo, com prevalência elevada principalmente entre jovens sexualmente ativos (VAN DER BURG; PALEFSKY, 2009). Cerca de 10% das mulheres com citologia normal portam infecção cervical pelo HPV, com taxas variando de 6,1 a 35,4%, dependendo de qual teste foi aplicado para a detecção viral, o tamanho da amostra e a região geográfica estudada (DE SANJOSÉ *et al.*, 2007).

Assim como outros vírus, o HPV é um parasito intracelular obrigatório e deve “depositar” seu genoma e proteínas acessórias dentro da célula do hospedeiro para, em seguida, utilizar a “maquinaria” celular para a replicação viral, apresentando seu ciclo reprodutivo dentro da célula infectada e em sincronia com a mesma (DOORBAR, 2005; PELKMANS; HELENIUS, 2003). Na fase de infecção inicial, o ácido desoxirribonucleico (DNA) do HPV está sob a forma epissomal. Entretanto, na maioria dos cânceres, o HPV está integrado no genoma celular (WENTZENSEN; VINOKUROVA; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2004).

A integração do genoma do HPV no DNA do hospedeiro geralmente correlaciona-se com a progressão de lesões de baixo grau para lesões de alto grau. Entretanto, a presença do HPV oncogênico é necessária, mas não suficiente para a imortalização celular e para o desenvolvimento do fenótipo maligno (ZUR HAUSEN, 2002). A carcinogênese cervical constitui processo multifatorial que envolve fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos, em adição à infecção pelo HPV (CAVALCANTI *et al.*, 2000; MORENO *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2002; WALLING *et al.*, 2002).

Atualmente existem mais de 100 tipos de HPV e, entre estes, cerca de 40 acometem o trato genital. Esses tipos virais são classificados como de baixo e alto

risco, de acordo com seu potencial oncogênico (BOULET *et al.*, 2008). Os principais genótipos associados ao câncer cervical são o HPV 16 e o HPV 18. Os dois juntos são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer de colo uterino. Entre os genótipos de baixo risco, os HPVs 6 e 11 são os mais comuns e dão origem às verrugas genitais (MUÑOZ *et al.*, 2003; PARKIN; BRAY, 2006; ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 2002).

A infecção pelo HPV genital é comum em mulheres jovens sexualmente ativas, com prevalência acumulativa de 60 a 80% (SCHIFFMAN; KJAER, 2003). Estudos epidemiológicos mostram alta prevalência de HPV oncogênico na população geral. Estima-se incidência acumulativa (por toda a vida) de infecção pelo HPV 16 em 50% (HELMERHORST; MEIJER, 2002; HO *et al.*, 1998). Apesar da alta prevalência da infecção pelo HPV na população geral, apenas por volta de 2 a 3% desenvolverão NIC (HO *et al.*, 1998).

Na maioria das vezes, a infecção pelo HPV ocorre de forma transiente e a sua persistência depende da resposta imune do hospedeiro. A maioria dessas infecções é eliminada, sendo que o tempo de clareamento para o HPV 16 é em torno de oito a 16 meses e o tempo de clareamento para o HPV de baixo risco beira quatro a oito meses (TROTTIER; FRANCO, 2006). De maneira geral, cerca de 70 a 90% das mulheres jovens e adolescentes sexualmente ativas que desenvolvem infecção cervical pelo HPV apresentarão clareamento da infecção dentro de 12 a 30 meses (EVANDER *et al.*, 1995; MOSCICKI *et al.*, 1998).

Estudos mostram que a resposta imune celular mediada do hospedeiro, tanto local quanto sistêmica, é um importante determinante para o curso da infecção (WU; KURMAN, 1997). Mulheres com transplante de órgãos têm incidência aumentada de câncer cervical e vulvar quando comparadas com mulheres saudáveis, provavelmente em decorrência de resposta imune atenuada pelo uso de imunossupressores (PENN, 1986).

O câncer cervical normalmente surge em mulheres que retêm o HPV oncogênico por décadas sem uma resposta imune efetiva (DOORBAR, 2006). Contudo, a maioria das mulheres se torna HPV negativo em torno de 30 anos e apenas

reduzida proporção é diagnosticada com lesão, particularmente lesão de alto grau ou câncer (SCHIFFMAN, 1992). Isto provavelmente ocorre devido à geração de efetiva resposta imune celular ao HPV.

2.2 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)

De maneira geral, a NIC é definida como distúrbio da diferenciação do epitélio escamoso, que possui potencial para transformação maligna (WRIGHT *et al.*, 1994a). A NIC é graduada de 1 a 3, dependendo do grau de anormalidade no epitélio, avaliada a partir da existência de atipias celulares, disordem de maturação e figuras mitóticas anormais (WRIGHT; KURMAN; FERENCY, 2002). A NIC 1 apresenta células basais imaturas no terço inferior do epitélio, a NIC 2 exibe alterações em até dois terços do epitélio e a NIC 3 acomete praticamente toda a espessura do epitélio (WRIGHT; KURMAN; FERENCY, 2002).

O diagnóstico citológico de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) corresponde ao diagnóstico histológico de infecção por HPV e NIC 1. Essa lesão é uma condição relativamente benigna, com baixo risco de progressão, enquanto que a lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) que corresponde ao diagnóstico histológico de NIC 2 e NIC 3 é considerada mais agressiva e requer intervenção (MOSCICKI *et al.*, 2004; SOLOMON *et al.*, 2002). A lesão de baixo grau exibe apenas leves alterações da diferenciação e frequentemente é clareada pelo sistema imune em menos de um ano (HOPFL *et al.*, 2000). Pesquisas sobre a história natural do HPV mostram que cerca de 90% das lesões de baixo grau podem regredir espontaneamente e isso é atribuído ao fato de que a maioria das lesões de NIC 1 é causada pelo HPV não oncogênico, bem como por resposta imune celular mediada (antígeno-específica) bem-sucedida (EVANDER *et al.*, 1995; MOSCICKI *et al.*, 2006).

O *Centers for Diseases Control and Prevention* (1993) propôs uma nova classificação clínica para pacientes infectados pelo HIV e incluiu o carcinoma cervical invasivo como doença definidora de AIDS (categoria C) e a displasia

moderada e acentuada à lista de problemas cujo curso e manejo podem ser complicados pela infecção pelo HIV (categoria B) (ANEXO A).

2.3 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Lentivirus*, comumente transmitido por via sexual (FAUCI, 1996). Aproximadamente 33,3 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV em 2009, sendo que 22,5 milhões vivem na África subsaariana. Dessa população, cerca de 60% são mulheres (13,5 milhões), o que mostra crescente taxa de transmissão heterossexual (UNAIDS, 2010).

Muitos mecanismos são sugeridos para explicar como o HIV alcança o trato genital feminino. Entre esses mecanismos, são citados: infecção direta da célula epitelial, transição de partículas virais através do epitélio, penetração do vírus através de abrasões da mucosa e ligação em células dendríticas da mucosa. A taxa de transmissão do HIV por comportamento sexual de alto risco é baixa, porém, uma vez infectado, o vírus rapidamente é drenado para os linfonodos, onde acontecem a replicação e a disseminação viral para todo o corpo (SHACKLETT, 2009).

As principais células-alvo para o HIV são as células TCD4+, macrófagos e células de Langerhans, todas presentes no trato genital. O cofator mais importante em aumentar a eficiência na transmissão do HIV é a presença de outra doença sexualmente transmissível (DSTs). As DSTs aumentam a susceptibilidade ao HIV devido a disrupções na mucosa e alterações imunes no trato genital. As células inflamatórias são capazes de danificar os tecidos cervicais a partir da liberação de enzimas e citocinas pró-inflamatórias (BEHBAHANI *et al.*, 2007); e o aumento e a persistência da inflamação aumentam a carga viral do HIV no fluido cervical (COOMBS; REICHELDERFER; LANDAY, 2003).

A contagem dos linfócitos TCD4+ no sangue periférico possui implicações prognósticas na evolução da infecção pelo HIV, pois representa a medida da imunocompetência celular. Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control*

and Prevention (CDC) enfatiza a importância da contagem dos linfócitos TCD4+ na caracterização de condições clínicas relacionadas ao HIV, com divisão em quatro faixas (ANEXO A):

- TCD4+ > 500 células/mm³: estágio da infecção pelo HIV com baixo risco de doença;
- TCD4+ entre 200 e 500 células/mm³: estágio caracterizado por surgimento de sinais e sintomas menores ou alterações constitucionais. Risco moderado de desenvolvimento de doenças oportunistas;
- TCD4+ entre 50 e 200 células/mm³: estágio com alta probabilidade de surgimento de doenças oportunistas;
- TCD4+ < 50 células/mm³: estágio com grave comprometimento da resposta imune. Alto risco de doenças oportunistas e de morte.

Evidências confirmam que a infecção inicial pelo HIV rompe o equilíbrio Th1/Th2; e a polarização de citocinas em direção a uma resposta humoral poderia explicar a persistência de infecções oportunistas e piores desfechos clínicos (GUHA; CHATTERJEE, 2009). As citocinas parecem ter significantes efeitos na replicação do HIV, o que, por sua vez, afeta a susceptibilidade a outras DSTs (BELEC *et al.*, 1995).

2.4 Coinfecção HIV/HPV

A persistência da infecção pelo HPV de alto risco está relacionada ao desenvolvimento de NIC e carcinoma cervical. Entretanto, não basta portar o HPV de alto risco para desenvolver lesão. Outros fatores, como a susceptibilidade genética, alterações da resposta imune (DUGGANKEEN *et al.*, 1996), coinfecção com HIV (FRISCH; BIGGAR; GOEDERT, 2000) e tabagismo (KJELLBERG *et al.*, 2000) estão envolvidos. A infecção pelo HIV provavelmente age como um desses fatores, ativando a transformação celular a partir de mecanismos ainda não esclarecidos ou por depressão da imunidade local no trato genital. Evidências sobre a importância da imunidade celular mediada no controle da infecção pelo HPV são provenientes de estudos que mostram prevalência aumentada do HPV e lesões associadas a esse vírus em pacientes com imunossupressão, tais como

transplantados renais e portadores do HIV (HILLEMANNNS *et al*, 1996; LEIGH; GLOVER, 1995).

Mulheres com HIV possuem risco mais alto de infecção persistente pelo HPV. A maioria dos estudos transversais ressalta elevada prevalência de HPV cervical em mulheres infectadas pelo HIV. Essa prevalência continua mais alta, mesmo após ajuste para fatores confundidores tais como idade e comportamento sexual (STRICKLER *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 1995; TEMMERMAN *et al.*, 1999). Em metanálise que incluiu 20 estudos com 5.578 mulheres infectadas pelo HIV em todo o mundo apurou-se que mulheres portadoras de HIV com lesão de alto grau tinham risco aumentado de prevalência de infecção por múltiplos tipos de HPV (*Odds ratio* - OR: 9,3, 95% intervalo de confiança: IC: 6,9-12) (CLIFFORD; GONÇALVES; FRANCESCHI, 2006).

Estudos de coorte salientam que o risco de adquirir infecção pelo HPV é mais alto em mulheres HIV positivo do que nas HIV negativo. Entretanto, a maioria desses estudos não avalia adequadamente se há diferença no comportamento sexual entre as mulheres soronegativas e soropositivas para o HIV para determinar se essas duas infecções são transmitidas sexualmente de forma simultânea ou se o HIV aumenta o risco de aquisição da infecção pelo HPV (CHATUVERDI *et al.*, 2005; MINKOFF *et al.*, 1998; SILVERBERG *et al.*, 2002; STRICKLER *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 1997).

Muitos autores destacam níveis aumentados de DNA HPV em lavados cérvico-vaginais (duas a três vezes mais) e em *swab* anal (até 15 vezes mais) de mulheres infectadas pelo HIV na comparação com as não infectadas (CHIASSEON *et al.*, 2007; HILLEMANNNS *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 1997).

Algumas pesquisas ressaltam que o *status* do HIV influencia a infecção pelo HPV e o desenvolvimento da lesão intraepitelial independentemente da contagem de células TCD4+ (MOSCICKI *et al*, 2000; VERNON *et al.*, 1999). Outros mecanismos além da imunossupressão, tais como a interação molecular entre os genes virais do HIV e do HPV e a instabilidade genética, podem influenciar na

história natural do HPV (DOLEY *et al.*, 1999; PALEFSKY, 2006; PALEFSKY; HOLLY, 2003).

A literatura informa que a coinfeção HIV/HPV pode influenciar a progressão da AIDS por meio de dois potenciais mecanismos: pelo recrutamento de células-alvo do HIV (células TCD4+ e macrófagos) no local da infecção pelo HPV e pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (interleucina - IL-6; fator de necrose tumoral alfa - TNF- α ; IL-1 β). As citocinas pró-inflamatórias induzem a replicação e a transcrição reversa do HIV (GAGE *et al.*, 2000; POLI *et al.*, 1990).

2.5 NIC e HIV

As evidências mais fortes em relação ao papel da resposta imune na infecção pelo HPV são provenientes de estudos em pacientes infectadas pelo HIV, sendo que a maioria enfatiza relação entre a lesão intraepitelial escamosa e a imunossupressão de linfócitos TCD4+ (ELLERBROCK *et al.*, 2000; MOSCICKI, *et al.*, 2000). A prevalência das NICs em pacientes portadoras do HIV é mais alta que nas não portadoras (FRISCH *et al.*, 2001). Ellerbrock *et al.* (2000) constataram, em estudo de coorte, que uma em cada cinco mulheres infectadas pelo HIV desenvolverá lesão intraepitelial escamosa no colo uterino. Investigação feita por Massad *et al.* (1999) apurou prevalência de 17,2% de NIC em pacientes HIV positivo e de 3,5% de NIC em pacientes HIV negativo. Esses mesmos autores, em 2001, registraram aumento da taxa de progressão da NIC no período de seis meses após o diagnóstico entre mulheres portadoras do HIV quando comparadas com não portadoras (MASSAD *et al.*, 2001). Estudo prospectivo revela incidência aumentada de DNA do HPV de alto risco em mulheres infectadas pelo HIV com idade entre 13 e 18 anos, com elevada incidência de NIC 2/3. Segundo esses autores, o risco de NIC nessas mulheres parece estar relacionado mais com a persistência da lesão de baixo grau do que com a persistência do HPV de alto risco sem lesão detectável (MOSCICKI *et al.*, 2004). Além da mais alta prevalência de NIC no grupo de mulheres infectadas pelo HIV, o risco de recidiva após o tratamento também é mais elevado nessas mulheres (LIMA *et al.*, 2009; LODI *et al.*, 2011).

2.6 Resposta imune

A defesa do hospedeiro é uma parceria entre a imunidade inata, representada por fagócitos, proteínas solúveis, citocinas, complemento e barreira epitelial, e a imunidade adquirida, representada por anticorpos e células citotóxicas efectoras. A imunidade inata detecta o patógeno e age como primeira linha de defesa. Não possui memória específica, mas crucialmente ativa a imunidade adaptativa apropriada que gera tanto resposta efetora letal quanto as células de memória (MEDZHITV; JANEWAY, 1997).

O sistema imune adquirido é patógeno-específico e os componentes-chave são as células T, células B e as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos). A imunidade adquirida possui dois “braços funcionais”: a imunidade humoral (anticorpos secretados pelas células B) e a imunidade celular mediada (células T citotóxicas). Após invadir o hospedeiro, o patógeno é capturado pelas células apresentadoras de antígenos, sendo processado, e pequenas porções (peptídeos) são apresentadas a outras células do sistema imune adquirido, sob a forma de complexo peptídeo - complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II presente na superfície das células apresentadoras de antígenos (JANEWAY *et al.*, 2007).

A imunidade adquirida patógeno-específica possui muitas características funcionais, entre as quais está a produção de células T de memória e células B que permanecem no organismo por longo período. Essa memória funcional faz com que após uma segunda exposição ao antígeno ocorra resposta rápida e eficaz (JANEWAY *et al.*, 2007).

A resposta imune celular mediada é regulada por linfócitos T (T *helper* e T citotóxico) em cooperação com as células apresentadoras de antígenos (monócitos e células dendríticas). As moléculas MHC classe I e classe II nas células apresentadoras de antígenos participam no sistema imune adquirido a partir da apresentação do antígeno nas células TCD8+ e TCD4+, respectivamente (JANEWAY *et al.*, 2007). As células TCD4+ possuem importante papel na

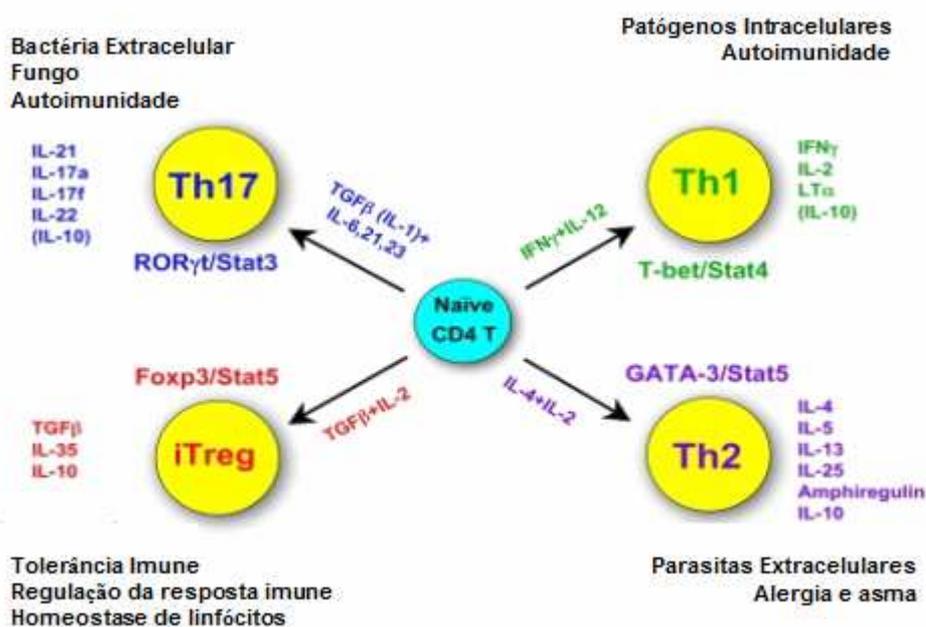
resposta imune, uma vez que possuem a capacidade de ajudar as células B a produzir anticorpos, aumentar a capacidade microbicida de macrófagos e recrutar neutrófilos e basófilos para o sítio da infecção (ZHU; PAUL, 2008). Essas células liberam citocinas que podem interferir na produção uma das outras e agir como uma rede imunorregulatória. Citocinas são pequenas proteínas (~25kDA) que atuam de forma autócrina, afetando o comportamento da própria célula que a produz, ou de forma parácrina, afetando o comportamento de células adjacentes. Algumas citocinas são estáveis o suficiente para agirem de forma endócrina, afetando o comportamento de células à distância (JANEWAY *et al.*, 2007).

As citocinas são frequentemente classificadas como imunoestimulatórias, que são as do tipo Th1 (interferon-gama - $\text{INF-}\gamma$ -, $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 e IL-12), e imunoinibitórias, que são do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10). As citocinas do tipo Th1 são produzidas principalmente por linfócitos, células apresentadoras de antígenos e células *Natural Killer* (NK); e as do tipo Th2 são produzidas principalmente por monócitos e linfócitos (MOSMANN; SAD, 1996; SPELLBERG; EDWARDS, 2001). As células TCD4 podem se diferenciar em células Th1 ou Th2, dependendo de quais citocinas irão produzir sob ativação. A produção seletiva de células Th1 leva à imunidade celular mediada e à produção de anticorpos opsonizantes (predominantemente IgG). Por outro lado, a produção seletiva de células Th2 proporciona a imunidade humoral (imunoglobulina - IgM, IgA e IgE). O tipo de resposta induzida é de extrema importância, pois quando uma resposta Th2 é preferencialmente induzida (resposta principal humoral), os anticorpos não alcançam a infecção intracelular, prejudicando o controle desse tipo de infecção (JANEWAY, *et al.*, 2007). A ativação anormal de Th1 é um evento crítico na maioria das doenças autoimunes, enquanto que a ativação das células Th2 está relacionada a doenças alérgicas e asma (ZHU; PAUL, 2008).

Um subtipo adicional de células T conhecido como T regulatória (*Treg*) secreta $\text{TGF-}\beta$ 1, o qual pode suprimir linfócitos T citotóxicos e a produção de citocinas Th1, sendo esse um mecanismo que altera a resposta imune (ALCONCER-GONZALES *et al.*, 2006). Células TCD4 *naïve* estimuladas pelo $\text{TGF-}\beta$ 1 na ausência de citocinas pró-inflamatórias levam à diferenciação dessas células em *Treg* (CHEN *et al.*, 2003). Mais recentemente foi descrito um quarto subtipo de

células T, classificado como Th17. Esse padrão celular parece estar relacionado à proteção contra bactérias extracelulares e fungos, além de participar em algumas doenças autoimunes (ZHU; PAUL, 2008). A FIG. 1 resume os principais subtipos conhecidos de células T com as citocinas características de cada subtipo; e o QUADRO 1 contém as principais citocinas, suas células produtoras e funções.

FIGURA 1 - Resumo dos quatro perfis de resposta imune com respectivas citocinas características de cada perfil e citocinas que induzem a diferenciação dos perfis.



Fonte: adaptado de Zhu e Paul (2008).

QUADRO 1 - Principais citocinas e suas funções

Citocina	Célula produtora	Ação
IL-1 β	Macrófagos e células epiteliais	Febre, ativação de células T, ativação de macrófagos.
IL-2	Células T	Proliferação de células T.
IL-4	Células T e mastócitos	Ativação de células B, mudança para IgE, induz diferenciação para Th2.
IL-6	Células T, macrófagos, células endoteliais	Crescimento e diferenciação de células B e T, produção de proteínas de fase aguda, febre.
IFN- γ	Células T, Células NK	Ativação de macrófagos, aumento de expressão de moléculas MHC e dos componentes do processamento de antígenos, supressão de Th2.
TNF- α	Células T, macrófagos, Células NK	Inflamação local, ativação endotelial.
TNF- β (linfotóxina)	Células T, Células B	Morte, ativação endotelial.
IL-10	Células T, macrófagos, células B	Potente supressor macrófago.
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, induz a diferenciação de células TCD4 em células semelhantes a Th1.
TGF- β	Condrócitos, monócitos, células T	Inibe crescimento celular, antiinflamatório, induz mudança para a produção de IgA.

Fonte: Adaptado de *Janeway et al* (2007).

A resposta efetora antígeno-específica elimina a infecção pela liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que regulam os mecanismos efetores

inatos, e pela liberação de macromoléculas citotóxicas e pró-apoptóticas para matar a célula infectada pelo vírus (FRAZER, 2009).

A IL-12 é uma citocina-chave na indução da resposta imune celular mediada. É secretada por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Essa citocina promove a diferenciação das células T em células Th1 produtoras de IFN- γ (BRUNDA, 1994; SCOTT, 1993) e também induz a produção de IFN- γ pelas células NK (CHAN *et al.*, 1991).

Interferons são fatores solúveis que podem limitar tanto as infecções virais líticas quanto as não líticas, bem como ativar ou atrair células do sistema imune tais como neutrófilos, células NK, macrófagos e células dendríticas. Sua classificação em tipo I (IFN- α/β) e tipo II (IFN- γ) é baseada em sua sequência e no tipo de receptor utilizado para a sinalização (MALMGAARD, 2004).

O IFN- γ apresenta importante papel na modulação de quase todas as respostas imunes, tais como hematopoiese, diferenciação de células T, atividades antiproliferativas (NICKOLOFF *et al.*, 1984), antitumoral e antiviral (SONG *et al.*, 2008). Promove a diferenciação de células T e B, facilitando a progressão das células TCD4+ para fenótipo tipo Th1 e a maturação de células TCD8+ (JANEWAY *et al.*, 2007). Um dos mecanismos de ação dos interferons é a ativação da síntese e expressão de moléculas do MHC classe I, facilitando a apresentação de epítopos virais e aumentando a capacidade citotóxica dos linfócitos T e das células NK. O IFN- γ é produzido por células T ativadas e por células NK e induz a expressão de moléculas MHC classe II na superfície de queratinócitos e monócitos/macrófagos, permitindo-os agir como células apresentadoras de antígenos. Consequentemente, ativa a resposta imune antiviral (WOODWORTH *et al.*, 1992). É produzido durante a infecção viral e se liga a receptores específicos que desencadeiam eventos intracelulares através das vias *Janus Kinase*, sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT) (IVASHKIV; HU, 2004).

Mesmo na ausência de citólise viral induzida e, consequentemente, morte celular, os queratinócitos infectados pelo HPV devem ativar interferon tipo 1. Os interferons tipo 1 são produzidos pelas células infectadas e possuem propriedades

antivirais, antiproliferativas, antiangiogênicas e imunoestimulatórias, agindo como elo entre a imunidade inata e a adquirida a partir da estimulação de células dendríticas imaturas (LE BON; TOUGH, 2002).

2.6.1 Resposta imune a HPV/ NIC/ HIV

Em 1863, Rudolf Virchow sugeriu possível relação entre infiltrado inflamatório e crescimento tumoral. Aproximadamente um século após, Burnet (1957) e Thomas (1959) postularam a existência de imunovigilância tumoral na qual os linfócitos eram responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de células precursoras do câncer, antes da doença ser clinicamente aparente, agindo como supressor tumoral. No decorrer dos anos, esse conceito foi refinado e atualmente se sabe que tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida participam desse processo (JAYSHREE *et al.*, 2009; WU; KURMAN, 1997; ZUR HAUSEN, 2002).

O ciclo de replicação do HPV é, por si só, um mecanismo de evasão imune, uma vez que o vírus não causa lise celular e depende da diferenciação do queratinócito para sua replicação. O HPV infecta a camada basal do epitélio, provavelmente *stem cells*, com baixo número de cópias. Algum tempo após a infecção, ocorre replicação do DNA viral, atingindo cerca de 50 a 100 cópias por célula. A célula infectada, então, deixa a camada basal do epitélio e entra no compartimento proliferativo do epitélio. A expressão gênica é mínima, pois o DNA viral é mantido sob a forma episomal. Quando o queratinócito infectado entra no compartimento de diferenciação, há um estímulo na expressão gênica e a replicação do DNA viral ocorre, amplificando o número de cópias para cerca de 1.000 por célula (MIDDLETON *et al.*, 2003).

Não se verifica inflamação durante a infecção viral, não havendo, desta forma, sinal de alerta para a imunidade inata. O HPV não leva à lise celular e seu ciclo de vida acontece durante a diferenciação do queratinócito, uma célula que está programada para morrer. Constata-se pouca ou nenhuma viremia (KANODIA; FAHEY; KAST 2007; STANLEY, 2009). A replicação do DNA viral em células indiferenciadas e a formação de partículas nas células diferenciadas da camada

externa do epitélio reduzem a exposição viral ao sistema imune do hospedeiro (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004; TINDLE, 2002). A falha do sistema imune em reconhecer a entrada e a replicação do vírus pode ser explicada pelo fato da infecção não levar à lise celular e, como consequência, não estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004).

O infiltrado linfocitário é constituído predominantemente de células TCD4+ no estroma, logo abaixo do tecido displásico, e de células TCD8+ no epitélio displásico (TAKEHARA, 1996). O padrão de distribuição das células T regulatórias tem mostrado mudar, de forma predominantemente intraepitelial, para o estroma na evolução da infecção pelo HPV para o câncer invasivo (ADURTHI *et al.*, 2008). Isso tem relevância na história natural da infecção pelo HPV e no desenvolvimento do câncer cervical, já que essas células T regulatórias podem levar à imunotolerância de muitos tipos celulares, tais como células NK e células TCD8+ (NAKAMURA *et al.*, 2000).

Outro mecanismo utilizado pelo HPV para evadir o sistema imune é a inibição de citocinas e quimiocinas, que levam à resposta imune, além da produção de enzimas regulatórias como o fator de crescimento tumoral beta – TGF- β (HAZELBAG *et al.*, 2004; KANODIA; FAHEY; KAST, 2007).

A falha do sistema imune em clarear a infecção pelo HPV contribui para a carcinogênese, como sugerido pela observação de alta prevalência do vírus em pacientes imunocomprometidas (AIDS, uso de imunossupressores), assim como elevada incidência de NIC e câncer invasor nessa população (GRULICH, *et al.*, 2007). Não é claro se a coinfeção HIV/HPV afeta a síntese de citocinas tipo 1 e tipo 2 e a medida em que isso contribui para o desenvolvimento das lesões intraepiteliais escamosas. Pessoas com déficit da imunidade celular, seja devido à infecção pelo HIV (PALEFSKY, 2007), imunossupressão iatrogênica (ULRICH *et al.*, 2008) ou por deficiência congênita da imunidade (LAWRENCE *et al.*, 2005), possuem risco aumentado tanto de persistência da infecção pelo HPV quanto de lesões associadas a esse vírus. Alguns estudos mostram que o HIV altera a expressão de constituintes imunes locais, possivelmente aumentando a virulência

ao HPV entre as pacientes infectadas pelo HIV (CROWLEY-NOWICK *et al.*, 2000).

A expressão das citocinas do tipo Th1 pode ser o ponto principal em direcionar adequada resposta imune na mucosa cervical, enquanto uma resposta do tipo Th2 pode ser ineficaz em impedir a progressão para lesão de alto grau (SCOTT; STITES; MOSCICKI, 1999). Na evolução do câncer cervical, um microambiente tumoral é gerado, o que contribui para a progressão de lesões precursoras (MOTA *et al.*, 1999). Muitos produtos gênicos pró-inflamatórios têm sido identificados como mediadores na supressão de apoptose, proliferação, angiogênese, invasão e metástases (NICOL *et al.*, 2008). Citocinas nesse microambiente podem conduzir a sinais de crescimento, promover instabilidade genômica e transformação maligna, o que explicaria parcialmente o risco aumentado de câncer em pacientes coinfectadas pelo herpes vírus-2, clamídia ou outro patógeno (SMITH *et al.*, 2002).

A caracterização do efeito estimulatório do crescimento pelas citocinas tem levado a sugerir que a inflamação crônica com produção de citocinas pró-inflamatórias pode, em verdade, proporcionar vantagem seletiva para as células anormais *in vivo*. Isto sugere um possível mecanismo de escape em relação à inibição do crescimento pela citocina na infecção pelo HPV (ANDERSON; ARMITAGE; WEISENBURGER, 1998; TJIONG *et al.*, 2001; WOODWORTH *et al.*, 1995).

As células T regulatórias também parecem estar envolvidas no processo tumoral. Essas células são CD4⁺ CD25^{hi} e secretam TGF- β (SCOTT *et al.*, 2009). TGF- β é uma citocina multifuncional que impede a resposta imune celular a partir da inibição da proliferação e diferenciação das células T em células T citotóxicas e T auxiliares (*helper*) e por inibição das funções estimulatórias induzidas pelas células apresentadoras de antígenos (LETTERIO; ROBERTS, 1998). Mesmo que se verifique resposta de células T citotóxicas antígeno-específicas, o aumento das células T regulatórias dominam a lesão e anulam a resposta de defesa (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

A IL-4 é uma citocina secretada principalmente por linfócitos Th2 e exerce uma variedade de efeitos em diferentes tipos celulares, tais como monócitos, linfócitos

B, mastócitos e queratinócitos (NELMS *et al.*, 1999). A expressão aumentada dessa IL no carcinoma cervical reflete desequilíbrio da resposta imune nas mulheres infectadas pelo HPV (VAN DRIEL *et al.*, 1999).

Por outro lado, altos níveis de IFN- γ estão tipicamente associados à defesa efetiva do hospedeiro contra infecções virais, como o HPV. Expressões intratumorais diminuídas de IFN- γ têm sido associadas a pior prognóstico em pacientes com câncer cervical. Entretanto, a produção aumentada de IFN- γ em células inflamatórias associadas ao tumor pode contribuir para seu crescimento e progressão (SHACTER; WEITZMAN, 2002). A maioria dos vírus de DNA tem mecanismos que inibem a síntese e a sinalização de interferon, e dentre estes, o HPV de alto risco inibe a expressão gênica do INF- α (STANLEY; PETT; COLEMAN, 2007).

Woodworth *et al.* (1992) referiram que o tratamento com IFN- γ de queratinócitos imortalizados pelos HPVs 16, 18 e 33 aumenta a transcrição de moléculas do MHC classe II. Em verrugas que apresentam remissão observa-se grande infiltrado no estroma e no epitélio de células T (CD4+ e CD8+) e de macrófagos com ambiente dominado por citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-12 e IFN- γ (STANLEY; SCARPINI; COLEMAN, 2003), com aumento de moléculas de adesão (COLEMAN; STANLEY, 1994). A forma episomal do HPV é clareada pela ação do IFN- β . Entretanto, a forma integrada do DNA escapa à ação do IFN, sendo este outro mecanismo de evasão imune (PETT *et al.*, 2006).

A IL-12 é uma citocina-chave na indução da resposta imune celular mediada. É secretada por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Promove a diferenciação das células T em células Th1 produtoras de IFN- γ (CROWLEY-NOWICK *et al.*, 2000) e também induz a produção de IFN- γ pelas células NK. Além da importante ação da IL-12 na defesa contra patógenos intracelulares, tais como vírus, muitas pesquisas evidenciam que essa IL apresenta atividade antitumoral em uma variedade de modelos tumorais murinos, como câncer de bexiga, câncer renal e melanoma (BRUNDA *et al.*, 1993). Essa IL também é conhecida por inibir a angiogênese (VOEST *et al.*, 1995).

Uma vez que os parâmetros da imunidade, como os níveis séricos de citocinas, não necessariamente correspondem aos níveis produzidos no colo uterino, o estudo da imunidade local torna-se importante para o entendimento da resposta do hospedeiro em relação à infecção cervical pelo HPV. Desta forma, é importante o conhecimento do papel das citocinas na história natural do HPV e melhor entendimento da interação HIV/HPV, devido ao elevado número de indivíduos coinfectados.

3 OBJETIVOS

- Avaliar a resposta imune local a partir da presença das citocinas IL-4, IL-12, TGF- β e IFN- γ no estroma, logo abaixo do epitélio displásico, e comparar se existe diferença no perfil da resposta imune em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV.
- Comparar a resposta imune entre NIC 1 e NIC 2/3 no colo uterino.
- Avaliar se existe interação entre o HIV e o grau da NIC na resposta imune local.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo transversal, retrospectivo, realizado a partir de material obtido por conização do colo uterino de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. A conização foi feita por CAF.

As variáveis de desfecho foram o HIV e o grau de lesão na peça da CAF. As variáveis preditoras foram as citocinas (IL-4, IFN- γ , TGF- β , IL-12), HIV (para o desfecho grau de lesão na peça da CAF), grau de lesão na peça de CAF (para o desfecho HIV), citologia, idade, paridade, idade de início de atividade sexual, número de parceiros, colposcopia e biópsia.

4.2 Pacientes

Foram analisados blocos parafinados de 85 mulheres, assim distribuídas: 47 eram infectadas pelo HIV e 38 eram não infectadas. Todas possuíam algum grau de NIC, ou seja, NIC 1, NIC 2 ou NIC 3.

As pacientes infectadas pelo HIV foram procedentes 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 e 2007. Essas pacientes foram atendidas no ambulatório de Ginecologia do Centro de Treinamento e Referência de doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas (CTR-DIP Orestes Diniz).

As pacientes não infectadas pelo HIV foram procedentes do Posto de Atendimento Médico da Sagrada Família (PAM Sagrada Família) - Serviço de Patologia do

Colo, Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PBH (CEP/PBH) em 2008.

Todas as pacientes foram submetidas à CAF no período entre 1999 e 2004, como terapêutica para NIC. A histopatologia foi considerada padrão-ouro no diagnóstico de NIC.

Os blocos parafinados foram selecionados a partir do levantamento de seus números de registro no PAM Sagrada Família, onde elas foram submetidas à CAF. Esses blocos encontravam-se estocados nos laboratórios Tafuri de Patologia e Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatologia da Regional Noroeste da Secretaria Municipal de Saúde (SMSA) da PBH, que eram os laboratórios de referência do serviço na época. Eles foram cedidos pelos responsáveis técnicos dos respectivos laboratórios, sob termo de cessão, ficando sob inteira responsabilidade do pesquisador.

Para esta pesquisa, foi aprovado um adendo ao Programa Multicêntrico para Controle e Prevenção das Lesões Cervicais de Alto Grau e do Câncer Cérvico-Uterino em Mulheres Portadoras do HIV, aprovado pelo COEP/UFMG em 2002 (COEP 089/02). Esse adendo permite que as pacientes que já fazem parte do Programa Multicêntrico possam também fazer parte deste estudo de resposta imune local associada à NIC em mulheres portadoras e não portadoras do HIV.

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 o Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta e a Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin, para serem estudados pela técnica de imuno-histoquímica.

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos blocos parafinados de pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV com algum grau de NIC que concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos blocos em que não havia representação epitelial. Foram excluídas lâminas em que não havia representação do epitélio ou do estroma, bem como lâminas de má qualidade (epitélio dobrado não permitindo a contagem celular).

4.3 Método

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

Todas as pacientes incluídas no estudo, infectadas e não infectadas pelo HIV, possuíam teste sorológico positivo ou negativo, respectivamente, segundo a Portaria nº 488, de 17 de junho de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, na época em que foram submetidas à CAF.

4.3.2 Exame histopatológico

Como parte do protocolo de atendimento do ambulatório, todas as pacientes atendidas foram submetidas à coleta da citologia oncótica e colposcopia. Na presença de alguma alteração colposcópica, realizou-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 realizadas antes da 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 (ANEXO C).

A terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical seguiu a orientação de Wright *et al.* (1994a), baseada na classificação de Richart (1973) (ANEXO D):

A) LSIL: compreende NIC 1 e HPV.

B) HSIL: compreende displasia moderada (NIC 2) e displasia acentuada (NIC 3).

Portanto, as pacientes incluídas neste estudo são aquelas que tiveram alteração citológica ou colposcópica, foram submetidas à biópsia do colo e apresentaram algum grau de lesão, tendo sido encaminhadas à 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 como porte de pequena cirurgia, no período de 1999 a 2004, por apresentarem biópsia compatível com NIC 1, 2 e 3. A maioria das biópsias com resultado NIC 1 fazia parte do grupo de mulheres infectadas pelo HIV, visto que o protocolo de atendimento do ambulatório de ginecologia do CTR-DIP Orestes Diniz determinava que as pacientes portadoras de HIV com NIC 1 seriam submetidas à CAF.

O aparelho utilizado para a CAF foi o *Wavetronic* 2000 acoplado ao aspirador de fumaça. Em todo o procedimento foi retirada a junção escamocolunar (JEC), com a preocupação de obter-se margem endocervical negativa para a neoplasia.

Após o procedimento, o material era fixado com solução de formaldeído a 10%, com volume pelo menos 10 vezes superior ao volume do espécime cirúrgico obtido, e encaminhado para análise em laboratório. No laboratório o material era incluído em blocos de parafina para, posteriormente, serem examinados.

4.3.4 Técnica de imuno-histoquímica

O método de imuno-histoquímica foi utilizado para avaliar a resposta imune local nas peças de colo uterino. 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 Jorge Adad, a qual avaliou a qualidade do corte e o tipo de lesão intraepitelial presente, classificando-a com base em Richart. Foram realizadas marcação em cada lâmina com caneta apropriada, com o objetivo de delimitar o local da lesão. A lâmina marcada serviu de guia para a avaliação dos demais cortes quanto ao local onde fazer a leitura da imuno-histoquímica.

As lâminas foram codificadas para que o observador não soubesse a origem das pacientes em fase alguma do estudo, ou seja, se eram de mulheres soropositivas ou soronegativas para o HIV.

A seguir, descreve-se a técnica realizada:

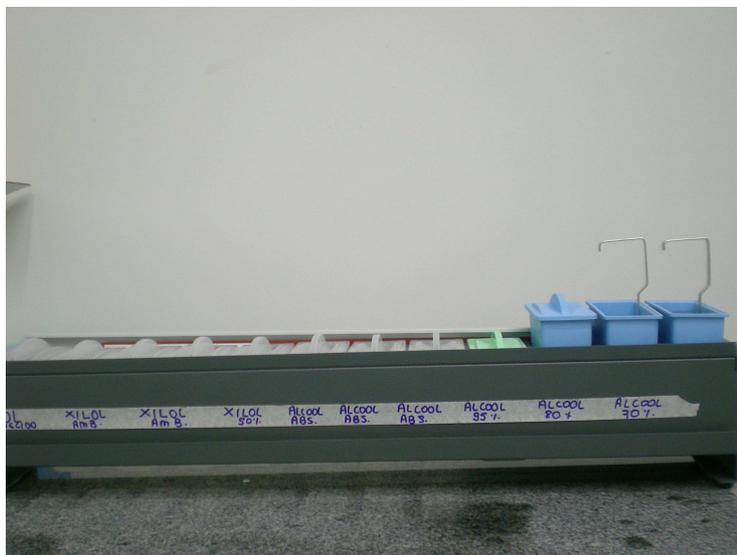
- Preparo das lâminas: a silanização das lâminas foi realizada utilizando-se solução de silano 6% em acetona (94 mL de acetona + 6 mL de silano). As lâminas foram colocadas na solução de silano por três minutos e feitos, em seguida, três banhos rápidos em água destilada. As lâminas foram secas em estufa.
- Preparo do corte: foram obtidos cortes de 4 µm de espessura com micrótomo (marca Leica - FIG. 2) e o fragmento foi colocado em água fria. Em seguida, o fragmento foi mergulhado em água quente e colocado na lâmina silanizada e levado para secar por 1 hora em estufa (temperatura entre 40 e 60°).

FIGURA 2 - Micrótomo utilizado nos cortes



- Desparafinização: para iniciar o processo, as lâminas foram levadas à estufa, *overnight*, na temperatura de 37°C. Pela manhã, a temperatura da estufa foi elevada para 60°C por 1 hora. Em seguida, foram obedecidas as seguintes sequências de banho em xilol: xilol aquecido (60°C) por 10 min, dois banhos de três minutos cada em xilol à temperatura ambiente e um banho de três minutos em xilol 50% (50 mL de xilol em 50 mL de álcool absoluto).
- Hidratação: a hidratação das lâminas foi feita usando-se as seguintes sequências de banho em álcool - três banhos de três minutos cada em álcool absoluto, um banho de três minutos em álcool 95%, um banho de três minutos em álcool 80% e um banho de três minutos em álcool 70% em bancada (FIG. 3). Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e procedidos dois banhos em água destilada.

FIGURA 3 - Bancada utilizada para desparafinização e hidratação das lâminas



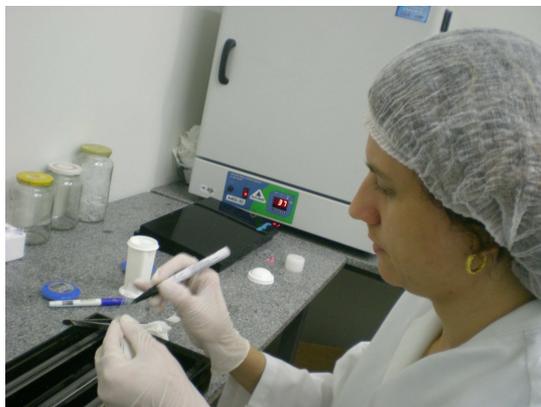
- Reativação antigênica, sendo que as seguintes soluções foram utilizadas: citrato potencial de hidrogênio (pH) 6,0 (ácido cítrico mono-hidratado), *etilenodiaminotetracetatodossódico* (EDTA) e TRIS EDTA (ANEXO E). O que definiu qual solução a ser utilizada foi o anticorpo primário que estava sendo trabalhado na reação. O tampão foi colocado em jarra de Couplin e aquecido em micro-ondas por cerca de 1 minuto (até atingir o ponto de ebulição). Em seguida, as lâminas foram retiradas da água destilada e colocadas no tampão. As jarras foram fechadas e colocadas na panela Pascal (FIG. 4) por seis minutos à temperatura de 98°C. Após, foram retiradas da panela e deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos. O tampão então foi desprezado e foi realizada lavagem rápida em solução *phosphate buffered saline* (PBS).

FIGURA 4 - Reativação antigênica



- Bloqueio da peroxidase endógena: o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir da solução de peróxido 1,5% (45 mL de metanol + 5 mL de peróxido) durante 10 minutos. Após esse tempo a solução foi desprezada em um recipiente e foi realizado banho em solução PBS por três minutos para, em seguida, marcar os cortes com caneta específica para imuno-histoquímica (FIG. 5). As lâminas marcadas foram montadas em bandeja de incubação e banhadas com solução *tris buffer saline tween* (TBST) durante dois minutos. As lâminas foram escorridas e novamente foi realizado banho durante três minutos com a mesma solução.

FIGURA 5 - Marcação com caneta



- Bloqueio da biotina: o bloqueio da biotina foi realizado com 3 g de leite em pó (Molico[®], Nestlé) em 100 mL de TRIS HCL durante 10 minutos seguidos de banho com *Tris buffer saline* (TBS) por dois minutos (FIG. 6).

FIGURA 6 - Bloqueio da biotina



- Anticorpo primário: foram utilizados os seguintes marcadores para avaliar a resposta imune local: IFN- γ , IL-4, TGF- β , e IL-12.
 - a) **TGF- β** : especificação do anticorpo - *mouse* monoclonal, NCL TGF- β , lote 6001375; exp. 2012-10; Novocastra (Leica *biosystems Newcastle Ltd* - *United Kingdom*). Diluição: 1/200 (diluído em solução de soroalbumina bovina - BSA 0,1%). Tampão: citrato.
 - b) **IL-12**: especificação do anticorpo - *mouse* monoclonal (IgG1) IL 12 p70 (14 L7), sc 74150, lote # 62409 (Santa Cruz *Laboratory*, Santa Cruz, CA, USA). Diluição: 1/50 (diluído em solução de BSA 0,1%). Tampão: Tris EDTA.
 - c) **IL-4**: especificação do anticorpo - *mouse* monoclonal (IgG2a). NyRhIL4, sc 73317, lote #1409 (Santa Cruz *Laboratory*, Santa Cruz, CA, USA). Diluição 1:50 (diluído em solução de BSA 0,1%). Tampão: citrato.
 - d) **IFN- γ** : especificação do anticorpo - *mouse* monoclonal, Santa Cruz *Laboratory*, Santa Cruz, CA, USA. Diluição: 1:100 (diluído em solução de BSA 0,1%). Tampão: EDTA.

Antes do uso do anticorpo primário foi realizada sua padronização, sendo a diluição específica para cada anticorpo (ANEXO F). O anticorpo primário foi

colocado cobrindo todo o corte (FIG. 7) e deixado *overnight* à temperatura de 4°C. No dia seguinte, foi colocado à temperatura ambiente e realizados três banhos de três minutos cada em solução de TBST.

FIGURA 7 - Anticorpo primário



- Anticorpo secundário: foi utilizado o *Mach 4 Mouse Probe* (UP534L-*Biocare medical* - FIG. 8) em temperatura ambiente por 30 minutos com a bandeja de incubação fechada. Após esse tempo foram realizados três banhos de três minutos cada com solução de TBST.
- Polímero: foi utilizado o *Mach 4 HRP Polymer* (MRH534L - *Biocare medical* – FIG. 8) em temperatura ambiente por 30 minutos com a bandeja de incubação fechada. Após, foram realizados três banhos de três minutos cada com solução de TBST para, em seguida, proceder a um banho em solução de TRIS HCL (pH = 7,6) por quatro minutos.

FIGURA 8 - Anticorpo secundário e polímero



- Revelação (cromógeno): para a revelação foi utilizada *diaminobenzidina* (DAB). A solução foi aplicada sobre as lâminas por cerca de 30 a 60 segundos enxaguando-as com água destilada, com o objetivo de parar a reação.
- Contracorar: a contracoloração foi realizada utilizando-se a solução de hematoxilina por cinco segundos.
- Desidratação: a desidratação das lâminas seguiu as seguintes sequências de banhos em álcool - um banho em álcool 70% por dois minutos, um banho em álcool 80% por dois minutos, um banho em álcool 95% por dois minutos e dois banhos em álcool absoluto por dois minutos cada.
- Diafinização: esta etapa constou de dois banhos de dois minutos cada, em solução de xilol.
- Montagem da lâmina: a lâmina foi montada utilizando-se uma gota de Ver Mount em lamínula e, em seguida, foram secas em temperatura ambiente (FIG. 9).

FIGURA 9 - Lâminas prontas secando em temperatura ambiente



4.3.5 Contagem celular

A contagem celular foi realizada com o microscópio Olympus BX 41 com magnificação de 400x (40 x da objetiva e 10x óptica). Foi feita a contagem celular no estroma. O estroma foi avaliado logo abaixo da lesão, que foi previamente demarcada pelo patologista, com contagem de três campos. No caso de não ser possível a confecção dos três campos pela qualidade do corte, foram avaliados quantos foram possíveis. Cada campo apresenta 0,23 x 0,310 μm de dimensão. Nas FIG. 10, 11, 12 e 13 apresenta-se a avaliação histopatológica das lâminas para a leitura da imuno-histoquímica dos marcadores TGF- β , IFN- γ , IL-12 e IL-4, respectivamente.

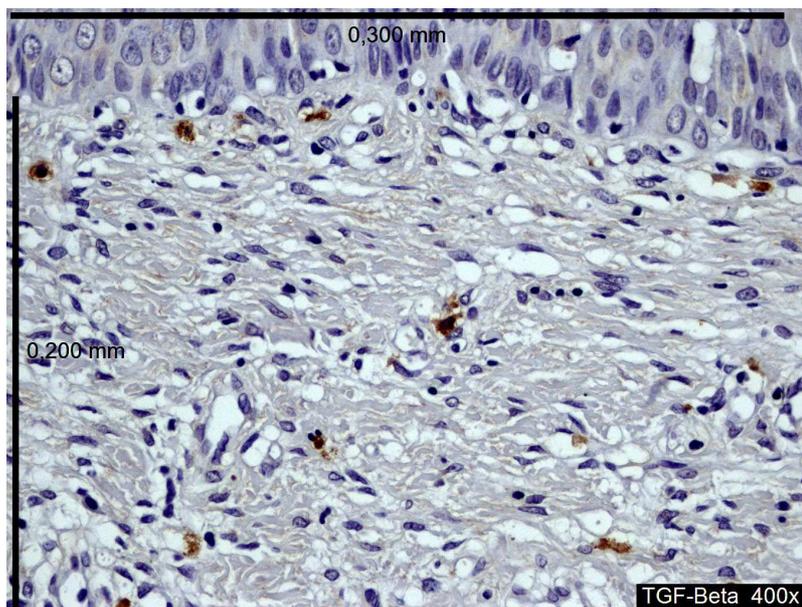
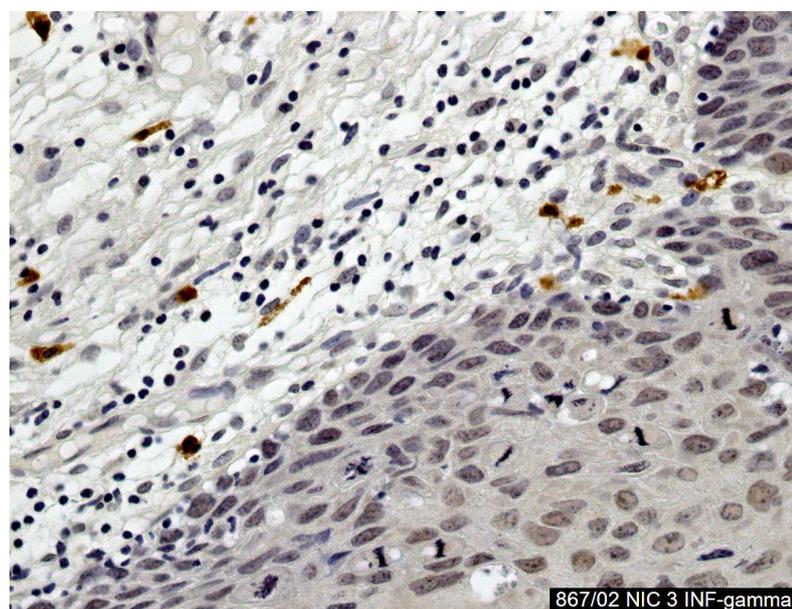
FIGURA 10 - Marcação para TGF- β FIGURA 11 - Marcação para IFN- γ 

FIGURA 12 - Marcação para IL-12

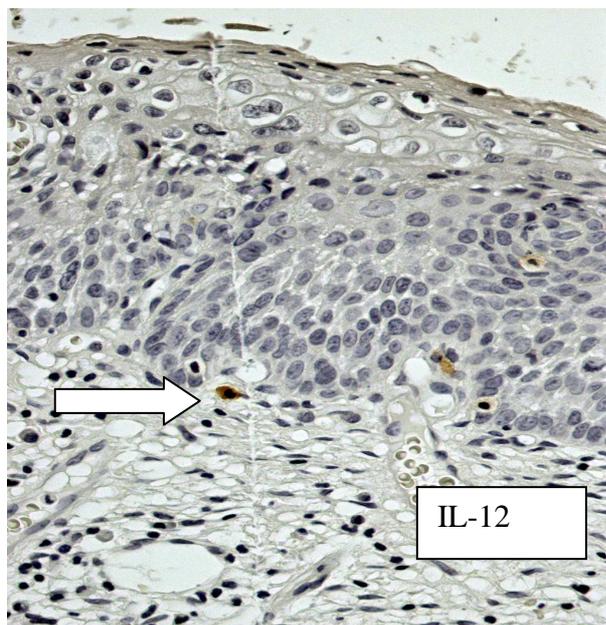
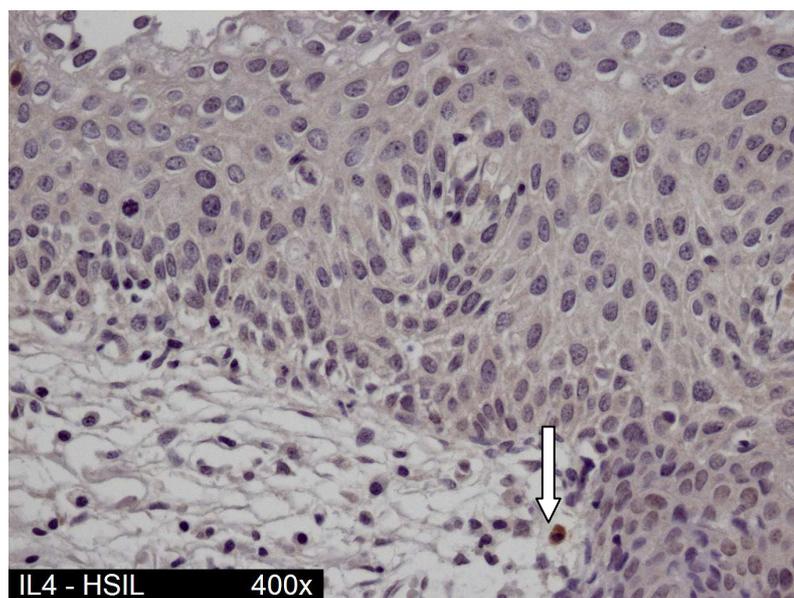


FIGURA 13 - Marcação para IL-4



4.4 Análise estatística

4.4.1 Cálculo amostral

Não foi realizado cálculo amostral. Este estudo foi idealizado para dar sequência à pesquisa feita por Cláudia Teixeira da Costa Lodi para obtenção do título de

mestrado, em 2009. A ideia inicial era estudar todas as pacientes que foram incluídas no estudo anterior, que totalizavam 138, com o objetivo de avaliar a resposta imune local dessas pacientes.

No entanto, concluiu-se que seria oneroso e não haveria tempo hábil (houve demora na entrega dos anticorpos utilizados na reação por parte dos fornecedores) para realizar a técnica de imuno-histoquímica em tantas pacientes, pois para cada uma delas foram testados inicialmente nove marcadores (quatro de citocinas e cinco de tipos celulares). E como a maioria dos estudos não ultrapassa 80 pacientes, foi estabelecido que seriam incluídas 85 pacientes.

4.4.2 Metodologia da análise

A análise foi dividida em etapas, explicadas a seguir.

4.4.2.1 Análise descritiva dos grupos

Iniciou-se a avaliação pela análise descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. Nessa etapa foram analisados os grupos quanto às variáveis idade, paridade, idade de início de atividade sexual e número de parceiros a partir da medida das médias e medianas por meio do teste U-Mann-Whitney. Essas variáveis foram transformadas em categóricas para, em seguida, iniciar-se a análise univariada.

4.4.2.2 Análise univariada

Essa etapa da análise tem como objetivo verificar, entre as variáveis idade, paridade, atividade sexual, número de parceiros, citologia, colposcopia, biópsia, tabagismo e citocinas (IL-4, IL-12, TGF- β , IFN- γ), quais são significativamente associadas às variáveis-resposta HIV e grau da lesão. Foram utilizados os testes U-Mann-Whitney e Qui-Quadrado para avaliar se existem associações,

considerando-se o nível de significância de 0,05. Essa etapa também tem o objetivo de selecionar os potenciais preditores para as regressões múltiplas.

Nessa fase também foram testadas possíveis interações entre as variáveis da resposta imune, o HIV e o grau da lesão. Para a análise das interações, foram construídos gráficos de interação.

4.4.2.3 Análise multivariada

Para modelar a probabilidade de encontrar associação das citocinas com o HIV, assim como para modelar a probabilidade de encontrar associação com NIC de alto grau, foi utilizada a regressão logística, usando-se como preditores as variáveis previamente selecionadas na análise univariada. Com o intuito de evitar problemas devido à multicolinearidade, nas regressões múltiplas para HIV e grau da NIC foram selecionados os potenciais preditores na análise univariada, adotando-se nível de 0,20 de significância. Para verificar a qualidade do ajuste das regressões logísticas, foi realizado o teste de Hosmer-Lemeshow.

O *software* empregado na análise foi R versão 2.13.1.

4.5 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 21 de janeiro de 2010 sob parecer de número ETIC 0526.0.203.000-09 (ANEXO B). Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 47 peças parafinadas de mulheres infectadas pelo HIV e 38 de não infectadas, totalizando 85 peças.

5.1 Análise descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto a: idade, paridade, início de vida sexual. Entre as mulheres não infectadas pelo HIV, a idade variou entre 19 e 71 anos, com mediana de 35 anos; nas infectadas a idade variou de 21 a 55 anos, com mediana de 33 anos. A idade da primeira relação nas mulheres não infectadas pelo HIV ocorreu entre 13 e 21 anos, com mediana de 17,5 anos; e nas infectadas, variou de 13 a 29 anos, com mediana de 17 anos (TAB. 1).

TABELA 1 - Análise de média e mediana para idade, paridade e início da atividade sexual entre as pacientes infectadas e não infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana

Variáveis	Infectadas pelo HIV (n=47)		Não infectadas pelo HIV (n=38)		*Valor P
	Média +-dp	Mediana (A)	Média +-dp	Mediana (A)	
Idade (anos)	32,8 ±7,8	33 (21-55)	35,3 ± 9,7	35 (19-71)	0,25
Paridade	2,1 ± 1,45	2 (0-8)	2,6 ± 1,8	2 (0-7)	0,24
Idade de início de vida sexual	18,0 ± 3,72	17(13-29)	17,3 ± 2,02	17,5(13-21)	0,88

*teste U-Mann-Whitney. dp: desvio-padrão. A: amplitude

Em relação à caracterização quanto à imunidade sistêmica e à carga viral do grupo de mulheres infectadas pelo HIV, pôde-se constatar valor médio de linfócito TCD4+ de 293,87 células/mm³ com 50% das pacientes apresentando linfócito

TCD4+ de até 266 células/mm³. O valor mínimo do linfócito TCD4+ foi de 23 células/mm³ e o máximo de 745 células/mm³; 25% das mulheres apresentavam linfócito TCD4+ de até 171 células/mm³. Quanto à carga viral, observou-se média de 5.013 cópias/mL, variando de zero a 7.638 cópias/mL (TAB. 2). Apenas uma paciente não estava fazendo uso de terapia antirretroviral de alta potência (HAART).

TABELA 2 - Medidas descritivas para linfócitos TCD4+ e carga viral entre as mulheres infectadas pelo HIV

Variáveis	N	Média	Desvio	Mín.	1 ^a Q	2 ^a Q	3 ^a Q	Máx.
TCD4+ (células/mm ³)	47	292,87	172,47	23,0	171,0	266,0	412,0	745,0
Carga viral (cópias/mL)	47	5013	2333	0,0	3194	5416	6944	7638

5.2 Análise descritiva dos grupos em relação ao grau da lesão

A idade média das mulheres portadoras de NIC 1 foi de 32 anos e das mulheres portadoras de NIC 2/3 foi 35 anos, sendo essa diferença não significativa (P=0,28). Os grupos também foram homogêneos quanto à paridade e à idade de início de atividade sexual (TAB. 3).

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

Variáveis	NIC 2/3 (n=46)		NIC 1 (n=39)		Valor P
	Média +-dp	Mediana (A)	Média +-dp	Mediana (A)	
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 (0-8)	2,03 ± 1,4	2 (0-6)	0,17
Idade de início de vida sexual	17,66 ± 3,48	17(13-29)	17,76 ± 2,54	17(14-25)	0,56

*teste U-Mann-Whitney. A: amplitude

5.3 Análise univariada em relação ao HIV

Na TAB. 4 dicotomizam-se as variáveis sociodemográficas considerando-se como ponto de corte a mediana de cada uma (TAB. 1), com exceção da idade em que foi avaliada como ponto de corte 30 anos, por ser esta a idade de início de rastreamento para o HPV segundo o *guideline* americano (WRIGHT JR. *et al.*, 2007). Como pode ser visto na TAB. 4, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto a: idade (P=0,697), paridade (P=0,212) e idade de início de atividade sexual (P=0,77). Quanto ao tabagismo, foi levado em consideração apenas se a paciente era fumante ou não no momento da consulta.

TABELA 4 - Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a variável vírus da imunodeficiência humana

Variáveis	Infectadas pelo HIV (n= 47)		Não infectadas pelo HIV (n= 38)		Valor P*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
Idade							
≤ 30	18	39,3	13	34,2	0,70	1	0,34-2,04
> 30	29	61,7	25	65,8		0,84	
Tabagismo							
Não	30	63,8	23	60,5	0,76	1	0,48-2,78
Sim	17	36,2	15	39,5		1,15	
Paridade							
≤ 2	31	66	20	52,6	0,21	1	0,73-4,19
> 2	16	34	18	47,4		1,74	
Idade início vida sexual							
≤ 17 anos	25	53,2	19	50	0,77	1	0,48-2,68
> 17 anos	22	46,8	19	50		1,13	

*Teste Qui-quadrado Pearson

Analisando os grupos quanto à citologia realizada na época do encaminhamento para a consulta de patologia do colo, não houve diferença significativa ($P=0,27$).

A colposcopia prévia à CAF foi mais grave nas pacientes não infectadas pelo HIV, com diferença significativa entre os grupos ($P=0,000$). Na biópsia houve predomínio de NIC 2 e 3 nas não infectadas pelo HIV (81,6%), achado compatível com a colposcopia, com diferença também significativa entre os grupos ($P=0,000$). Entretanto, comparando os graus das lesões encontradas nas peças da CAF, não houve diferença significante entre os grupos ($P=0,133$) (TAB. 5).

TABELA 5 - Comparação entre citologia, colposcopia, resultado da biópsia e histopatológico da CAF, segundo o vírus da imunodeficiência humana

Variáveis	Infectadas		Não infectadas		Valor P	OR	IC a 95%
	pelo HIV		pelo HIV				
	n	%	N	%			
Citologia							
Normal	18	38,3	9	23,7	0,27**	1	0,22–1,52
Alterada	29	61,7	25	76,3		0,58	
ASCUS			4	10,5			
Colposcopia							
Grau 1	33	70,2	7	18,4	0,000	1	0,03-0,27
Grau 2	14	29,8	31	81,6		0,10	
Biópsia							
NIC 1	37	78,7	7	18,4	0,000	1	0,02-0,16
NIC 2/3	10	21,3	31	81,6		0,52	
Grau de lesão na CAF							
NIC 1	25	53,2	14	36,8	0,133	1	0,21-1,23
NIC 2/3	22	46,8	24	63,2		0,51	

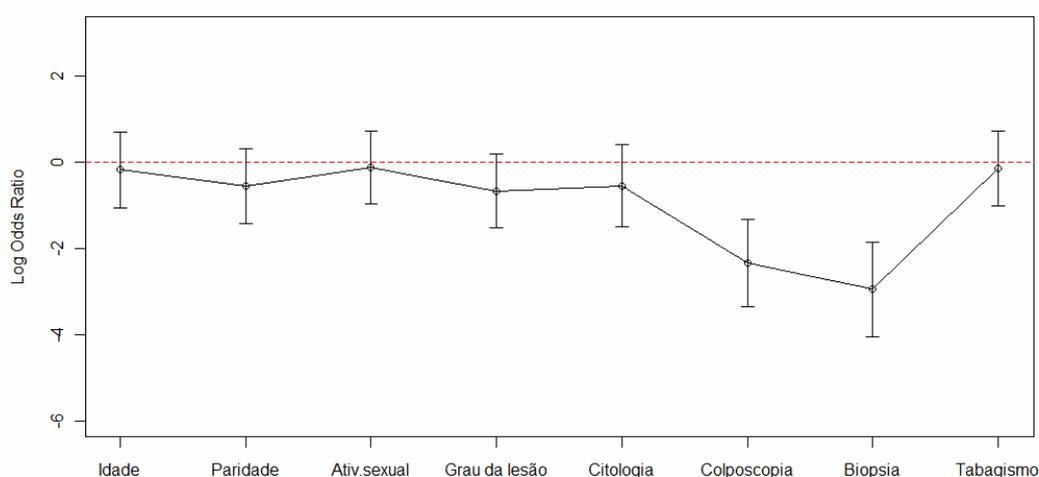
* Teste Qui-quadrado Pearson.

**valor p excluindo os 4 casos de ASCUS.

ASCUS: Atipias de significado indeterminado em células escamosas.

No GRÁF. 1 pode-se verificar o logaritmo das razões de chance e seus intervalos de confiança, conforme apresentado nas TAB. 4 e 5. Nesse gráfico pode-se observar que as únicas variáveis significativas cujos intervalos de confiança não passam pelo 1 foram colposcopia e biópsia.

GRÁFICO 1 - Logaritmo das razões de chance para comparação dos grupos HIV positivo e negativo entre as variáveis idade, paridade, atividade sexual, grau da lesão, citologia, colposcopia, biópsia e tabagismo



5.3.1 Análise univariada da citocinas segundo o Vírus da Imunodeficiência Humana

Ao comparar a resposta imune à presença do vírus da imunodeficiência humana, não se constatou associação com alguma das citocinas avaliadas (TAB.6).

TABELA 6 - Avaliação das citocinas locais segundo o vírus da imunodeficiência humana

Citocinas	Infectadas pelo HIV (n=47)		Não infectadas pelo HIV (n=38)		Valor P*
	n	Mediana (A)	n	Mediana (A)	
IFN- γ **	45	7,0 (0-43)	35	4 (0-42)	0,472
TGF- β ***	46	27(5-112)	38	23,5 (10-61)	0,791
IL-4****	41	1,0 (0-23)	37	0 (0-29)	0,287
IL-12*****	46	1,0 (0-12)	37	1,0(0-12)	0,842

* Teste U-Mann-Whitney.

** excluídos 3 casos por material inadequado.

*** excluídos 1 caso por ausência de epitélio na lâmina.

****excluídos 7 casos por material inadequado.

***** excluídos 2 casos por material inadequado.

5.4 Análise univariada quanto ao grau de lesão

Na TAB. 7 nota-se que as variáveis idade (P=0,42), paridade (P=0,25), idade de início de atividade sexual (P=0,72) e tabagismo (P=0,45) não apresentaram evidências de associação significativa com a variável grau da lesão, levando-se em consideração as peças cirúrgicas de todas as pacientes (TAB. 7).

TABELA 7 - Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo o grau da lesão

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.

Analisando os grupos quanto ao grau da lesão na CAF, encontrou-se diferença significativa entre os grupos quanto a: citologia (P=0,041), colposcopia (P=0,043) e biópsia (P=0,046). A chance de uma paciente com NIC 2/3 apresentar citologia alterada é de aproximadamente 2,7 vezes a chance de uma paciente com NIC 1. A chance de uma paciente com NIC 2/3 apresentar colposcopia grau 2 é de aproximadamente 2,5 vezes a chance de uma com NIC 1 (TAB. 8).

TABELA 8 - Comparação entre citologia, colposcopia, resultado da biópsia e *status* do HIV segundo o grau da lesão

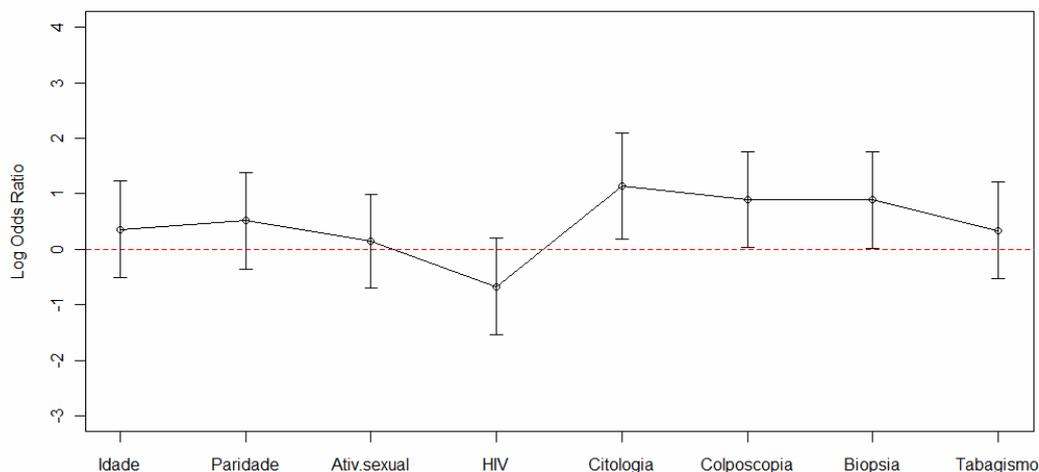
Variáveis	NIC 2/3 (n=47)		NIC 1 (n= 38)		Valor P*	OR	IC a 95%
	n	%	N	%			
Citologia							
Normal	10	21,3	17	44,7	0,041	1	1,03-6,93
Alterada	33	70,2	21	55,3		2,67	
ASCUS**	4	8,5					
Colposcopia							
Grau 1	17	37,0	23	59,0	0,043	1	1,02-5,88
Grau 2	29	63,00	16	41,0		2,45	
Biópsia							
NIC 1	19	41,3	24	63,2	0,046	1	1,01-5,89
NIC 2/3	27	58,7	14	36,8		2,46	
HIV							
Negativo	24	52,2	14	35,9	0,133	1	0,21-1,23
Positivo	22	47,8	25	64,1		0,51	

* Teste Qui-quadrado Pearson.

**valor p excluindo os quatro casos de Ascus.

Verifica-se, no GRÁF. 2, o logaritmo das razões de chance e seus intervalos de confiança, conforme apresentado nas TAB. 7 e 8. Nesse gráfico as únicas variáveis significativas cujos intervalos de confiança não passam pelo 1 foram citologia, colposcopia e biópsia.

GRÁFICO 2 - Logaritmo das razões de chance para comparação dos grupos de NIC 1 e NIC 2/3 entre as variáveis idade, paridade, atividade sexual, grau da lesão, citologia, colposcopia, biópsia e tabagismo



5.4.1 Análise das variáveis da resposta imune segundo o grau da NIC

Uma vez que os valores das citocinas possuem distribuição não normal, foi utilizado teste não paramétrico para a análise.

Em relação ao grau da lesão, encontrou-se valor mediano de TGF- β de 17 para as mulheres com NIC 1 e valor mediano de 31 para as portadoras de NIC 2/3 no colo uterino, sendo essa diferença significativa ($P < 0,001$). Para as outras variáveis da resposta imune, não foi registrada diferença significativa entre os grupos (TAB. 9).

TABELA 9 - Avaliação da resposta imune em relação ao grau da lesão

Citocinas	N	NIC 1	N	NIC 2/3	Valor P*
		Mediana (A)		Mediana(A)	
IFN- γ **	35	6,0 (0-42)	47	7 (0-43)	0,359
TGF- β ***	37	17 (5-39)	47	31 (13-112)	0,000
IL-4****	33	0,0 (0-11)	45	1,0(0-29)	0,107
IL-12*****	37	0,0 (0-12)	46	1,0(0-11)	0,494

* Teste U-Mann-Whitney.

** excluídos 3 casos de NIC 1 por material inadequado;

*** excluído 1 caso de NIC: 1 por ausência de epitélio na lâmina;

**** excluídos 2 casos de NIC2/3 e 5 casos de NIC 1 por material inadequado

***** excluídos 1 caso de NIC 1 e 1 caso de NIC2/3 por material inadequado;

5.5 Avaliação das citocinas dentro de cada grupo de mulheres infectadas ou não pelo HIV

Ao avaliar somente o grupo não infectado pelo HIV, detectou-se diferença significativa de TGF- β ($P=0,001$), com mais alto valor entre as mulheres com NIC 2/3. Para as demais variáveis da resposta imune, não houve diferença significativa. Esses resultados são mostrados na TAB. 10. No GRÁF. 3 avaliam-se os mesmos dados sumarizados de todas as pacientes, em cuja ordenada foram registrados os valores da contagem de células que foram marcadas. Nas pacientes com IL-4 descreveu-se baixa expressão celular tanto no grupo NIC 1 quanto no grupo de NIC 2/3, com leve predomínio no segundo grupo, porém não significativo.

TABELA 10 - Avaliação da resposta imune segundo o grau de lesão em pacientes negativas para o HIV

Citocinas	NIC 1		NIC 2/3		Valor P*
	n	(n=14) Mediana (A)	n	(n=24) Mediana(A)	
IFN- γ **	13	4,0 (0-42)	24	4,0 (0-32)	0,987
TGF- β	14	14,5 (10-35)	24	32 (13-61)	0,001
IL-4***	14	0,0 (0-11)	23	1,0(0-29)	0,347
IL-12****	14	0,5 (0-12)	23	1,0(0-11)	0,858

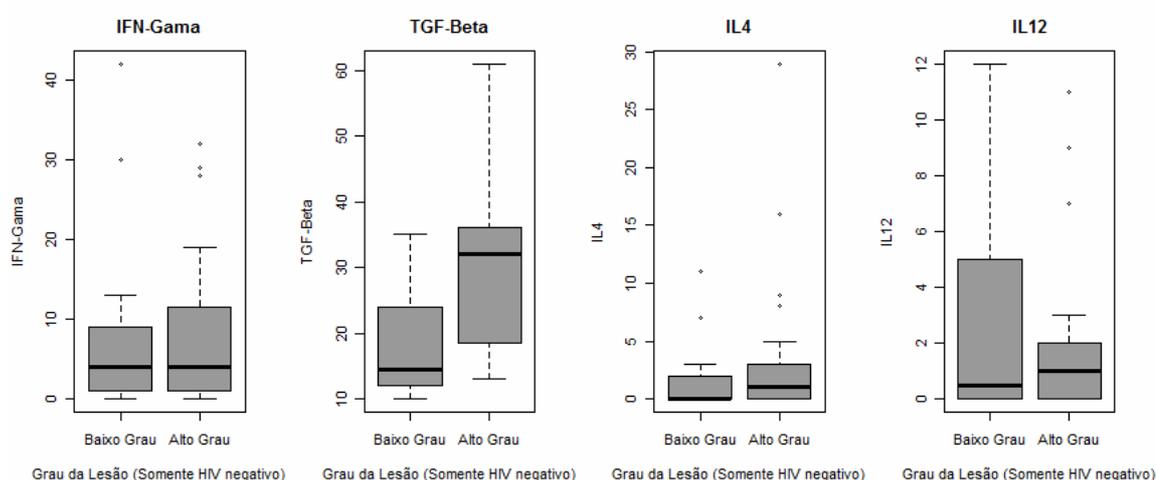
* Teste U-Mann-Whitney.

** excluído 1 casos NIC1 por material inadequado;

*** excluído 1 caso de NIC2/3 por ausência de epitélio na lâmina;

****excluído 1 caso de NIC 2/3 por material inadequado.

GRÁFICO 3 - *Boxplot* para as variáveis respostas entre a variável grau da lesão, considerando-se somente os indivíduos HIV negativo



Já na TAB. 11, considerando somente as mulheres infectadas pelo HIV, a variável TGF- β continua sendo significativa e a variável IL-12, que não apresentava diferença significativa nas pacientes não infectadas pelo HIV, manifestou significância estatística ($p=0,032$) com elevado valor em pacientes com NIC 2/3. Para as demais variáveis não houve diferença significativa. Esses dados são mostrados na TAB. 11 e no GRÁF. 4.

TABELA 11 - Avaliação das citocinas locais quanto ao grau da lesão no grupo de mulheres infectadas pelo HIV

Citocinas	n	NIC 1	n	NIC 2/3	Valor P*
		(n=24)		(n=23)	
		Mediana (A)		Mediana(A)	
IFN- γ **	22	6,0(0-25)	23	9,0 (0-43)	0,203
TGF- β ***	23	18,0 (5-39)	23	31 (14-112)	0,001
IL-4****	19	1,0 (0-9)	22	1,0(0-23)	1,000
IL-12*****	23	0,0 (0-12)	23	2,0(0-11)	0,031

* Teste U-Mann-Whitney.

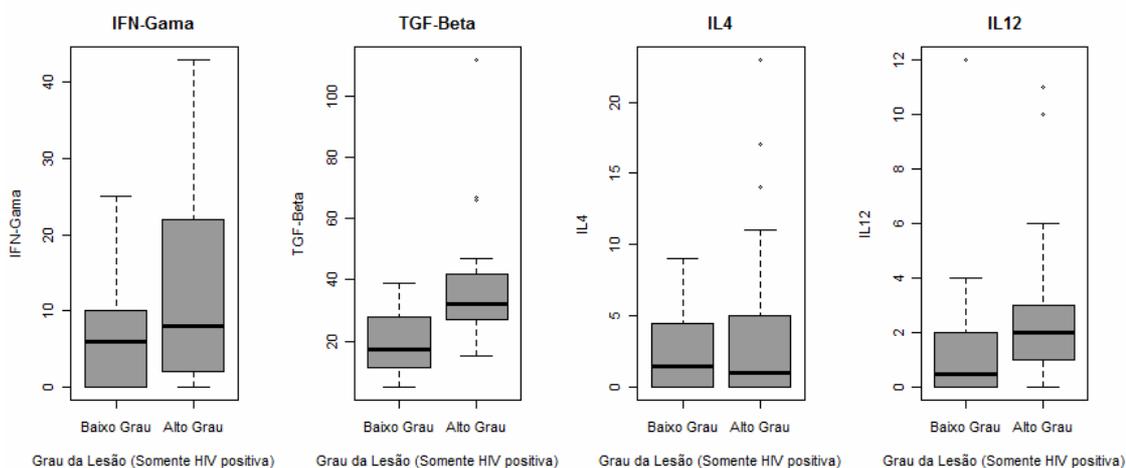
** excluídos 2 casos NIC1 por material inadequado;

*** excluídos 1 caso de NIC 1 por ausência de epitélio na lâmina;

**** excluídos 5 casos de NIC 1 e 1 caso de NIC2/3 por material inadequado;

***** excluído 1 caso de NIC 1 por material inadequado.

GRÁFICO 4 - *Boxplot* para as variáveis respostas entre a variável grau da lesão, considerando somente os indivíduos HIV positivo



5.6 Avaliação das citocinas pelo grau da lesão segundo a presença ou não do HIV

As TAB. 12 e 13 relatam que não houve diferença na contagem dos marcadores da resposta imune entre o grupo de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, tanto nas portadoras de NIC 1 quanto nas portadoras de NIC 2/3.

TABELA 12 - Avaliação das citocinas locais nas mulheres portadoras de NIC 1 segundo o HIV

Citocinas	n	Infectedas pelo		Não infectadas pelo		Valor P*
		HIV (n=23)	n	HIV (n=14)	n	
		Mediana (A)		Mediana (A)		
IFN- γ **	22	6,0 (0-25)	14	4,0 (0-42)		0,90
TGF- β ***	23	18 (5-39)	13	14,5 (10-35)		0,66
IL-4****	19	1 (0-9)	14	0 (0-11)		0,23
IL-12	23	0 (0-12)	14	0,5(0-12)		0,55

* Teste U-Mann-Whitney.

** excluído 1 caso por material inadequado;

*** excluído 1 por ausência de epitélio na lâmina;

****excluídos 4 casos por material inadequado.

TABELA 13 - Avaliação das citocinas locais nas mulheres portadoras de NIC 2/3 segundo o HIV

Citocinas	n	Infecteda pelo		Não infectada pelo		Valor P*
		HIV (n=23)	n	HIV (n=24)	n	
		Mediana (A)		Mediana (A)		
IFN- γ	23	9,0 (0-43)	24	4,0 (0-32)		0,23
TGF- β	23	31 (14-112)	24	32 (13-61)		0,44
IL-4**	22	1,5 (0-23)	23	1 (0-29)		0,62
IL-12***	23	2 (0-11)	23	1(0-11)		0,21

* Teste U-Mann-Whitney.

**excluído 2 casos por ausência de epitélio na lâmina;

***excluído 1 caso por material inadequado.

Pode-se verificar que quando se consideram somente as mulheres não infectadas pelo HIV, os valores medianos de IFN- γ são idênticos, enquanto que no grupo de mulheres infectadas pelo HIV pelo menos 50% daquelas com NIC 1 apresentaram seis de IFN- γ . E entre as que exibiram NIC 2/3, pelo menos 50% apresentaram nove de IFN- γ . Isso significa que no grupo das infectadas pelo HIV as portadoras de NIC 2/3 tiveram valor mediano mais elevado de IFN- γ quando comparadas às portadoras de NIC 1.

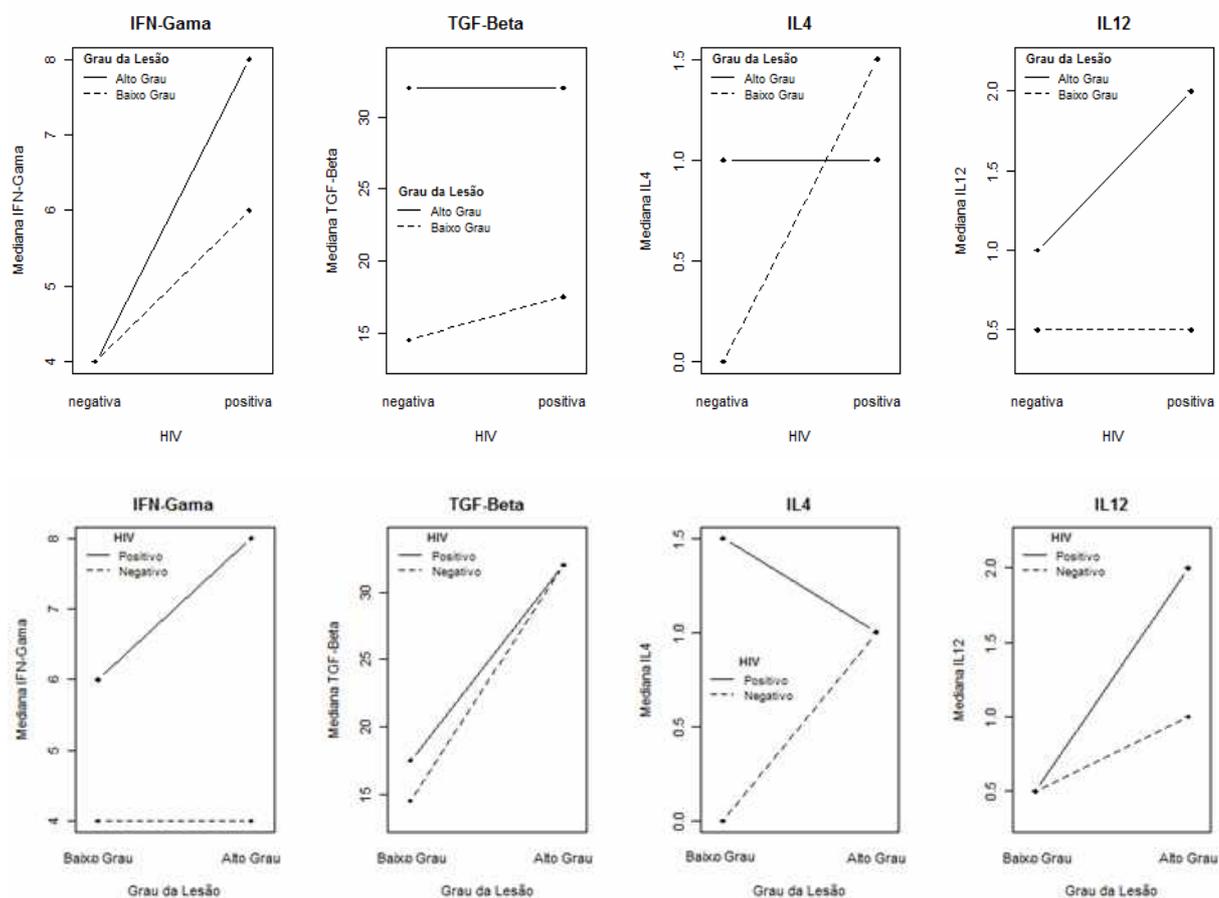
Já a variável TGF- β revelou o mesmo comportamento em ambos os grupos (infectadas e não infectadas pelo HIV), com evidências de diferença do valor mediano entre os grupos formados pela variável grau da lesão.

A variável IL-4 no grupo de mulheres não infectadas pelo HIV exprimiu maior valor mediano no grupo de mulheres com NIC 2/3, enquanto que nas infectadas pelo HIV a mediana foi mais significativa nas mulheres com NIC 1.

A variável IL-12, no grupo de mulheres não infectadas pelo HIV, ressaltou valor mais alto de mediana no grupo de mulheres com NIC 2/3, sendo que a diferença para o grupo de mulheres com NIC 1 foi de 0,5. Nas mulheres infectadas pelo HIV, a mediana continuou sendo mais alta naquelas com NIC 2/3. No entanto, a diferença para o grupo das pacientes com NIC 1 foi de 1,5.

No GRÁF. 5, de interação, as informações são as já mostradas nas TAB. 12 e 13, evidenciando que somente a variável TGF- β não apresentou alguma evidência de interação, uma vez que retas paralelas em gráficos de interação representam a não existência da mesma.

GRÁFICO 5 - Interação entre os fatores HIV e grau da lesão para as variáveis da resposta imune



5.7 Análise multivariada: modelagem estatística

Neste item da análise o objetivo foi modelar a probabilidade de um paciente ser HIV positivo e a probabilidade de apresentar NIC 2/3 a partir das potenciais preditoras selecionadas na análise univariada. O critério de seleção na análise univariada foi P-valor inferior a 0,20. Como foi visualizado que a relação das variáveis IFN- γ , IL-4 e IL-12 com HIV tendeu a mudar na presença do fator grau da lesão, assim como a relação entre IFN- γ , IL-4 e IL-12 com grau da lesão tendeu a mudar na vigência do fator HIV, serão também consideradas essas interações nas regressões múltiplas. Foram retiradas do modelo as variáveis biópsia e colposcopia, devido às mesmas representarem viés de seleção.

Considerando a variável HIV como variável-resposta e as variáveis selecionadas na análise univariada, tem-se o modelo de regressão logística, que é mostrado na TAB. 14.

TABELA 14 - Regressão logística para HIV: modelo completo

Fonte	B	S(β)	Z	P- valor	OR	IC 95%	
Intercepto	0,806	0,616	1,308	0,1908	-	-	-
Grau da lesão – NIC 2/3	-1,469	0,798	-1,841	0,0656	0,230	0,048	1,100
IFN- γ	-0,072	0,055	-1,309	0,1905	0,931	0,835	1,036
IL-4	0,649	0,282	2,302	0,0213	1,914	1,101	3,325
IL-12	-0,690	0,317	-2,180	0,0293	0,501	0,270	0,933
NIC 2/3 x IFN- γ	0,112	0,061	1,830	0,0673	1,119	0,992	1,262
NIC 2/3 x IL-4	-0,651	0,286	-2,275	0,0229	0,521	0,298	0,914
NIC 2/3 x IL-12	0,762	0,335	2,274	0,0229	2,143	1,111	4,135

Aplicando o algoritmo de *backward* e considerando que em uma regressão que possui interações, se a interação é significativa, deve-se manter a variável mesmo se sozinha não apresentar significância, tem-se o seguinte modelo final, que é apresentado na TAB. 15.

TABELA 15 - Regressão logística para HIV: modelo final

Fonte	B	S(β)	Z	P- valor	OR	IC 95%	
Intercepto	0,340	0,466	0,73	0,4657	-	-	-
NIC 2/3	-0,559	0,617	0,91	0,3652	0,572	0,171	1,917
IL-4	0,526	0,263	2,00	0,0456	1,692	1,010	2,834
IL-12	-0,643	0,275	2,34	0,0192	0,526	0,307	0,900
NIC 2/3 x IL-4	-0,521	0,268	1,95	0,0515	0,594	0,351	1,003
NIC 2/3 x IL-12	0,709	0,295	2,40	0,0163	2,032	1,139	3,624

*Hosmer-Lemeshow (P-valor=0,598).

Pelo teste de Hosmer-Lemeshow, não se rejeita a hipótese nula (p -valor=0,598) e pode-se considerar o modelo ajustado adequado para prever o HIV.

Em modelos em que a interação é significativa, a interpretação é baseada nos β s. Em relação às IL-4 e IL-12, a interpretação é referente às pacientes portadoras de NIC 1. A avaliação das mulheres com NIC 2/3 é feita na interação. Sabe-se que a interpretação das interações é feita pela diferença dos valores do β e que a OR é o exponencial do β . Dessa forma, para IL-4, tem-se que: para os pacientes com NIC 1, a chance de um resultado positivo de HIV aumenta em 1,69 vez a cada unidade que se aumenta de IL-4.

Em relação à IL-12, segue a mesma interpretação em relação aos β s:

- Para os pacientes com NIC 1, a chance de um resultado positivo de HIV diminui em 0,526 vez a cada unidade que se aumenta de IL-12.
- Para os pacientes com NIC 2/3, a chance de resultado positivo de HIV aumenta em $(\beta [IL-12] - \beta [\text{grau da lesão} \times IL-12]) = 0,066$ cujo exponencial = 1,06) 1,06 a cada unidade que se aumenta de IL-12. Isso sugere que pacientes com NIC 2/3 e HIV positivo possuem valores mais elevados de IL-12.

Considerando a variável grau da lesão como variável-resposta e as variáveis selecionadas na análise univariada, têm-se regressão logística cujo modelo completo é mostrado na TAB. 16.

TABELA 16 - Regressão logística para grau da lesão: modelo completo

Fonte	B	S(β)	Z	P-valor	OR	IC 95%	
Intercepto	-3,875	1,329	-2,915	0,004	-	-	-
HIV-positivo	-1,708	1,174	-1,455	0,146	0,181	0,018	1,809
Citologia - alterada	0,846	0,758	1,116	0,264	2,329	0,528	10,284
TGF- β	0,208	0,060	3,468	0,001	1,231	1,095	1,385
IFN- γ	-0,076	0,052	-1,455	0,146	0,927	0,838	1,027
IL-4	0,103	0,111	0,935	0,350	1,109	0,893	1,378
IL-12	-0,223	0,160	-1,392	0,164	0,800	0,584	1,095
HIV-positivo/ IFN- γ	0,094	0,071	1,333	0,183	1,099	0,957	1,261
HIV-positivo/ IL-4	-0,355	0,170	-2,088	0,037	0,701	0,502	0,978
HIV-positivo/ IL-12	0,373	0,343	1,087	0,277	1,452	0,741	2,844

Aplicando o algoritmo de *backward* e considerando que em uma regressão que possui interações, se a interação é significativa, deve-se manter a variável mesmo quando ela não apresente significância, tem-se o seguinte modelo final, que é mostrado na TAB. 17.

TABELA 17 - Regressão logística para grau da lesão: modelo final

Variáveis	β	S(β)	Z	P-valor	OR	IC (95%)	
Intercepto	-2,807	0,743	-3,779	0,000	-	-	-
TGF- β	0,119	0,029	4,096	0,000	1,126	1,064	1,192

*Hosmer-Lemeshow (P-valor=0,235).

Pelo teste de Hosmer-Lemeshow, não se rejeita a hipótese nula (P-valor=0,235) e pode-se considerar o modelo ajustado adequado para predizer o grau da lesão.

Concluiu-se que a cada unidade que se aumenta de TGF- β , a chance de apresentar NIC 2/3 aumenta em aproximadamente 1,13 vez.

6 DISCUSSÃO

Para facilitar a discussão, dividiu-se o capítulo em tópicos, iniciando-se pela análise descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. Em seguida, faz-se a avaliação descritiva dos grupos referentes ao grau de lesão. Por fim, procede-se à discussão em relação à resposta imune nesses grupos.

6.1 Análise dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV

Considerando a idade, encontrou-se mediana no grupo de mulheres portadoras de NIC e infectadas pelo HIV de 33 e 35 anos em portadoras de NIC e não infectadas pelo HIV, respectivamente. Esses dados estão de acordo com a literatura, que mostra idade mediana de mulheres portadoras de NIC variando de 32 a 38 anos (ANDRADE *et al.*, 2011; BAIS *et al.*, 2007; CLEIRICE *et al.*, 1997; GILLES *et al.*, 2005; JACOBS *et al.*, 1998; NICOL *et al.*, 2008; PAULO *et al.*, 2007; ROTAR *et al.*, 2010; VAN POELGEEEST *et al.*, 2006).

Os grupos foram homogêneos quanto à idade, paridade e idade de início de atividade sexual. Os nossos achados estão de acordo com o encontrado por Andrade *et al.* (2011), que mostraram idade mediana de 34 anos, idade mediana de início de atividade sexual aos 17 anos e paridade mediana de dois filhos no grupo de mulheres infectadas pelo HIV. Gilles *et al.* (2005) reportaram paridade de dois nas pacientes infectadas pelo HIV com NIC, em concordância com o presente estudo.

Foram encontrados 61,7% das mulheres infectadas pelo HIV com citologia alterada e 76,3% nas mulheres não infectadas, o que demonstra alto índice de citologias com resultado falso-negativo, uma vez que todas as pacientes que participaram deste estudo apresentavam algum grau de NIC. Segundo Nanda *et al.* (2000), a citologia cervical possui sensibilidade moderada (55-65%) para a detecção de NIC confirmada pela histopatologia. Esses autores avaliaram 12

estudos e informaram sensibilidade que variou de 30 a 87% e especificidade de 86 a 100% (NANDA *et al.*, 2000).

Observaram-se também mais mulheres infectadas pelo HIV com NIC 1 à biópsia que mulheres não infectadas. Na época em que foram coletadas as amostras, fazia parte do protocolo realizar CAF em lesão de baixo grau nas mulheres infectadas pelo HIV. Entretanto, detectou-se agravamento das lesões após a CAF nas mulheres infectadas pelo HIV. Foram encontrados 21,3% das biópsias com lesão de alto grau à biópsia; e após a CAF, apurou-se pouco mais que o dobro (46,8%). Isto demonstra que a biópsia dirigida pela colposcopia não melhora a acurácia diagnóstica nas mulheres infectadas pelo HIV, quando comparadas às não infectadas (DEL PRIORI *et al.*, 1996; NAPPI *et al.*, 2005). O mesmo não foi demonstrado nas pacientes não infectadas pelo HIV.

Ao avaliar a imunidade sistêmica das mulheres infectadas pelo HIV, constatou-se valor médio de células positivas para linfócito T CD4 de 292,87 células/mm³, o que demonstra imunidade relativamente boa do grupo. Kobayashi *et al.* (2004) encontraram valor médio de linfócito T CD4 de 381 células/mm³. Em outro estudo que também avaliou a resposta imune local em pacientes coinfetadas pelo HIV/HPV, realizado no Rio de Janeiro por Nicol *et al.* (2008), o valor médio de CD4 foi de 444,27 células/mm³, com 21% das pacientes com CD4 inferior a 200 células/mm³, em concordância com o achado em nosso grupo de mulheres.

Apenas uma das mulheres infectadas pelo HIV não estava em uso de terapia antirretroviral. Na literatura não há consenso sobre a influência da terapia antirretroviral na história natural das neoplasias intraepiteliais cervicais. Entretanto, não se avaliou o uso da HAART na resposta imune local. Para realizar tal comparação, seria necessário ter um grupo de mulheres infectadas pelo HIV sem usar o medicamento. Além disso, também seria importante o controle da adesão ao tratamento. A maior parte da literatura publicada sugere que a HAART não reduz a incidência de lesões cervicais nas mulheres infectadas pelo HIV (BRATCHER; SAHASRABUDDHE, 2010). Alguns autores salientam que a incidência do câncer cervical entre as mulheres infectadas pelo HIV não diminuiu após a introdução da HAART (ENGELS *et al.*, 2006; FRANCESCHI *et al.*, 2003).

Entretanto, o estudo *HIV Epidemiology Research Study* (HERS) notifica aumento do clareamento do HPV em mulheres com diagnóstico citológico de lesão intraepitelial após a introdução da HAART (PARAMSOTHY *et al.*, 2009).

6.2 Análise descritiva dos grupos quanto ao grau de lesão

A idade mediana total do grupo foi de 34 anos, sendo que entre as portadoras de lesão de baixo grau foi de 32,7 anos e entre as portadoras de lesão de alto grau foi de 35 anos. Essas medianas estão de acordo com a literatura, que evidencia idade mediana entre as portadoras de lesão de baixo grau de 32 anos e entre aquelas com lesão de alto grau de 34 anos (BERMUDEZ-MORALES, *et al.*, 2008; GILLES *et al.*, 2005).

Em relação à paridade não se encontrou diferença entre os grupos, embora alguns autores tenham enfatizado que o risco de ocorrência de neoplasia intraepitelial de alto grau cresce significativamente com o aumento da paridade (HILDESHEIM *et al.*, 2001). Sabe-se que o tabagismo também é um importante fator de risco para o desenvolvimento de NIC, o que foi demonstrado no estudo de Hidesheim *et al* (2001). Estudos epidemiológicos também ressaltaram essa associação (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006). Na presente investigação, a maioria das mulheres era não tabagista em ambos os grupos, não havendo diferença entre baixo e alto grau de lesão.

As pacientes que possuíam citologia alterada tinham mais chance de ter lesão de alto grau quando comparadas às com citologia normal. Neste estudo, a citologia alterada era a que demonstrava tanto lesão de baixo quanto de alto grau, assim como alterações sugestivas de HPV. Os casos de ASCUS foram excluídos da análise. Murta *et al.* (1997) acentuaram que as pacientes com sinais citológicos de HPV tinham mais chance de desenvolver NIC 3 e posterior carcinoma invasivo.

Foi registrado mais alto número de lesão de alto grau em mulheres com colposcopia grau 2. Porém, 37% das mulheres com colposcopia grau 1

apresentaram lesão de alto grau na peça cirúrgica e 41% das com colposcopia grau II, em verdade, tinham lesão de baixo grau no cone. A colposcopia é um exame subjetivo e com reprodutibilidade e acurácia de difícil avaliação. A confiança e a acurácia da colposcopia na determinação do melhor local para a realização da biópsia têm sido questionadas no diagnóstico das NICs. Autores avaliaram a associação entre colposcopia e histopatologia obtida por biópsia dirigida com a colposcopia e concluíram que a associação era significativa ($p < 0,001$), mas a concordância era fraca ($K=0,2$) (MASSAD; COLLINS, 2003). Katz *et al.* (2010) sugerem que o valor da colposcopia está no direcionamento do melhor local para a biópsia, e não para melhorar o diagnóstico das lesões intraepiteliais cervicais.

Em relação ao *status* do HIV não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de alto e baixo grau de lesão. Na literatura verificou-se que mulheres infectadas pelo HIV têm mais chance de desenvolver NIC (CONLEY *et al.*, 2002; ELLERBROCK *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 1994b). Nosso estudo foi realizado de forma transversal, separando casos com NIC tanto de mulheres infectadas quanto não infectadas pelo HIV, não sendo possível avaliar prevalência. Ao analisar a variável HIV em relação ao grau de lesão, foi percebido menos número de mulheres infectadas pelo HIV com lesão de alto grau que de mulheres não infectadas, porém essa diferença não foi significativa. O fato de se ter mais número de mulheres infectadas pelo HIV com lesão de baixo grau é justificado pelo protocolo de tratamento que era adotado na ocasião em que foram avaliadas. O protocolo nessa época estipulava tratamento cirúrgico em mulheres infectadas pelo HIV e NIC, de baixo ou alto grau.

6.3 O método de imuno-histoquímica

A escolha do método de imuno-histoquímica para realizar este estudo foi devido ao fato de o material ser proveniente de peças parafinadas que já estavam estocadas há algum tempo. Esse método pode ser utilizado para diagnosticar várias doenças. A imuno-histoquímica é um método “artesanal” que pode ser influenciado por vários fatores, desde a fase preparo do material, ou seja, fixação

e processamento dos tecidos, passando pela fase do exame propriamente dito (escolha de anticorpos primários, período de incubação, bloqueios e sistema de visualização), até a interpretação dos resultados. O método pode sofrer interferência em qualquer uma das etapas, o que pode comprometer a qualidade dos resultados. Especial atenção foi necessária à ativação antigênica, por ser o material proveniente de peças antigas. Para resolver esse problema, foi feita a padronização dos anticorpos testando-se tampões diferentes para a reativação. Assim como neste trabalho, outros também utilizaram a técnica de imunohistoquímica na avaliação da resposta imune local do colo uterino (AL-SALEH *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2004; PARDO-GOVEA, *et al.* 2005).

6.4 Análise dos grupos em relação à resposta imune local e o grau de lesão na presença ou não do HIV

A resposta imune relacionada às NICs, ao HPV e ao HIV não está completamente compreendida. A literatura é bastante variada no que diz respeito ao perfil de citocinas presentes nas lesões. Essa variação é devida principalmente à técnica utilizada - *Reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR), imunohistoquímica -, tipo de amostra avaliada (biópsia, peça cirúrgica, secreções cervicais) e tipo de lesão presente (progressiva, regressiva ou persistente). De maneira geral, é descrito que lesões de alto grau apresentam expressões elevadas de IL-2R, IL-4, TGF- β e IL-10 e níveis diminuídos de IL-2 e IFN- γ refletindo ambiente imunorregulatório (KOBAYASHI *et al.*, 2008). Estudos de imunohistoquímica para avaliar a expressão de células Th1 e Th2 mostram que essas células estão presentes no estroma (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

A avaliação do sangue periférico pode não representar o microambiente local, ou seja, logo abaixo da lesão. Kobayashi *et al.* (2008) avaliaram amostras de sangue periférico e de cérvix uterina das mesmas pacientes e realçaram proporções maiores de células T que expressam IFN- γ e TGF- β no tecido cervical quando comparado com o sangue periférico, tanto em amostras sem NIC quanto em amostras com NIC de alto grau. Isso denota que a medida da resposta imune local é de suma importância na avaliação das NICs e que talvez não seja correto

estender os achados de estudos sistêmicos para prever a evolução das lesões. Para melhor compreensão da discussão, ela foi subdividida em tópicos.

6.4.1 TGF- β

Em relação ao grau de lesão, foi significativa a diferença de TGF- β no grupo de mulheres portadoras de lesão de alto grau. Ao analisar essa citocina em cada grupo, ou seja, no grupo de mulheres infectadas pelo HIV e no grupo de mulheres não infectadas, a diferença manteve-se, sendo que no grupo de mulheres infectadas pelo HIV também houve diferença significativa de IL-12 nas portadoras de lesão de alto grau.

A citocina TGF- β pertence a uma família multifuncional de fatores do crescimento que regulam funções celulares básicas tais como apoptose, proliferação, diferenciação e imunossupressão (SHI; MASSAQUÉ, 2003), sendo a sua função bloqueada pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV (MURVAI *et al.*, 2004; PEI *et al.*, 1998; SHERMAN; SCHLEGEL, 1996). Uma particular característica biológica associada à progressão tumoral é a perda da responsividade ao TGF- β (KANG *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1998); e o HPV de alto risco pode levar à alteração de sua função (HAZELBAG *et al.*, 2001).

Na carcinogênese cervical, o TGF- β 1 pode ter dois papéis contrastantes. Essa IL pode contribuir para a imunossupressão a partir da inibição da sinalização da IL-2 e de IL-12 (Th1) pelas células apresentadoras de antígenos e estimular a produção de IL-10 (Th2) por macrófagos (PARDOUX *et al.*, 1997). Alconcer-González *et al.* (2006) demonstraram predomínio de TGF- β e de IL-10 com diminuição acentuada de IL-2 e IL-12 em amostras de câncer cervical, criando ambiente permissivo para o desenvolvimento tumoral. Por outro lado, em estudos *in vitro* foi evidenciado papel protetor a partir da inibição da proliferação de queratinócitos e da supressão das proteínas E6 e E7 do HPV, que são essenciais na carcinogênese (COFFEY *et al.*, 1988).

Woodworth, Notário e Dipaolo (1990) sugeriram que TGF- β pode ser um regulador autócrino da expressão gênica do HPV nas células epiteliais infectadas. Entretanto, outros estudos mostraram que o TGF- β parece estimular em vez de inibir o crescimento celular, sendo que esse tipo de crescimento é demonstrado apenas em células infectadas pelo HPV e não em células normais (WOODWORTH *et al.*, 1996).

O resultado encontrado neste estudo está de acordo com os achados de Kobayashi *et al.* (2004). Esses autores documentaram aumento da densidade estromal de TGF- β em infiltrados adjacentes à NIC 2/3, principalmente em pacientes não infectadas pelo HIV, quando comparado com colo normal. Embora com menos intensidade, TGF- β também foi referido em pacientes infectadas pelo HIV (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Baritaki *et al.* (2007) também encontraram, em pacientes imunocompetentes, expressão aumentada de TGF- β associada à progressão de NIC de baixo grau para NIC de alto grau, em concordância com o presente estudo. Esses dados podem sugerir que as células T regulatórias são recrutadas em lesões de NIC 2/3, levando a um ambiente permissivo.

Adurthi *et al.* (2008) avaliaram a imunidade no colo uterino de pacientes com NIC, câncer e sem lesão e encontraram células T regulatórias presentes no estroma nas amostras de NIC. Concluíram que a presença desse padrão de células pode ser um marcador para a persistência da lesão. As amostras e método utilizados para avaliar as citocinas locais em nosso estudo permitiram avaliar o microambiente abaixo da lesão sem, entretanto, identificar qual célula a produziu. Seria necessário investigar também outros marcadores como CD25 e *Forkhead box P3* (FOXP3) para melhor estudo das células T regulatórias. Embora não se tenha avaliado CD25 e FoxP3, os valores expressivos de TGF- β à medida que a lesão se agrava são indicativos de maior proporção de células T regulatórias (Treg).

Ao comparar apenas pelo *status* do HIV, ou seja, entre mulheres infectadas ou não pelo HIV não se levando em consideração o grau de lesão, não houve diferença na expressão dessa citocina. Conforme se pode constatar pelos gráficos de interação, parece não haver associação entre essa interleucina e o

HIV, demonstrando que provavelmente o que interfere em sua expressão é a presença da lesão e, conseqüentemente, do HPV (não analisado neste estudo).

6.4.2 IL-12

Ao avaliar os grupos quanto ao *status* do HIV, sem levar em consideração o grau da lesão, não se identificou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, ao estudar os gráficos de interação, parece haver associação da IL-12 com HIV e, talvez, do HPV, devido ao grau da lesão. Isso é demonstrado na análise multivariada, na qual se pode observar associação entre alto grau de lesão, IL-12 e infecção pelo HIV ($P=0,016$).

Nosso achado está de acordo com o de Moscicki *et al.* (2004), que também comprovaram aumento de IL-12 em pacientes HIV positivo que desenvolveram lesão de alto grau (MOSCICKI *et al.*, 2004). Crowley-Nowick *et al.* (2000) também relataram que a coinfeção HIV/HPV está associada a altos níveis de células produtoras de IL-12, especialmente em mulheres com uma terceira doença sexualmente transmissível, quando comparadas com as infectadas apenas pelo HIV ou pelo HPV, o que também demonstra interação.

Estudo realizado por Guha e Chatterjee (2009) avaliou a presença de citocinas em secreção cervical e identificou diferença marginalmente significativa na produção de IL-12 entre mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV ($P=0,053$), com mais altos valores nas infectadas. Os autores destacaram predomínio de IL-6 e IL-10 nas amostras de mulheres infectadas pelo HIV, significando predomínio da resposta Th2. Ao avaliarem as amostras pela presença do HPV, encontraram aumento de IL-1 β ($P=0,022$) e IL-6 ($P=0,0004$), com diferença não significativa de IL-12 nas amostras HPV + ($P=0,493$). Entretanto, não analisaram em relação ao grau da lesão. Bais *et al.* (2005) não obtiveram diferença de IL-12 aferido no plasma entre colo normal, lesão de alto grau e câncer em mulheres não infectadas pelo HIV. Em relação ao grau de lesão, também não houve diferença na expressão de IL-12 entre as mulheres com NIC de baixo e alto grau e não infectadas pelo HIV na presente pesquisa.

A IL-12 é expressa em células apresentadoras de antígenos, macrófagos e leva à diferenciação de células TCD4+ *naive* em direção ao perfil Th1 (BRUNDA, 1994; HSIEH *et al.*, 1993; SCOTT, 1993). Essa interleucina também é conhecida por inibir a angiogênese (VOEST *et al.*, 1995). Segundo esses autores, a supressão da angiogênese pela IL-12 é dependente de sua habilidade em induzir a expressão de IFN- γ , o que em nosso estudo pode ser observado a partir da maior expressão, embora não significativa, dessa citocina no grupo de mulheres infectadas pelo HIV e com lesão de alto grau. Algumas pesquisas em modelos murinos mostraram que a IL-12 possui potente função antitumoral e antimetastática (BRUNDA *et al.*, 1993; NASTALA *et al.*, 1994; TAHARA *et al.*, 1994). Por essas propriedades, não seria esperado encontrar essa IL aumentada em lesões de alto grau. Uma explicação para tal achado seria que níveis aumentados da IL-12 refletiriam um mecanismo para inibir a angiogênese e combater a proliferação epitelial, bem como uma tentativa para repolarização para uma resposta Th1 impedindo a progressão para o câncer.

Entretanto, segundo Meyaard *et al.* (1996), a IL-12 também pode contribuir para a imunorregulação pela indução da IL-10 (não avaliada no presente estudo).

O fato de não se ter encontrado essa diferença no grupo de mulheres não infectadas pelo HIV e portadoras de lesão de alto grau pode refletir uma resposta à interação HIV/HPV.

6.4.3 IL-4

O perfil Th2 foi avaliado neste estudo com base em pesquisa e quantificação da IL-4 no estroma, logo abaixo da lesão. Esse perfil suprime a resposta imune celular e estimula preferencialmente uma resposta humoral (ZHU; PAUL, 2008). Em nossa pesquisa não foi evidenciada diferença significativa de IL-4 em relação ao *status* do HIV. Entretanto, na análise multivariada apurou-se associação entre mulheres infectadas pelo HIV e portadoras de lesão de baixo grau com a expressão de IL-4 (P=0,0456). Para as mulheres portadoras de HIV com lesão de

alto grau essa associação não foi significativa ($P=0,053$). Isso mostra que essas mulheres possuem tendência a desenvolver padrão Th2.

No grupo de mulheres não infectadas pelo HIV não houve associação da expressão de IL-4 com o grau da lesão. Pardo-Govea *et al.* (2005) também avaliaram a expressão de IL-4 no tecido cervical, em pacientes imunocompetentes, pela técnica de imuno-histoquímica e também não detectaram diferença significativa entre as NICs. Bais *et al.* (2005) investigaram a expressão de IL-4 no sangue periférico e não citaram diferença entre colo normal, NIC de alto grau e câncer. Esses autores concluíram pela polarização da resposta em direção ao perfil Th2 devido a níveis expressivamente mais altos de IL-10 em lesões de alto grau e câncer (não avaliado no presente estudo). Jacobs *et al.* (1998) também não relataram diferença na expressão de IL-4 no sangue de mulheres imunocompetentes com diversos graus de NIC, porém também concluíram haver polarização para Th2 pela proporção de IL-12/IL-10 encontrada (não avaliado nesta pesquisa).

Em contrapartida, outros autores descreveram aumento da expressão dessa IL em pacientes com lesão de alto grau, denotando predomínio da resposta Th2 à medida que ocorre agravamento da lesão. Baixas porcentagens de células Th1 com altas proporções de IL-4 e IL-6 (Th2) foram observadas em lesões de alto grau na comparação com tecido normal (AL-SALEH *et al.*, 1998). Estudo anterior realizado por Cleirice *et al.* (1997) avaliou o perfil de citocinas no sangue periférico de pacientes não infectadas pelo HIV e salientaram predominância de IL-4, acentuando mudança para o perfil Th2 em pacientes portadoras de NIC 3.

Behbahani *et al.* (2007) estudaram a resposta imune em relação ao HPV e informaram maior expressão de IL-4 em amostras cervicais de mulheres HIV-/HPV+ do que em amostras de mulheres HIV+/HPV+.

6.4.4 IFN- γ

O perfil Th-1 foi pesquisado em nosso estudo a partir da contagem de células que expressam IFN- γ . Esse perfil estimula preferencialmente a resposta celular mediada. Song *et al.* (2008) reconheceram associação de elevada quantificação dessa interleucina em pacientes que clarearam a infecção pelo HPV. Scott *et al.* (1999) também exprimiram predomínio de IFN- γ em células esfoliadas da cérvix, pela técnica de RT-PCR, nas pacientes que clarearam o HPV. El-Sherif *et al.* (2001) avaliaram o tecido cervical de mulheres portadoras de NIC e encontraram diminuição dessa interleucina no estroma em amostras de NIC de alto grau quando comparadas com NIC de baixo grau. Esses estudos notificam a importância da resposta Th1 em relação à resolução da infecção e que a falha em relação a esse tipo de resposta pode estar relacionada à progressão da doença.

Jacobs *et al.* (1998) compararam os níveis séricos de IFN- γ de mulheres com lesão de baixo e alto grau e não indicaram diferença entre os grupos. Concluíram pelo predomínio de resposta Th2 baseados na alteração da proporção de IL-12/IL-10 encontrada nas lesões de alto grau. Azar *et al.* (2004) acusaram mais casos positivos de IFN- γ (sérico) no grupo com HSIL que no grupo LSIL, porém foi no limiar da significância ($P=0,055$). Na análise multivariada não se confirmou associação dessa citocina com NIC, em concordância com nosso resultado em relação às mulheres não infectadas pelo HIV. Entretanto, esses estudos foram realizados em pacientes imunocompetentes e não se pode estender os mesmos resultados para as mulheres infectadas pelo HIV, o que evidencia a necessidade do entendimento da resposta local nessas mulheres.

Seria esperado encontrar baixa expressão desse marcador nas mulheres infectadas pelo HIV. Entretanto, em nosso estudo não houve diferença significativa tanto nos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV quanto nos diferentes graus de lesão. Embora aqui não se tenha avaliado o HPV, o achado é semelhante ao encontrado por Behbahani *et al.* (2007), que também não informou diferença significativa de células que expressam IFN- γ em tecidos de pacientes HIV negativo portadoras de HPV quando comparados com o tecido de pacientes coinfectadas pelo HIV/HPV.

Kobayashi *et al.* (2004), utilizando a técnica de imuno-histoquímica, assinalaram células positivas para IFN- γ abundantemente distribuídas no estroma próximo do epitélio displásico de mulheres não infectadas pelo HIV. Esses autores também referenciaram que em amostras de NIC2/3 de mulheres infectadas pelo HIV essas células estavam marcadamente diminuídas ($p=0,0004$). Embora tenha encontrado alto número de células T nas amostras de mulheres portadoras de HIV e lesão de alto grau (NIC2/3), para esses autores a produção de IFN- γ por essas células foi significativamente comprometida. Eles reportaram a existência de robusta resposta Th1 nas lesões de NIC2/3, provavelmente como resposta para conter ou erradicar a infecção pelo HPV. Também notaram níveis expressivos de TGF- β em NIC2/3 de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. Nicol *et al.* (2005) encontraram em pacientes coinfectedas pelo HIV/HPV diminuição de IL-6, IFN- γ e TNF- α e aumento de IL-4 e IL-10 e definiram que a resposta dessas pacientes é do tipo Th2.

Avaliando material de mulheres não infectadas pelo HIV, Kobayashi *et al.* (2008) verificaram aumento de IFN- γ nas portadoras de lesão de alto grau. Pardo-Govea *et al.* (2005) também descobriram expressão maior de IFN- γ em lesões de alto grau e concluíram ser a resposta Th1 predominante na presença do HPV.

Como se pode observar, os resultados na literatura são conflitantes e não existe consenso a respeito da resposta imune local. A divergência em relação às publicações provavelmente também está associada às diferentes técnicas, metodologias e materiais utilizados nas pesquisas. Os métodos usados para mensurar as citocinas, assim como diferentes tipos de amostras empregadas (lavado cérvico-vaginal, tecido cervical, plasma, soro ou cultura de sangue total), podem influenciar nos resultados. Além disso, a maioria dos estudos que mostram mudança do perfil Th1 em direção ao perfil Th2 é focada no carcinoma cervical e não em NIC e alguns são voltados para o HPV e não para a lesão que ele causa. Em relação à coinfeção HIV/HPV, as dificuldades são ainda maiores, pois o número de artigos encontrados é reduzido.

O QUADRO 2 resume os principais estudos e suas respectivas conclusões.

QUADRO 2 – Conclusões dos principais estudos sobre resposta imune local

Autor (ano) (n)	Método utilizado na pesquisa	Conclusão	Este estudo
Jacobs <i>et al.</i> (1998) n=27	ELISA (Sangue) Estudo transversal HIV-	Sem ≠ nos níveis de IL-4 e IFN- γ entre HSIL e LSIL.	Sem ≠ nos níveis de IL-4 e IFN- γ entre HSIL e LSIL em pacientes HIV-
Al-Saleh <i>et al.</i> (1998) n=60	Imuno-histoquímica (Tecido cervical) Estudo transversal HIV-	↓ de células Th1 e ↑ de IL-4 e IL-6 (Th2) no estroma em pacientes com HSIL.	Sem ≠ na expressão de Th1 (IFN- γ , IL-12) e de Th2 (IL-4) em LSIL e HSIL em pacientes HIV-
Crowley-Nowick <i>et al.</i> (2000). n=122	ELISA (Secreção cervical) Estudo transversal HIV- e HIV+	↑ de IL-12 em pacientes co-infectadas HIV/HPV, principalmente quando associado a uma terceira doença.	↑ IL-12 nas mulheres HIV+ com HSIL.
Kobayashi <i>et al.</i> (2004) n=68	Imuno-histoquímica (tecido cervical) Estudo transversal	a) ↓ de IFN- γ no estroma cervical de pacientes HSIL HIV+ que em HSIL HIV-. b) ↑ de TGF- β em HSIL que em colo normal tanto no grupo HIV+ quanto no grupo HIV-	a) Sem ≠ diferença em relação ao grau da lesão e <i>status</i> do HIV. b) ↑ de TGF- β em HSIL em relação a LSIL tanto no grupo HIV+ quanto no grupo HIV -. c) não temos grupo sem NIC para comparar.
Moscicki <i>et al.</i> (2004) n=256	ELISA (Secreção cervical [IL-12, IL-10 e IL-2] e sangue [IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-6 e TNF- α]) Coorte	↑ de IL-12 em mulheres infectadas pelo HIV e que desenvolveram HSIL. Sem ≠ diferença para as demais citocinas.	↑ IL-12 nas mulheres HIV+ com HSIL.
Bais <i>et al.</i> (2005) n=33	Imunoensaios (Plasma) Estudo transversal HIV-	a) ↓ IFN- γ , TNF- α e IL-2 e ↑ de IL-10 em NIC 3 e carcinoma. b) sem ≠ em relação à IL-4 e IL-12. c) não avaliou HIV +	a) não se avaliaram TNF- α , IL-2 e IL-10. Não avaliadas amostras de carcinoma. Sem ≠ em relação ao IFN- γ . b) Sem ≠ entre IL-12 e IL-4 nas amostras HIV -. c) ↑ marginalmente significante de IL-4 nas amostras de LSIL de mulheres infectadas pelo HIV. ↑ de IL-12 nas mulheres HIV + com HSIL. Sem diferença em relação ao e INF- γ .

continua

Autor (ano) (n)	Método utilizado na pesquisa	Conclusão	Este estudo
Pardo-Govea <i>et al.</i> (2005) n=39	Imuno-histoquímica (biópsia cervical) Estudo transversal HIV -	a)↑ IFN- γ em amostras de NIC 3 do que em amostras de NIC 1. b)sem \neq na expressão de IL-4 entre os diferentes graus de NIC. c)não avaliaram o HIV.	a) sem \neq na expressão de IFN- γ entre os diferentes graus de NIC. b) sem \neq na expressão de IL-4 entre as pacientes HIV- com baixo e alto grau de lesão. c)↑ marginalmente significativa de IL-4 nas amostras de lesão de baixo grau de mulheres infectadas pelo HIV.
Behbahani <i>et al.</i> (2007) n=17	Imuno-histoquímica (tecido cervical) Estudo transversal HIV+ e HIV-	a)↑ IL-2 e IFN- γ em pacientes HIV+HPV+ quando comparado HIV-/HPV-. b) sem \neq entre os grupos HIV+HPV+ e HIV-HPV+ em relação a IL-2 e IFN- γ . c)↑ de IL-4 em mulheres HIV-/HPV+ do que em mulheres HIV+/HPV+.	a)Não avaliado o HPV. b)Sem \neq na expressão de IFN- γ entre os grupos com NIC, infectado e não infectado pelo HIV. c)↑ marginalmente significativa de IL-4 no grupo HIV+ com lesão de baixo grau.
Song <i>et al.</i> (2008) n=57	RT-PCR (tecido cervical) Coorte HIV -	↑ de IFN- γ em pacientes portadoras de LSIL que apresentaram remissão com 1 ano.	Não avaliada remissão.
Guha e Chatterjee (2009) n=100	ELISA (Secreção cervical) Transversal HIV+ HIV-	a)Predomínio de Th2 em HIV +. b)↑ marginalmente significativa de IL-12 nas pacientes HIV +(P=0,053) c) ↑ IL-1 β e IL-6 nas amostras HPV +. d)não avaliaram o grau de lesão.	a)↑ IL-12 nas mulheres HIV+ com lesão de alto grau. b) ↑ de IL-4 nas mulheres HIV+ com LSIL (marginalmente significativa) c) não avaliado o HPV.

HSIL= lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LSIL= lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

6.5 Considerações finais

A produção de citocinas imunossupressivas, tais como TGF- β , pode criar um estado permissivo que deve ser considerado na perspectiva do tratamento de lesões pré-neoplásicas. Nas pacientes infectadas pelo HIV e portadoras de NIC de alto grau, encontrou-se significativo aumento também de IL-12. Essa

associação não foi vista no grupo de mulheres não infectadas, o que sugere interação viral.

Seria esperado encontrar-se padrão de resposta tipo Th2 no grupo de mulheres infectadas. Foi avaliado o padrão Th2 pela expressão de IL-4. Na análise multivariada houve associação de IL-4 para NIC de baixo grau nas mulheres infectadas pelo HIV. O mesmo não foi demonstrado nas mulheres infectadas pelo HIV e com NIC de alto grau. No entanto, a resposta imune é um complexo evento que envolve vários mecanismos e neste estudo foi investigado apenas reduzido “fragmento” dessa resposta. Dessa forma, poderia ter sido obtida resposta diferente se tivessem sido incluídos outros marcadores da resposta imune, tais como IL-10 e IL-6, assim como receptores de membrana.

A interação demonstrada entre as pacientes infectadas pelo HIV e portadoras de NIC de alto grau mostra que provavelmente o HPV apresenta importante papel na modulação da resposta. Seria importante avaliar-se o HPV nessas amostras e correlacioná-lo com a resposta. Neste estudo o HPV não foi avaliado porque não se tinha o resultado da tipagem do vírus para todas as pacientes.

Outra lacuna nesta pesquisa foi o fato de não se possuir um grupo não infectado e sem lesão para comparar com os demais. Ainda permanecem muitas perguntas a serem respondidas e mais estudos são necessários para avaliar a resposta imune no colo uterino de mulheres imunocomprometidas.

7 CONCLUSÕES

- Não foi encontrada diferença na resposta imune local entre as mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, não considerando o grau da NIC.
- Em relação ao grau da NIC, observou-se predomínio de TGF- β nas portadoras de NIC 2/3, sugerindo resposta Treg.
- A resposta imune local em mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV apresentou comportamento diferente na presença de NIC, com predomínio de IL-12 nas mulheres infectadas pelo HIV e NIC 2/3. Nas pacientes HIV positivo e NIC 1 houve predomínio de IL-4, indicando resposta Th2. Em relação ao TGF- β , verificou-se expressão similar nos grupos, não havendo indício de interação dessa citocina.

REFERÊNCIAS

ADURTHI, S. *et al.* Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: Cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, p. 55-65, 2008.

ALCONCER-GONZALES, J.M. *et al.* In vivo expression of immunosuppressive cytokines in Human Papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunology**, v. 19, suppl. 3, p. 481-491, 2006.

AL-SALEH, W. *et al.* Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. **The Journal of Pathology**, v. 184, p. 283-290, 1998.

ANDERSON, J.R.; ARMITAGE, J.O.; WEISENBURG, D.D. Epidemiology of the non Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. The non- Hodgkin's Lymphoma Classification. **Annals of Oncology**, v. 9, p. 717-720, 1998.

ANDRADE, A.C.V. *et al.* Factors associated with colposcopy-histopathology confirmed cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women from Rio de Janeiro, Brasil. **Plos One**, v. 6, 18297, 2011.

AZAR, K. *et al.* Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Human Pathology**, v. 35 n. 11, p. 1376-1384, 2004.

BAIS, A.G. *et al.* A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, p. 1096-1100, 2005.

BAIS, A.G. *et al.* Cytokine release in HR-HPV + Women without and with Cervical Dysplasia (CIN II and CINIII) or carcinoma, compared with HR-HPV (-) controls. **Mediators of inflammation**, v. 2007, article ID 24147, 8 pages, 2007.

BARITAKI, S. *et al.* Overexpression of VEGF and TGF-beta1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. **International Journal of Oncology**, v. 31, p. 69-79, 2007.

BEHBAHANI, H. *et al.* Proinflammatory and type 1 cytokine expression in cervical mucosa during HIV-1 and Human Papillomavirus infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 45, p. 9-19, 2007.

BELEC, L. *et al.* Proinflammatory cytokine expression in cervical vaginal secretions of normal and HIV-infected women. **Cytokine**, v. 7, p. 568-574, 1995.

BENTON, C.; SHAHIDULLAH, H.; HUNTER J.A.A. Human papillomavirus in the immunosuppressed. **Papillomavirus Rev**, v. 3, p. 23-26, 1992.

BERMUDEZ-MORALES, V.H. *et al.* correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer Investigation**, v. 26, p. 1037-1043, 2008.

BOULET, G.A.V. *et al.* Human papillomavirus in cervical cancer screening: Important role as biomarker. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventions**, v. 17, suppl. 43, p. 810-817, 2008.

BRATCHER, L.F.; SAHASRABUDDHE, V.V. The impact of antiretroviral therapy on HPV and cervical intraepithelial neoplasia: current evidence and directions for future research. **Infectious Agents and Cancer**, v. 5, p. 8, 2010.

BRUNDA, M.J. *et al.* Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1223-1230, 1993.

BRUNDA, M.J. Interleukin-12. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, p. 280-288, 1994.

BURNET, M. Cancer: A biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions IV: Practical applications. **British Medical Journal**, v. 1, p. 841-847, 1957.

CASTELLSAGUÉ, X. *et al.* **HPV and Cervical Cancer in the World**. 2007 Report. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Disponível em: www.who.int/hpvcentre. Acesso em: setembro de 2011.

CAVALCANTI, S.M.B. *et al.* Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **Journal of Infection**, v. 40, p. 80-87, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescent and adults. **The Journal of the American Medical Association**, v. 269, p. 729-730, 1993.

CHAN, S.H. *et al.* Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p.869-879, 1991.

CHATUVERDI, A.K. *et al.* Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from three clinical settings. **Journal of Medical Virology**, v. 75, p. 105-113, 2005.

CHEN, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, suppl. 12, p. 1875-1886, 2003.

CHIASOON, M.A. *et al.* Increased prevalence of vulvovagina:condyloma and vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. **Obstetrics and Gynecology**, v. 89, p. 690-694, 1997.

CLEIRICE, M. *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **Journal of National Cancer Institute**, v. 89, n. 3, 245-250, 1997.

CLIFFORD, G.M.; GONÇALVES, M.A.; FRANCESCHI S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, p.2337-2344, 2006.

COFFEY, R.J. *et al.* Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. **Cancer Research**, v. 48, p. 1596-1602, 1988.

COLEMAN, N.; STANLEY, M.A. Characterization and functional analysis of the expression of vascular adhesion molecules in human papillomavirus-related disease of the cervix. **Cancer**, v. 74, p. 884-892, 1994.

CONLEY, L.J. *et al.* HIV-1 infection and risk of vulvovaginal and perianal condylomata acuminata and intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. **Lancet**, v. 359, p. 108-113, 2002.

COOMBS, R.W.; REICHELDERFER, P.S.; LANDAY A.L. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. **AIDS**, v. 17, p. 455-480, 2003.

CROWLEY-NOWICK, P.A. *et al.* Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 939-945, 2000.

DEL PRIORI *et al.* Colposcopic. biopsies versus loop electrosurgical excision procedure cone histology in human immunodeficiency virus-positive women. **Journal of Reproductive Medicine**, v. 41, p. 653-657, 1996.

DE SANJOSÉ, S. *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 453-459, 2007.

DOLEY, A.S. *et al.* Human immunodeficiency virus infection in vitro activates naturally integrated human papillomavirus type 18 and induces synthesis of the L1 capsid protein. **The Journal of General Virology**, v. 80, p. 2937-2944, 1999.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, suppl. 1, p. s7-s15, 2005.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, p. 525-541, 2006.

DUGGANKEEN, M.F. *et al.* Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression. **European Journal of Immunogenetics**, v. 23, p. 275-284, 1996.

ELLERBROCK, T.V. *et al.* Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **The Journal of the American Medical Association**, v. 283, p. 1031-1037, 2000.

EL-SHERIF, A.M. *et al.* Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. **Journal of Pathology**, v. 195, p. 179-185, 2001.

ENGELS, E.A. *et al.* Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002. **Aids**, v. 20, p. 1645-1654, 2006.

EVANDER, M.K. *et al.* Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. **The Journal of Infectious Disease**, v. 171, p. 1026-1030, 1995.

FAUCI, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, v. 384, p. 529-534, 1996.

FERLAY, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, suppl. 12, p. 2893-2917, 2010.

FRANCESCHI, S. *et al.* Incidence of AIDS-defining cancers after AIDS diagnosis among people with AIDS in Italy, 1986-1998. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 34, p. 84-90, 2003.

FRAZER, I.H. Interaction of human papillomavirus with the host immune system: A well evolved relationship. **Virology**, v. 384, p. 410-414, 2009.

FRISCH, M.; BIGGAR, R.J.; GOEDERT, J.J. Human papillomavirus associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of National Cancer Institute**, v. 92, p. 1500-1510, 2000.

FRISCH M. *et al.* Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. **The Journal of American Medical Association**, v. 285, p. 1736-1745, 2001.

GAGE, J.R. *et al.* Cervical cancer cell lines and human papillomavirus (HPV)-Immortalized keratinocytes induce HIV-1 in the U1 monocyte line. **Obstetrics & Gynecology**, v. 96, p. 879-885, 2000.

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

GRULICH, A.E. *et al.* Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. **Lancet**, v. 370, p. 59-67, 2007.

GUHA, D.; CHATTERJEE, R. Cytokine levels in infected and uninfected Indian women: Correlation with other STAs. **Experimental and Molecular Pathology**, p. 65-68, 2009.

HAZELBAG, S. *et al.* Cytokine profile of cervical cancer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 83, p. 235-243, 2001.

HAZELBAG, S. *et al.* Prognostic relevance of TGF-beta 1 and PAI-1 in cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 1020-1028, 2004.

HELMERHORST, T.J.; MEIJER C.J. Cervical cancer should be considered as a rare complication of oncogenic HPV infection rather than a STD. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 12, p. 235-236.

HILDESHEIM, A. *et al.* HPV cofactors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 12119-12126, 2001.

HILLEMANN, P. *et al.* Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cytology abnormalities in HIV-seropositive women. **AIDS**, v. 10, p. 1641-1647, 1996.

HO, G.Y., *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 423-428, 1998.

HOPFL, R. *et al.* Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. **Lancet**, v. 356, p. 1985-1986, 2000.

HSIEH, C.S. *et al.* Development of Th-1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, p. 547-549, 1993.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. Ministério da Saúde, Brasil. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2010. Acesso em: setembro de 2011.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13541 women with carcinoma of the cervix and 23017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 1481-1495, 1996.

IVASHKIV, B.L; HU, X. Signaling by STATs. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, p. 159-168, 2004.

JACOBS, N. *et al.* Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 111, p. 219-224, 1998.

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

JAYSHREE, R.S. *et al.* Cell intrinsic and extrinsic factors in cervical carcinogenesis. **The Indian Journal of Medicine Research**, v. 130, p. 286-295, 2009.

KADISH, A.S. *et al.* Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. **Journal of National Cancer Institute**, v. 89, p. 1285-1293, 1997.

KANG, S.H. *et al.* Genetic integrity of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptors in cervical carcinoma cell lines: loss of growth sensitivity but conserved transcriptional response to TGF-beta. **International Journal of Cancer** v. 77, suppl 4, p. 620-625, 1998.

KANODIA, S.; FAHEY, S.; KAST, W.M. Mechanisms used by Human Papillomavirus to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KATZ, L.M.C. *et al.* Concordância entre citologia, colposcopia e histopatologia cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 368-373, 2010.

KIM, J.W. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through down-regulation of c-myc gene and overexpression of p27Kip1 protein in cervical carcinoma. **Gynecology Oncology**, v. 69, suppl. 3, p. 230-236, 1998.

KJELLBERG, L. *et al.* Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factor for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. **British Journal of Cancer**, v. 82, p. 1332-1338, 2000.

KOBAYASHI, A. *et al.* Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, p.412-420, 2008.

KOBAYASHI, A. *et al.* Functional Attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Research**, v. 64, p. 6766-6774, 2004.

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews: Immunology**, v. 4, p. 387-394, 2004.

LAWRENCE, T. *et al.* Autosomal-dominant primary immunodeficiencies. **Current Opinion in Hematology**, v. 12, p. 22-30, 2005.

LE BON, A.; TOUGH, D.F. Links between innate and adaptative immunity via type I interferon. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 432-436, 2002.

LEIGH, I.M.; GLOVER, M.T. Skin cancer and warts in immunosupressed renal transplant recipients. **Recent Results in Cancer Research**, v. 139, p. 69-86, 1995.

LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. Regulation of immune response by TGF- β . **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 137-161, 1998.

LIMA, M. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 104, p. 100-104, 2009.

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

MALMGAARD, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 24, p. 439-454, 2004.

MASSAD, L.S.; COLLINS, Y.C. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. **Gynecology Oncology**, v. 89, suppl. 3, p. 424-428, 2003.

MASSAD, L.S. *et al.* Evolution of cervical abnormalities among women with HIV-1: evidence from surveillance cytology in the women's interagency HIV study. **Journal of Acquired Immune Deficiende Syndromes**, v.27, p.432-442, 2001.

MASSAD, L.S. *et al.* Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. Women's Interagency HIV Study Group. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 21, p. 33-41, 1999.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. J. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. **Cell**, v. 91, p. 295-298, 1997.

MEYAARD, L. *et al.* IL-12 induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12 induced immune responses. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 2776-2782, 1996.

MIDDLETON, K. *et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **Journal of virology**, v. 77, p. 10186-10201, 2003.

MINKOFF, H. *et al.* A longitudinal study of human papillomavirus carriage in human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, p. 982-986, 1998.

MORENO, V. *et al.* Effect of oral contraceptive on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case control. **Lancet**, v. 359, p. 1085-1092, 2002.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Chapter 5: updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, suppl. 3, p. 42-51, 2006.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Prevalence of and risks for cervical and human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent women: impact of infection with human immunodeficiency virus. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 154, p. 127-134, 2000.

MOSCICKI, A.B. *et al.* Risk of high-grade squamous intraepithelial lesion in HIV-infected adolescents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, suppl. 8, p.1413-1421, 2004.

MOSCICKI, A.B. *et al.* The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. **The Journal of Pediatrics**, v. 132, p. 277-284, 1998.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.

MOTA, F. *et al.* The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. **Clinical and Experimental Immunol**, v. 16, p. 33-40, 1999.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

MURTA, E.F.C. *et al.* Importância da infecção pelo papilomavírus humano na incidência de neoplasia intra-epitelial cervical. **J Bras Ginec**, v. 107, p. 361-366, 1997.

MURVAI, M. *et al.* Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor-beta2 (TGF-beta2) promoter. **Archives of Virology**, v. 149, p. 2379-2392, 2004.

NAKAMURA, T. *et al.* Expression of indoleamine2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3- expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. **Cancer Science**, v. 98, p. 874-881, 2007.

NANDA, K. *et al.* Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Annals Internal Medicine**, v. 132, p. 810-819, 2000.

NAPPI, L. *et al.* Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and

untreated women. **European Journal of Obstetric Gynecology and Reproductive Biology**, v. 121, p. 226-232, 2005.

NASTALA, C.L. *et al.* Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 1697-1706, 1994.

NELMS, K. *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annual Review of immunology**, v. 17, p. 701-738, 1999.

NICKOLOFF, B. J. *et al.* Antiproliferative effects of recombinant and γ interferons on cultured human keratinocytes. **Laboratory Investigation**, v. 51, p. 697-701, 1984.

NICOL, A.F. *et al.* Distribution of Immune Cell Subsets and Cytokine-Producing Cells in the Uterine Cervix of Human Papillomavirus (HPV) -Infected Women: Influence of HIV-1 Coinfection. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 14, p. 39-47, 2005.

NICOL, A.F. *et al.* Immune factors involved in the cervical immune response in the HIV/HPV co-infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, p. 84-88, 2008.

PALEFSKY, J.M. Biology of HPV in HIV infection. **Advances in Dental Research**, v. 19, p. 99-105, 2006.

PALEFSKY, J.M. *et al.* Prevalence and risk factors for anal HPV infection in HIV-positive and high –risk HIV-negative women. **The Journal of infectious Diseases**, v. 183, p. 383-391, 2001.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 31, p. 41-46, 2003.

PALEFSKY, J.M. Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. **Topics in HIV Medicine**, v. 15, p. 130-133, 2007.

PARAMSOTHY, P. *et al.* The effect of highly active antiretroviral therapy on human papillomavirus clearance and cervical cytology. **Obstetrics and Gynecology**, v. 113, p. 26-31, 2009.

PARDO-GOVEA, T. *et al.* Gamma interferon (IFN-gamma), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukins 2, 4 and 6 (IL-2, IL-4, IL-6) in cervical-uterine cells of intraepithelial neoplasia: a preliminary report. **Investigación Clínica**, v. 46, n. 1, p. 5-13, 2005.

PARDOUX, C. *et al.* Functional interection between TGF β 1 and IL-12 in human primary allogeneic cytotoxicity and proliferative response. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 136-143, 1997.

PARKIN, D.M.; BRAY, F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24, suppl. 3, p. S11-25, 2006.

PARKIN, D.M. *et al.* Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer Journal for clinicians**, v 55, p 74-108, 2005.

PAULO, M. *et al.* The environmental cofactors in carcinogenesis in high risk HPV/HIV-positive women. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 189-195, 2007.

PEI, X.F. *et al.* HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1481-1486, 1998.

PELKMAN, L.; HELENIUS, A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 414-422, 2003.

PENN, I. Cancers of the anogenital regions in renal transplant recipients. Analysis of 65 cases. **Cancer**, v. 58, p. 611-616, 1986.

PETT, M.R. *et al.* Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV 16 associates with episome loss and na endogenous antiviral response. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v. 103, p. 3822-3827, 2006.

POLI, G. *et al.* Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor a by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 151-158, 1990.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nature Clinical Practice: Oncology**, v. 5, suppl. 1, p. 24-31, 2008.

ROTAR, I. *et al.* The analys of genetic Polymorphism. The relationship between interleukin-4 polymorphisms and intraepithelial cervical neoplasia. **Applied Medical Informations**, v. 27, n. 3, p. 43-52, 2010.

RICHART, R.M. Cervical intraepithelial neoplasia: a review. *In*: SOMMERS, S.C. (ed). **Pathology Annual**. East Norwalk, CT: Appleton-century-crofts, p. 310-328, 1973.

SCHIFFMAN, M.H.; KJAER S.K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **Journal of National Cancer Institute. Monographs**, v. 31, p. 14-19, 2003.

SCHIFFMAN, M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 84, p. 394-398, 1992.

SCOTT, M.E. *et al.* Diminished IFN- γ and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. **International Journal of Cancer**, v. 124, suppl. 6, p. 1379-1383, 2009.

SCOTT, M.E.; STITES, D.P.; MOSCICKI, A.B. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 751-755, 1999.

SCOTT, P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. **Sciences**, v. 260, p. 496-497, 1993.

SHACKLETT, B.L. Cell-mediated Immunity to HIV in the Female Reproductive Tract. **The Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, p. 190-195, 2009.

SHACTER, E.; WEITZMAN, A.S. Chronic inflammation and cancer. **Oncology**, v. 16, p. 217-229, 2002.

SHERMAN, L.; SCHLEGEL, R. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. **Journal of Virology**, v. 70, p. 3269-3279, 1996.

SHI Y.; MASSAQUÉ J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685-700, 2003.

SILVERBERG, M.J. *et al.* The impact of HIV infection and immunodeficiency on human papillomavirus type 6 or 11 infection and anogenital warts. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 29, p.427-435, 2002.

SMITH, J.S. *et al.* Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 1604-1613, 2002.

SOLOMON, D. *et al.* The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting Results of Cervical Cytology. **The Journal of the American Medical Association**, v. 287, suppl. 16, p. 2114-2119, 2002.

SONG, S.H. *et al.* Interferon gamma(IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). **Gynecologic Oncology**, v. 108, p. 543-548, 2008.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J.E. Type 1/ type 2 immunity in infectious diseases. **Clin Infect Dis**, v. 32, p.76-102, 2001.

STANLEY, M.A. Immune responses to human papilloma viruses. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 266-276, 2009.

STANLEY, M.A.; PETT, M.R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1456-1460, 2007.

STANLEY, M.A.; SCARPINI, C.; COLEMAN, N. Cell mediated immunity and lower genital tract neoplasia. **RCOG Monograph**, 2003.

STRICKLER, H.D. *et al.* Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus positive human. **Journal of National Cancer Institute**, v. 95, p. 1062-1071, 2003.

SUN, X.W. *et al.* Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus seropositive women. **Obstetrics and Gynecology**, v. 85, p. 680-686, 1995.

SUN, X.W. *et al.* Human papillomavirus infections in women infected with the human immunodeficiency virus. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1343-1349, 1997.

TAHARA, H. *et al.* Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin-12 can suppress tumor growth *in vivo* and induce antitumor immunity to a murine melanoma. **Cancer Research**, v. 54, p. 182-189, 1994.

TAKEHARA, K. Local immune response in uterine in uterine cervical carcinogenesis. **Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica**, v. 48, p. 1063-1070, 1996.

TEMMERMAN, M. *et al.* Risk factors for human papillomavirus and cervical prevalence lesions, and the role of concurrent HIV-1 infection. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 65, p. 171-181, 1999.

THOMAS, L. Discussion. *In*: LAWRENCE, H.S. (editor). Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: **Hoeber Harper**, p. 529-532, 1959.

TINDLE, R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews: Cancer**, v. 2, p. 59-65, 2002.

TJONG, M.Y. *et al.* Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. **Cytokines**, v. 21, p. 357-360, 2001.

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

ULRICH, C. *et al.* Skin infections in organ transplant recipients. **Journal of German Society of Dermatology**, v. 6, p.98-195, 2008.

UNAIDS. Global Report. Disponível em: http://www.unaids.org/documents/20101123_globalreport_slides_chapter2_em.pdf Acesso em: setembro/ 2011.

VAN DER BURG, S.H.; PALEFSKY, J.M. Human immunodeficiency virus and human papilloma virus- why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 108, 2009.

VAN DRIEL, W.J.V. *et al.* Presence of an eosinophilic infiltrate in cervix squamous carcinoma results from a type 2 immune response. **Gynecologic Oncology**, v. 74, p. 188-195, 1999.

VAN POELGEEEST, M.I.E. *et al.* Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV-16 L1,E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 675-683, 2006.

VERNON, S.D. *et al.* HIV and human papillomavirus as independent risk factor for cervical neoplasia in women with high or low numbers of sex partners. **Sexually Transmitted Infections**, v.75, p. 258-260, 1999.

VOEST, E.E. *et al.* Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 581-586, 1995.

WALLIN, K.L. *et al.* A population- based prospective study of Chlamydia trachomatis infection and cervical carcinoma. **International Journal of Cancer**, v.101, p.371-374, 2002.

WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA N.; von KNEBEL DOEBERITZ, M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Research**, v. 64, p. 3878-3884, 2004.

WOODWORTH, C.D. *et al.* Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 92, p. 2840-2844, 1995.

WOODWORTH, C.D. *et al.* Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. **Cancer Research**, v. 52, p. 456-463, 1992.

WOODWORTH, C.D. *et al.* Transforming growth factors beta 1 supports autonomous growth of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes under conditions promoting squamous differentiation. **Cell Growth and Differentiation**, v. 7, p. 811-820, 1996.

WOODWORTH, C.D.; NOTARIO, V.; DIPAOLO, J.A. Transforming growth factors beta 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. **Journal of Virology**, v. 64, p. 4767-4775, 1990.

WRIGHT JR., T.C. *et al.* Consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology- sponsored Consensus Conference. **American Journal of Gynecology**, p. 346-355, 2007.

WRIGHT, T.C. *et al.* **Blaustein's pathology of the female genital tract.** 4th edition. New York. Springer-Verlag, 1994.

WRIGHT, T.C. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors and validity of Papanicolaou smears. **Obstetrics and Gynecology**, v. 84, p. 591-597, 1994.

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.

WU, T.C.; KURMAN, R.J. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, p. 185-186, 1997.

ZHU, J.; PAUL, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, suppl. 5, p. 1557-1569, 2008.

ZIMMERMANN, 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. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v.36, p. 794, 1976.

ZUR HAUSEN, H. *et al.* Human papilloma viruses and cancer. **Bibliotheca Haematologica**, v. 43, p. 569-571, 1975.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancer. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 581-587, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, suppl. 9, p. 690-698, 2000.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A - Classificação do CDC

A classificação revisada do CDC para adultos e adolescentes infectados pelo HIV é baseada nas condições clínicas associadas à contagem de linfócitos TCD4+.

As três categorias de linfócitos TCD4+ são:

- Categoria 1: ≥ 500 células/mL
- Categoria 2: 200 a 499 células/mL
- Categoria 3: menos de 200 células/mL

Categorias clínicas

Categoria A: consiste em uma ou mais das condições listadas a seguir em adulto ou adolescente maior de 13 anos com infecção documentada pelo HIV.

- Infecção assintomática.
- Linfadenopatia generalizada persistente
- Infecção aguda pelo HIV

Categoria B: consiste de condições sintomáticas em um adulto ou adolescente infectado pelo HIV, que não esteja incluído na categoria C. Os critérios para definir como categoria B são:

- a) As condições clínicas são atribuídas ao HIV ou são indicativas de defeito da imunidade.
- b) As condições são consideradas terem curso clínico complicado pelo HIV.

Exemplos de condições na categoria B são:

- Angiomatose bacilar
- Candidíases orofaríngeas
- Candidíase vulvovaginal persistente, frequente ou não responsiva ao tratamento
- Displasia cervical (moderada ou grave)/carcinoma cervical *in situ*
- Febre ($38,5^{\circ}\text{C}$) ou diarreia com mais de 1 mês de duração
- Leucoplasia

- Herpes zoster envolvendo pelo menos dois episódios distintos ou mais de um dermatomo
- Púrpura trombocitopênica idiopática
- Listeriose
- Doença inflamatória pélvica, particularmente se complicada por abscesso tubo-ovariano.
- Neuropatia periférica.

Categoria C

Inclui as condições listadas a seguir:

- Candidíase do esôfago
- Sarcoma de Kaposi
- Câncer cervical invasivo
- Criptococose extrapulmonar
- Criptosporidiose com diarreia >1 mês
- Citomegalovirose
- Histoplasmose extrapulmonar
- Tuberculose pulmonar disseminada
- Toxoplasmose de órgãos internos

ANEXO B - Parecer do COEP-UFMG

**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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a horizontal line.

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

ANEXO C - Descrição histopatológica baseada na classificação de Richart (1973)

Grau de neoplasia intraepitelial cervical (NIC)	Característica da histopatologia
NIC 1	Lesões que apresentam o terço basal do epitélio acometido por células com distúrbio de polarização do epitélio.
NIC 2	Lesões que apresentam dois terços basais do epitélio acometidos por células com pleomorfismo moderado, aumento da relação núcleo-citoplasma e cromatina granular.
NIC 3	Lesões que apresentam mais de dois terços do epitélio acometidos por células com pleomorfismo acentuado, cromatina granulosa e nucleomegalia acentuada. Neste grupo são incluídas as lesões que acometem todo o epitélio, sem sinais de invasão.

Fonte: Wright, Kurman e Ferency (2002).

ANEXO D – Terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical, segundo a orientação de Wright *et al.* (1994a), baseada na classificação proposta por Richart (1973)

WHO/ISGYP* de Bethesda Classificação	Terminologia do Sistema
Displasia leve (NIC 1) Cervicite com HPV	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (SIL de baixo grau= LSIL)
Displasia moderada (NIC 2) Displasia acentuada (NIC 3)	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (SIL de alto grau= HSIL)

**World Health Organization and International Society of Gynecological Pathologists.*

Fonte: Wright, Kurman e Ferency (2002, p. 256).

ANEXO E - Soluções utilizadas na imuno-histoquímica

Silanização de lâminas

** Usar luvas para a limpeza das lâminas e manipulação do silano.

** A solução acetona/silano pode ser usada várias vezes no momento do preparo, porém não pode ser reaproveitada ou estocada para uso posterior.

- Limpar as lâminas com álcool absoluto.
- Colocar em suportes (“cestas para lâminas”) e passar em:
- Acetona – 2 min
- Mistura acetona/silano – 2 min (750 mL de acetona e 45 mL de silano)
- Acetona – 2 min
- Secar as lâminas em estufa e guardar em caixas limpas.

Tampão PBS pH 7,2-7,4

- Para 1 litro de solução concentrada (10x):
- Fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)- 11,56 g
- Fosfato diácido de potássio anidro (KH_2PO_4) - 2,72 g
- Cloreto de sódio (NaCl) - 87g
- 1.000 mL de água destilada

Solução de uso:

- Diluir em 1:10 a solução concentrada. Medir o pH da solução.

Tampão citrato pH 6,0

- Ácido cítrico mono-hidratado- 2,1g
- Água destilada - 1 litro
- Dissolver o ácido cítrico em água destilada. Acertar o pH da solução com NaOH 2N.

Solução tampão PBS-BSA

- Soroalbumina bovina (BSA) fração V (Sigma A9647) 1 g
- Tampão PBS 100 mL

Tampão TRIS-HCL 50 mM

- 6.4 g TRIS
- 8,5 g Cloreto de Sódio (NaCl)
- Completar volume para 1.000 mL com água destilada e acertar pH 7,4 usando solução de HCl

PBS diluído para uso (1X)-Ph-7.6

- 8,5 de NaCl
- 1,2g de Na₂HPO₄
- 0,156g de Na₂HPO₄ (Di-hidratado)
- 0,212g Na₂HPO₄ (4-hidratado)
- 0,136g Na₂HPO₄ (monoidratado)
- Completar com 1000 mL água destilada

PBS (concentrado) 10X pH-7.6

- 11,36g de Na₂HPO₄
- 2,72g de KH₂PO₄
- 87,0g de NaCl
- 800 mL de água destilada
- ♦ pH ajustar com NaOH e água destilada para volume mol/L.

Tampão para diluir anticorpo primário - BSA

- 20 mL de água destilada
- 1 g albumina

Ácido cítrico 10 mM

- 2,10g Ácido cítrico mono-hidratado
- Completar volume para 1.000 mL com água destilada e acertar pH para 6,0 usando solução de NaOH

Tris-Edta pH-8.0

- 1,21g de TRIS
- 0,3722g de EDTA para 1.000 mL
- Ajustar o pH para 8.0

Solução de hidróxido de amônio 10% em álcool etílico 95%

- 30 mL hidróxido de amônio P.A
- 270 mL álcool etílico comercial

Solução de hematoxilina de Mayer`s

- 1g de hematoxilina
- 1.000 mL água destilada
- 0.2 g iodato de potássio
- 50 g alúmen de amônio ou de potássio
- 1 g ácido cítrico
- 50 g cloral hidrato ou diidratado
- Dissolver a hematoxilina na água destilada, aquecendo bastante para melhor solubilização. Adicionar o iodato de potássio e o alúmen e agitar bastante. Adicionar o ácido cítrico e o cloral. Acondicionar em frasco escuro.

Soluções para bloqueio da avidina e biotina

- 90 mL de água destilada
- 15 g de leite em pó desnatado (Molico®)

SOLUÇÕES PARA REVELAÇÃO

Diaminobenzidina (DAB)- sólida (pastilhas ou pó granulado)

- 25 mg diaminobenzidina
- 100 mL tampão Tris-Hcl 20Mm
- 1,2 mL peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes
- Dissolver a DAB em pequeno volume do tampão, masserando, completar volume e filtrar em filtro duplo de papel. Adicionar o H₂O₂ no momento da utilização da solução.

ANEXO F - TABELA DE PADRONIZAÇÃO DOS ANTICORPOS

Anticorpos	Recuperação Antigênica	Controle	Diluição	Escolhido
IL - 1	Citrato	Tonsila	1:50, 1:500, 1:1000	Citrato, Diluição 1:50.
	Tris – EDTA	Tonsila	1:50, 1:500, 1:1000	
	EDTA	Tonsila	1:50, 1:500, 1:1000	
IL - 4	Citrato	Tonsila	1:50, 1:100, 1:500, 1:1000	Citrato, Diluição 1:50.
	EDTA	Tonsila	1:100, 1:500, 1:1000	
IL - 12	Citrato	Tonsila	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	Tris – EDTA, Diluição 1:50.
	Tris – EDTA	Tonsila	1:50, 1:100, 1:250	
	EDTA	Tonsila	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	
IFN- γ	Citrato	Tonsila	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	EDTA, Diluição 1:100.
	Tris – EDTA	Tonsila	1:50, 1:100, 1:250, 1:500	
	EDTA	Tonsila	1:50, 1:100, 1:250	
TGF- β	Citrato	Tonsila	1:20, 1:200	Citrato, Diluição 1:200.
	EDTA	Tonsila	1:20, 1:200	

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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 a 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 fazer parte 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) e 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 receberá 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 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 DESTE ESTUDO E DURANTE QUANTO TEMPO?

Estima-se a participação de aproximadamente 400 mulheres.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE 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 leve cólica, 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 algum 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 no 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 da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo do 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 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

Médico Local
Cidade / Telefone

Belo Horizonte

Data: ____ / ____ / ____

Fone: (31) 9968-2401/ (31) 3273-5233

APÊNDICE B - Formulário de pesquisa

Número:

Data:

Identificação:

Nome:

Endereço:

Idade:

HIV:

1-Positivo

2-Negativo

Estado civil:

1-solteira 2-casada 3-viúva 4-outro

Resultado da biópsia:

1-NIC 1 2-NIC 2 3-NIC 3 4-Cervicite com HPV

Uso de medicamentos:

1-sim

2-não

Sorologia positiva:

1-menos de 1 ano

2-entre 2 e 5 anos

3-acima de 5 anos

Forma de contágio:

1-sexual

2-sangue

3-outros

Início de atividade sexual -----anos

Número de parceiros -----anos

Vida sexual ativa

1-sim

2-não

Gesta-----Para-----Aborto-----

Contagem de células TCD4+

Data / /

1- < que 200

2-entre 200 e 500

3- > que 500

Carga viral

Data / /

1- < 400 cópias/mL ou 2,6 log

2- de 401 a 50.000 cópias/mL ou 4,7 log

3- > 50.000 cópias/mL ou > 4,7 log

Citologia oncológica

Data / /

1- dentro dos limites da normalidade

2- mudanças reativas ou reparativas

3- anormalidades em células epiteliais

ASCUS

Lesão intraepitelial de baixo grau – NIC 1

Lesão intraepitelial de alto grau – NIC 2 e 3

4- Carcinoma de células escamosas

5- Adenocarcinoma

Colposcopia

- 1- achados colposcópicos normais
- 2- achados colposcópicos anormais grau I
grau II
- 3- suspeita de carcinoma invasivo
- 4- colposcopia insatisfatória
- 5- Miscelânea

Biópsia

Data / /

- 1- cervicite com HPV
- 2- NIC 1
- 3- NIC 2
- 4- NIC 3

Anatomopatológico da CAF

- 1- cervicite com HPV
- 2- NIC 1
- 3- NIC 2
- 4- NIC 3
- 5- Câncer microinvasor
- 6- Câncer invasor