

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



TESE DE DOUTORADO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE GENES
DO SISTEMA IMUNOLÓGICO (IL-10, TNF- α) E
INFECÇÃO POR HPV NOS DIFERENTES GRAUS DE
LESÕES CERVICAIS**

CRISTINE NASCENTE IGANSI

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARY CLARISSE BOZZETTI
Co-Orientadora: Dr^a. SABRINA ESTEVES DE MATTOS ALMEIDA**

Porto Alegre, Março de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



TESE DE DOUTORADO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE GENES
DO SISTEMA IMUNOLÓGICO (IL-10, TNF- α) E
INFECÇÃO POR HPV NOS DIFERENTES GRAUS DE
LESÕES CERVICAIS**

CRISTINE NASCENTE IGANSI

Orientador: Profa. Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A apresentação desta Tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do Título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil

2009

I24a Igansi, Cristine Nascente

Associação entre polimorfismos de genes do sistema imunológico (IL-10, TNF- α) e infecção por HPV nos diferentes graus de lesões cervicais / Cristine Nascente Igansi ; orient. Mary Clarisse Bozzetti. – 2009.

157 f. : il. p&b

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Papillomavírus humano 2. Polimorfismo genético 3. Neoplasias do colo do útero 4. Infecções por papillomavírus 5. Lesões 6. Fator de necrose tumoral alfa 7. Interleucina-10 I. Bozzetti, Mary Clarisse II. Título.

NLM: QZ 200

BANCA EXAMINADORA

DEFESA PRELIMINAR – 12/02/2008

1. Prof. Dr. Álvaro Vigo – Bacharel em Estatística pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Doutor em Epidemiologia pela UFRGS. Atualmente é professor Adjunto da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com experiência na área de Estatística Aplicada e Epidemiologia.
2. Prof. Dr. Ricardo de Souza Kuchenbecker – Médico pela UFRGS e Doutor em Epidemiologia pela UFRGS. É médico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde coordena a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. Consultor do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Ministério da Saúde do Brasil para iniciativas de cooperação internacional em AIDS.
3. Prof. Dra. Cristina Rolim Neumann – Médica e Doutora em Ciências Médicas pela UFRGS. Atualmente é Professor adjunto da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEFESA PÚBLICA – 17/02/2008

1. Prof. Dra. Miriam Alice Frantz – Bióloga pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Mestre em Clinical Cytotechnology - University of London e Doutora em Patologia pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Atualmente é professora do Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS.
2. Dr. Daniel de Carvalho Damin – Médico, Doutor em Gastroenterologia pela UFRGS. Atualmente é médico do serviço de Proctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e professor da Pós-Graduação em Cirurgia da UFRGS.
3. Prof. Dr. Ricardo de Souza Kuchenbecker - Médico pela UFRGS e Doutor em Epidemiologia pela UFRGS. É médico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde coordena a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. Consultor do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Ministério da Saúde do Brasil para iniciativas de cooperação internacional em AIDS.

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades e conquistas...

Dedico esta Tese de Doutorado, a minha Querida Família, pela Vida, educação, incentivo, paciência e compreensão nos momentos de minha ausência durante este período...

Aos meus Amores, pelos bons momentos e aprendizado na Escola da Vida e do Amor...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma me ajudaram e contribuíram para esta Tese de Doutorado, em especial:

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia por esta oportunidade e aos professores deste PPG pelos ensinamentos e incentivo.

À Querida Professora Doutora Mary Clarisse Bozzetti por ter acreditado neste trabalho, pelo indispensável apoio e ensinamento, pela orientação nesta caminhada, pela dedicação, carinho e amizade. Levarei para minha vida profissional e pessoal todos os aprendizados!

À minha co-orientadora Sabrina Esteves de Mattos Almeida, por toda a atenção, dedicação e ensinamentos durante a nossa convivência.

À minha querida amiga Danusa, pelo incentivo, pela admiração, pelos momentos de consolação e alegria compartilhados. Muito obrigada por tudo!

À querida amiga e indispensável colega de Laboratório Gabriela Tonini (Nena), pela sua grande participação neste estudo, dedicação, e pela compreensão e apoio nos momentos de frustração, alegria e companheirismo. És uma grande pesquisadora!

À querida amiga e colega de Laboratório Viviane Kubiszewski, pela amizade, compreensão e dedicação em todos os momentos.

À querida amiga e colega Marilda Mar da Rosa, por todos os momentos vivenciados juntos desde o início de nossas caminhadas!

Às amigas e colegas de Laboratório, em especial Regina Barcellos, Elis Regina Dalla Costa, Candice Michelon, pela amizade, pelos conselhos e colaboração em todos os momentos.

À querida e indispensável amiga, Sandra Borges, por sua dedicação fantástica no trabalho e pelo seu carisma e alegria contagiante, todos os dias! És uma grande amiga e te admiro muito!

Ao meu querido amigo Daniel Lisboa Dri, por todos os momentos compartilhados, pelo carinho, pelos ensinamentos e incentivo. Estarei sempre torcendo por ti! Muito Sucesso e Felicidades!

Ao CDCT/FEPPS, em especial às Queridas Doutoradas Maria Lúcia Rossetti, Rosa Dea Sperhacke e Márcia Susana Nunes Silva, pela amizade, orientação e por terem me acolhido no Laboratório e acompanhado toda minha trajetória.

À equipe do Posto Jardim Leopoldina, que participa neste projeto, obrigada pela oportunidade de realização do estudo o qual contribuirá com importantes pesquisas e benefícios na Saúde Pública.

Às mulheres participantes do estudo, pois sem elas este trabalho não seria possível.

Enfim, a todas as pessoas que passaram pela minha vida até o momento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
LISTA DE TABELAS.....	16
LISTA DE FIGURAS.....	17
APRESENTAÇÃO.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	22
1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR HPV.....	23
1.3. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV.....	25
1.3.1. Organização e Expressão Gênica Viral	25
1.3.2. Integração Viral.....	29
1.3.3. Carga Viral.....	30
1.3.4. Ciclo Fisiopatológico Viral e Manifestações Clínicas.....	32
1.3.5. Vias de Transmissão e Aquisição Viral.....	38
1.3.6. Diagnóstico Clínico e Laboratorial.....	39
1.3.7. Prevenção e Tratamento.....	40
1.3.7.1. Vacinas.....	41
1.4. Co-Fatores Virais na Oncogênese Cervical.....	43
1.4.1. Sistema Imunológico e HPV.....	45
1.4.2. Antígeno Leucocitário Humano (HLA).....	47
1.4.3. Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrose Factor- α).....	49
1.4.4. Interferon-gama (IFN- γ).....	51
1.4.5. Interleucina-10 (IL-10).....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

2. OBJETIVOS.....	79
2.1. Objetivos Gerais.....	79
2.2. Objetivos Específicos.....	79
3. ARTIGO I.....	80
4. ARTIGO II.....	103
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
ANEXOS.....	127
Anexo I - Projeto de Pesquisa.....	127
Anexo II - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	140
Anexo III - Termo de Consentimento Informado.....	141
Anexo IV - Ficha de Coleta de Dados.....	146
Anexo V - Fluxograma de Seguimento das Participantes do Estudo.....	153
Anexo VI - Protocolo de extração de DNA em amostras de lavado cérvico-vaginais.....	154
Anexo VII - Protocolo para extração de DNA de tecido fixado em bloco de parafina.....	155
Anexo VIII - Cronograma de Atividades Doutorado.....	157
Anexo IX - Equipe de Pesquisa.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
AG-US	Atipia Glandular de Significado Indeterminado
ARMS-PCR	<i>Amplification Refractory Mutation System</i> (Sistema de Amplificação Refratária de Mutações)
ASC-US	Atipia Escamosa de Significado Indeterminado
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
DSI	Doença Sexualmente Infecciosa
E1-E7	Regiões Precoces do Genoma Viral
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EN	Células exterminadoras naturais
EV	Epidermodisplasia verruciforme
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GHC	Grupo Hospitalar Conceição
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HGSIL (LIEAG)	<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)
HLA	<i>Human Leucocitary Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HPV	Papilomavírus Humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN-γ	Interferon-Gama
IL2-IL-10-IL13	Interleucinas

INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1/L2	Proteínas Tardias que compõem o Capsídeo Viral
LACEN	Laboratório Central do Estado
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região regulatória)
LGSIL (LIEBG)	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
M	Molar
mAmp	Miliampere
mg	miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
NIC I-II-III	Neoplasia Intraepitelial Cervical (Graus I, II e III)
OR	<i>ODDS RATIO</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de Leitura Aberta)
p53	Gene constitutivo do genoma humano protetor à indução do câncer
pb	pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pmol	picomol
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RC	Razão de Chances
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TEB	Tris borato-EDTA
Th1-Th2	<i>T-helper cells</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral-alfa)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta

RESUMO

Estudos epidemiológicos e moleculares têm sugerido que o HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões malignas na cérvix uterina. E, sendo o número de infecções extremamente maior do que o número de casos de câncer cervical, este fato nos leva à investigação de outros fatores associados, como por exemplo, a predisposição imunológica do hospedeiro.

Este estudo tem como objetivo avaliar a associação dos polimorfismos (-1082A/G) e (-308 A/G), localizados nos genes da IL-10 e TNF- α , respectivamente, com a infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV), incluindo os tipos oncogênicos HPV-16, 18 e 31, visto que, estas citocinas são moléculas importantes na resposta imune contra infecções virais.

Trata-se de um estudo de casos e controles. O grupo controle foi composto por 211 mulheres, que apresentavam resultado negativo para infecção genital por HPV, identificada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e exame citopatológico sem alterações. Já os casos, corresponderam a 84 mulheres com infecção genital por HPV e resultado anatomopatológico alterado. . A técnica de amplificação refratária de mutações (ARMS-PCR) foi utilizada para a identificação dos polimorfismos. Regressão logística múltipla foi utilizada para verificar a associação das variáveis estudadas com o desfecho (infecção genital pelo HPV). O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências alélicas e genotípicas observadas estão de acordo com as esperadas na população em estudo..

Para os resultados de IL-10, a frequência genotípica observada nos casos foi de 11,9% (AA), 28,6% (AG) e 59,5% (GG); a frequência alélica foi de 26,0% para A e 74,0% para G. No grupo controle, a frequência genotípica encontrada foi 22,8% (AA), 48,8% (AG) e 28,4% (GG); a frequência alélica foi de 47,0% para A e 53,0% para G. Houve diferença significativa entre os grupos estudados, tanto para a frequência alélica quanto para a genotípica ($p < 0,0001$). Entre as mulheres com infecção, encontramos associação das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LGSIL) com o genótipo GG ($p = 0,02$). As variáveis idade (RC=4,70; IC95%: 2,61-8,40), co-infecção por HIV (RC=11,21; IC95%:1,002-125,33) e o genótipo GG (RC=4,22; IC95%: 1,84-9,61) permaneceram independentemente associados ao desfecho (infecção genital pelo HPV).

Para TNF- α , a homozigidade do alelo G (genótipo GG) foi encontrada em maior frequência nos casos (36,9%), seguido por 35,7% do genótipo AA e 27,4% do genótipo AG. Houve diferença

significativa entre os grupos estudados, tanto para a frequência alélica ($p < 0,0002$) quanto para a genotípica: AA ($p = 0,03$), AG e GG ($p < 0,0001$). Analisando a associação com lesões cervicais e tipos oncogênicos, encontramos associação entre o genótipo GG e LGSIL ($p < 0,01$). O genótipo GG está associado ao tipo oncogênico HPV-16 ($p < 0,05$), e à co-infecção pelo vírus HIV ($p < 0,001$). As variáveis idade (RC=3,46; IC95%: 1,89-6,33), os genótipos AG (RC=9,21; IC95%: 4,29-19,75) e AA (RC=2,73; IC95%: 1,25-6,00) permaneceram independentemente associados ao desfecho (infecção genital pelo HPV).

Com estes resultados, é possível sugerir que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL-10 e TNF- α parece estar associada à infecção genital pelo HPV, mostrando a importância da resposta imunológica do hospedeiro no processo de infecção e na progressão das lesões cervicais geradas pelo Papilomavírus Humano.

Palavras-Chave: HPV, polimorfismo, IL-10, TNF- α , câncer cervical.

ABSTRACT

Molecular and epidemiological studies have suggested that HPV is the most important risk factor for the development of malignant lesions in the uterine cervix. The fact that the number of HPV infections is extremely greater than the number of cervical cancer cases leads us to the investigation of other risk factors, such as the predisposition of the host immune.

The present study aimed to evaluate the influence of genetic polymorphisms (-1082A/G) and (-308A/G), located in the genes of IL-10 and TNF- α , respectively, with the genital HPV infection, including oncogenic HPV-16, 18 and 31, since these cytokines are important molecules in the immune response against viral infections.

This is a case-control study. The control group was composed by 211 women, who have tested negative for HPV genital infection by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, and who had normal cytologic results. Cases were 84 women with HPV genital infection and abnormal anatomopathological results. The technique of amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) was used to identify the polymorphisms. Multiple logistic regression was used to verify the association between the study factors and the outcome (genital infection by HPV). The Hardy-Weinberg equilibrium was used to verify whether the observed allelic and genotypic frequencies were according with the expected in the studied population.

For the results of IL-10, the genotypic frequencies observed in the group of women with infection was 11.9% (AA), 28,6% (AG) and 59.5% (GG), the allelic frequency was 26.0% for 74.0% for A and G. In the control group, the frequency was found genotypical 22.8% (AA), 48.8% (AG) and 28.4% (GG), the allelic frequency was 47.0% to 53.0% for A and G. There were significant differences between groups, both for the allelic frequency as for the genotypic ($p < 0.0001$). Among women with infection, we found association of injuries LGSIL with the GG genotype ($p = 0.021$). The variables age (OR=4.70; 95%IC: 2.61-8.40), HIV co-infection (OR=11.21; 95%IC: 1.002-125,33), and genotype GG (OR=4.22; 95%IC: 1.84-9.61) remained independently associated to the outcome (genital HPV infection).

For TNF- α analysis, the genotypic frequencies observed in the group of patients was 22.0% (AA), 69.0% (AG) and 8.0% (GG), the allelic frequency was 57.0% and 43.0% for A to G. In the control group, the frequency genotype was found 35.0% (AA), 27.0% (AG) and 36.0% (GG), the allelic

frequency was 49.0% for A and 51.0% for G. There were significant differences between groups, both for the allelic frequency ($p < 0.0002$) and to the genotypic: AA ($p = 0.03$), AG e GG ($p < 0.0001$). Analysing the association with cervical lesions and with high-risk type, there was found a significant association, between the genotype GG and LGSIL ($p < 0.01$). The genotype GG is associated with the HPV-16 infection ($p < 0.05$) and with the HIV virus co-infection ($p < 0.0001$). The variables age (OR=3.46; 95%IC: 1.89-6.33), genotypes AG (OR=9.21; 95%IC: 4.29-19.75) and AA (OR=2.73; 95%IC: 1.25-6.00) remained independently associated to the outcome (genital HPV infection).

The results suggest that the genetically determined predisposition to produce high levels of IL-10 and TNF- α may be related to the genital HPV infection showing the importance of the host immune response in the progression of cervical lesions caused by the Human Papillomavirus.

Keywords: HPV, polymorphism, IL-10, TNF- α , cervical cancer.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1. Distribuição das variáveis sócio-comportamentais de acordo com o grupo de mulheres arroladas no estudo.....	97
Tabela 2. Frequência alélica e genotípica da IL-10 nos grupos de casos e controles.....	98
Tabela 3. Razões de Chances (RC) Brutas e Ajustadas das variáveis estudadas em relação à infecção genital pelo HPV.....	99

ARTIGO II

Tabela 1. Frequência alélica e genotípica de TNF- α nos grupos de casos e controles.....	119
Tabela 2. Distribuição da frequência genotípica entre mulheres com citologia normal, LGSIL e HGSIL.....	120
Tabela 3. Razões de Chances (RC) Brutas e Ajustadas das variáveis estudadas em relação à infecção genital pelo HPV.....	120

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Representação do capsídeo viral.....	26
Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR).....	26
Figura 3. Representação esquemática da infecção viral na célula normal: formação de coilócitos, NIC I e NIC III.....	33
Figura 4. Etapas do desenvolvimento do câncer cervical, visualizados do exame citológico ao colposcópico.....	34
Figura 5. Verrugas genitais na região vulvar ocasionadas pela infecção viral.....	35
Figura 6. Câncer anal e cervical em mulheres com infecção por HPV (da esquerda para direita).....	37
Figura 7. História natural da infecção cervical por HPV.....	37

ARTIGO I

Figura 1. Frequências genotípicas da IL-10 comparadas a lesões de alto (LGSIL) e baixo grau (LGSIL).....	100
Figura 2. Distribuição da frequência alélica (IL-10 A/G) estudada com os tipos virais oncogênicos (HPV-16, -18 e -31).....	101

ARTIGO II

Figura 1. Distribuição do polimorfismo -308 TNF- α de acordo com os resultados anatomopatológicos (LGSIL e HGSIL).....	122
Figura 2. Distribuição dos tipos oncogênicos HPV-16, -18 e -31 de acordo com o polimorfismo -308 TNF- α	123

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 2009. Este estudo objetiva analisar a associação de polimorfismos de genes do sistema imunológico, Interleucina- 10 (IL-10) e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Além disso, pretende verificar a associação destes polimorfismos com o desenvolvimento de lesões de baixo grau (LGSIL) e lesões mais graves (HGSIL).

O trabalho é apresentado em três partes: (i) Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos; (ii) Artigos e (iii) Conclusões e Considerações Finais.

Os resultados são apresentados na forma de dois artigos. Um avalia a associação do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL-10 e a infecção por HPV. O outro artigo avalia a associação do polimorfismo (-308) do gene do TNF- α com a infecção por tipos oncogênicos de HPV.. As considerações finais discutem os principais achados dos artigos

Documentos de apoio, incluindo o Projeto de Pesquisa estão apresentados nos anexos.

INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de DNA da família *Papillomaviridae* que foi descrito pela primeira vez em 1954 (Bibbo & Silva Filho, 1998; Dunne & Markowitz, 2006). De caráter predominantemente epiteliotrófico, o HPV está presente na pele e mucosa de muitos animais. Em humanos, mais de 100 tipos já foram descritos, sendo que 30 destes infectam as regiões genitais e mucosas (Maciag & Villa, 1999; de Araújo Souza & Villa, 2003).

Atualmente, o HPV é a infecção viral sexualmente transmissível mais freqüente, atingindo cerca de 10,0 a 12,0% das mulheres com vida sexualmente ativa (Naud, 1993; Carvalho & Oyakawa, 2000). Em relação às mulheres jovens, entre 20 e 29 anos, sua prevalência é ainda maior, de 20,0 a 40,0% (Naud, 1993).

Considerado o principal agente etiológico de lesões urogenitais tais como verrugas genitais, lesões planas e alterações estruturais no colo do útero, vagina, vulva e ânus, é também responsável pelo desenvolvimento da neoplasia cervical ou câncer do colo uterino (Hoory et al, 2008).

Os tipos virais são classificados em HPV de alto e baixo risco de acordo com a freqüência em que aparecem associados a processos cancerígenos, e, portanto, divididos de acordo com seu potencial oncogênico (Dunne & Markowitz, 2006). O grupo considerado de baixo risco inclui os tipos HPV 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73, os quais são encontrados, na maioria das vezes, em verrugas genitais, anogenitais e, parece não oferecer nenhum risco de progressão para a malignidade. O grupo que representa alto risco inclui os tipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68 e estão relacionados com o desenvolvimento de carcinoma cervical (Bibbo & Silva Filho, 1998; Vargas & Dalla Corte, 2002; Silva et al, 2006).

O câncer cervical é um problema de saúde pública muito importante em países em desenvolvimento, ocorrendo em torno de 80,0% dos casos diagnosticados. Além disso, são registrados mais de 300.000 casos incidentes por ano em todo o mundo (Hernandez-Girón et al, 2005; Hoory et al, 2006; Sinal & Woods, 2006).

Este câncer é um dos tumores malignos mais freqüentes na população feminina brasileira, superado apenas pelos cânceres de mama e de pele não-melanoma. Dados absolutos sobre incidência e mortalidade por câncer cervical do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimaram para

2008, 18.680 casos novos, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008).

Estima-se que a incidência em escala mundial esteja em torno de 500.000 casos por ano, sendo a patologia responsável por 15,0% de todas as neoplasias invasoras diagnosticadas em mulheres, e a segunda malignidade ginecológica mais freqüente no mundo (Fernandes et al, 2005; Song et al, 2008). Constitui-se um dos mais relevantes problemas de saúde pública, especialmente para os países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil, onde se estima que cerca de 40.000 casos novos surjam anualmente (Silva Silveira et al, 2005; Deshpande et al, 2005).

A implicação do HPV em praticamente todos os cânceres cervicais nos leva à investigação de outros fatores associados, pois o número de infecções é extremamente maior do que o número de casos de câncer cervical. Estudos epidemiológicos e moleculares têm sugerido que o HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões malignas na cérvix uterina (Muñoz, 2000; Maciag & Villa, 2003). O DNA deste vírus tem sido encontrado em 90,0% dos casos de mulheres com lesões cancerosas na cérvix uterina, com predominância do tipo HPV 16 sobre os demais tipos oncogênicos (Dunne & Markowitz, 2006).

Certamente, outros fatores associados também contribuem para a formação e progressão das lesões pré-malignas e do câncer cervical, uma vez que nem todas as mulheres infectadas pelo HPV de alto risco fatalmente desenvolverão câncer (Odunsi et al, 1995; Pinto et al, 2002; Horry et al, 2008; Song et al, 2008).

Vários estudos têm sugerido a possível influência de outros fatores associados ao HPV, para o desenvolvimento desta neoplasia. Dentre estes estão a idade da mulher, o uso de tabaco, a diversidade de parceiros sexuais, a freqüência de infecções genitais, o uso continuado de contraceptivo oral e o número de gestações ao longo da vida (Morrison et al, 1991; Syrjänen et al, 2006; Vaccarella et al, 2006; Steben & Duarte-Franco, 2007; Schiffman et al, 2007; Hoory et al, 2008).

A exposição ao fumo, mesmo sendo passiva, tem sido sugerida como fator relacionado a um aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical (Pinto et al, 2002; Schiffman et al, 2007; Song et al, 2008). A presença de substâncias carcinogênicas provenientes do cigarro na mucosa cervical tem sido descrita como possível explicação para essa associação epidemiológica.

Outros fatores restritos ao hospedeiro, tais como regulação hormonal, resposta imune e predisposição genética também têm sido relacionados ao câncer cervical (Burger et al, 1993; Prokopczyk et al, 1997; Calhoun et al, 2002; Scheurer et al, 2005).

A investigação de fatores genéticos ligados à imunidade é essencial para o entendimento das associações deste vírus com as células do hospedeiro. Estudos sugerem uma associação entre a atuação do vírus do HPV de alto risco no hospedeiro levando ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e de fatores imunológicos e genéticos que impeçam a ação viral (Maciag & Villa, 2000; Hildesheim & Wang, 2002; Machado et al, 2004).

Na genética médica, os marcadores têm uma ampla utilidade na avaliação da predisposição para diversos distúrbios, entre eles, o câncer cervical. Os polimorfismos têm relevância para seu uso como “marcadores” genéticos com o objetivo de distinguir diferentes formas hereditárias de um gene (Nussbaum et al, 2002; de Araújo Souza & Villa, 2003; Kirkpatrick et al, 2004; Farzaneh et al, 2006; Fernandes et al, 2008).

Nesse estudo será avaliada a influência genética dos polimorfismos (-1082A/G) e (-308 A/G) localizado nos genes da IL-10 e TNF- α , respectivamente, no desenvolvimento de lesões cervicais, visto que, estas citocinas são moléculas importantes na resposta imune contra infecções virais. Geneticamente determinadas, podem apresentar predomínio para padrão associado com a eliminação do HPV, ou associadas com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais (de Araújo Souza & Villa, 2003; Kirkpatrick et al, 2004; Farzaneh et al, 2006; Fernandes et al, 2008).

O conhecimento de polimorfismos relacionados à infecção por HPV e ao desenvolvimento de lesões cervicais pode auxiliar no entendimento da variabilidade genética das populações e no desenvolvimento de métodos de prevenção, como novas vacinas e de programas de vigilância epidemiológica para o controle das Doenças Sexualmente Infeciosas (DSI).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e são classificados, primeiramente, pela diferenciação (2,0% a 10,0%) na seqüência genética do gene L1 que codifica o capsídeo protéico viral (Muñoz, 2000; Okada et al, 2000; Finnen et al, 2003; Schiffman et al, 2007; Hoory et al, 2008).

Atualmente, mais de 100 tipos de HPV já foram identificados, sendo que 40 apresentam um tropismo pela região anogenital (Scheurer et al, 2005; Dunne & Markowitz, 2006). São considerados microorganismos que exibem uma relação com o hospedeiro altamente espécie-específico, sendo observadas similaridades na estrutura física e organização genômica (Scheurer et al, 2005; Dunne & Markowitz, 2006).

O vírus pode ser ainda classificado em mucoso ou cutâneo, baseado no tropismo celular (Janicek e Averette, 2001; Scheurer, 2005; Dunne, 2006). Entre os tipos cutâneos, destacam-se os HPV 5 e HPV 8, considerados de alto risco, pois estes estão intimamente relacionados com a epidermodisplasia verruciforme (EV), uma rara situação em que a pele sofre alterações ulcerosas, oportunizando a infecção pelo vírus, podendo ocasionar oncogênese humana (Janicek & Averette, 2001; Scheurer et al, 2005).

Os tipos virais mucosos são classificados em baixo e alto risco, conforme a sua associação com o câncer cervical (Scheurer et al, 2005; Dunne & Markowitz, 2006; Hoory et al, 2008). O HPV de baixo risco está relacionado, na maioria dos casos, com tumores benignos, lesões cutâneas leves e lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LG-SIL), também chamadas de lesões do tipo Neoplasias Intraepiteliais Cervicais de Grau I (NIC I) e *condiloma acuminatum*. São representados, principalmente, pelos HPVs 6, 11, mas outros tipos como HPV 26, 42, 43, 44, 54, 70 e 73 também são descritos na literatura (Okada et al, 2000; Muñoz, 2000; Scheurer et al, 2005; Dunne & Markowitz, 2006). Os HPVs 6 e 11 são responsáveis por mais de 90,0% dos casos de verrugas anogenitais (Schiffman et al, 2007; Hoory et al, 2008).

Os tipos de alto risco estão relacionados com neoplasia intraepitelial cervical de grau II e III (NICs II e III) que podem progredir para carcinomas de colo uterino (Campion et al, 1996; Sinal & Woods, 2005; Scheurer et al, 2005; Schiffman et al, 2007). Os principais tipos são representados

pelos HPV 16 e 18, seguidos pelos HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (Scheurer et al, 2005, Schiffman et al, 2007, Hoory et al, 2008).

Os tipos HPV 16 e 18 são os mais prevalentes e ocorrem em 70,0% dos casos de câncer cervical e 50,0% dos casos de NIC III (Smith et al, 2007; Schiffman et al, 2007; Hoory et al, 2008). O HPV 16 é descrito como o mais prevalente, seguido pelo HPV 18 e HPV 31, sendo que em algumas regiões, esta ordem de prevalência pode se modificar devido a características sócio-comportamentais e demográficas da população. Os tipos HPV 18, 16 e 31 estão relacionados ao câncer vulvar, peniano, carcinoma anal e carcinoma invasivo cervical (Hoory et al, 2008). Nos casos de câncer oral, mais de 20,0% dos casos apresentam pelo menos um tipo de HPV de alto risco (Gillison et al, 2000).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR HPV

O câncer cervical é um problema de saúde pública relevante no mundo, com mais de 500.000 casos novos por ano (Hernandez-Girón et al, 2005; Sinal & Woods, 2005; Hoory et al, 2008).

Aproximadamente, 20 milhões de pessoas estão atualmente infectadas pelo HPV no mundo. Pesquisadores estimam que entre 50,0 a 80,0% dos homens e mulheres sexualmente ativos adquirem a infecção genital por algum tipo de HPV e que, entre estes, 5,0% a 10,0% tornam-se infecções persistentes com tipos oncogênicos que podem progredir para o câncer cervical (Koutsky et al, 1997; Perez, 2001; Hernández-Girón et al, 2005; Baseman & Koutsky, 2005; Trottier & Franco, 2006; Schiffman et al, 2007; Bosch et al, 2008).

Segundo Dunne & Markowitz (2006), a infecção persistente por tipos oncogênicos é o fator mais importante para o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical.

Em todo o Brasil, a incidência e a mortalidade do câncer cervical apenas são superadas pelas taxas de câncer de mama, com 49.400 novos casos (50,7/100.000 mulheres), ocupando o quinto lugar em mortalidade na população total e o segundo entre as mulheres, com 18.680 novos casos (19,2/100.000 mulheres). No Rio Grande do Sul, as estimativas para 2008 incluíram 1.610 novos casos (28,2 /100.000) (INCA, 2008).

Nos países em desenvolvimento, o câncer cervical é a maior causa de mortes em mulheres em idade reprodutiva (Janicek & Averette, 2001; Dunne & Markowitz, 2006; Hoory et al, 2008).

Os tipos virais 16 e 18 estão presentes em cerca de 93,0% dos tumores malignos cervicais investigados em diferentes locais do mundo, demonstrando o importante papel desses tipos oncogênicos no desenvolvimento de neoplasias cervicais (Lorenzato et al, 2001; Scheurer et al, 2005; Dunne & Markowitz, 2006; Schiffman et al, 2007).

O HPV 16 é um dos tipos de alto risco mais freqüente entre as mulheres, e também o mais comum entre os casos de câncer cervical, com taxas de 23,4% nas mulheres, sendo ainda maior em adolescentes com idade média entre 16-20 anos (Ho et al, 1998; Liaw et al, 1999; Rabelo Santos et al, 2003). O HPV 18 apresenta uma prevalência de 7,3% em mulheres com idade em torno dos 16 anos e 7,2% em mulheres com idade ao redor de 25 anos (Baseman & Koutsk, 2005).

Laukkanen (2003), em seu estudo realizado em Helsinki, Finlândia, observou que entre os períodos de 1983-1985 e 1992-1994, a incidência de HPV 16 entre mulheres com 22 anos ou menos decresceu de 25/1000 pessoas-ano para 13/1000 pessoas-ano, porém houve um acréscimo para 31/1000 pessoas-ano durante 1995-1997. Já para mulheres com idade entre 23 e 31 anos, entre 1983-1985 e 1995-1997, a incidência da infecção por HPV-16 apresentou elevação, passando de 5/1000 para 13/1000 pessoas-ano.

Nos Estados Unidos, na década de 30, o câncer cervical foi a maior causa de morte por câncer. O teste de *Papanicolaou* (CP) e outros testes de rastreamento para HPV colaboraram para o diagnóstico precoce da infecção. Assim, a taxa de mortalidade por câncer cervical diminuiu muito no século XX (Janicek & Averette, 2001).

As infecções por HPV vêm aumentando de maneira significativa no mundo ocidental, sendo a infecção condilomatosa do colo uterino, a causa mais freqüente de alterações citológicas encontradas no exame preventivo. Estima-se que lesões por HPV representem 50,0% das atipias cervicais encontradas nos esfregaços sistemáticos (Santos et al, 2004).

Com relação ao Brasil, poucos estudos de prevalência de infecção pelo HPV têm sido realizados na Região Sul. Um levantamento epidemiológico com esse objetivo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA-HPV. Nesse estudo, foi possível verificar uma prevalência de 46,5% de infecção provocada por genótipos de HPV de alto risco (Fonseca et al, 1998; Nonnemacher et al, 2003).

Em um estudo de coorte realizado na zona norte de Porto Alegre, RS, Brasil, com amostras colhidas do colo uterino de 1500 mulheres usando a técnica de PCR, foi observada uma incidência de DNA-HPV de 28,4% (Igansi CN, 2005). Rosa et al (2008), para o mesmo estudo avaliou a regressão e a persistência da infecção pelo HPV em 501 mulheres, observando uma incidência de 12,3% e, dentro de uma média de 19 meses, a regressão dos casos de infecção foi de 80,7%.

Silva et al (2004), em seu estudo realizado em Minas Gerais, Brasil, mostraram que a incidência de HPV na população em geral é de 1,0 a 8,0%. Acredita-se que num período de 10 anos, mais da metade das mulheres com vida sexual ativa adquire, pelo menos, uma infecção por HPV. A infecção por HPV é mais freqüente em jovens, estando o pico na faixa etária entre 20 e 24 anos.

Tábora et al (2005), em um estudo realizado em Tegucigalpa, Honduras, observou que 50,0% das mulheres contraem HPV antes de completar 2 anos do início de sua vida sexual, e o risco estimado para contrair o vírus é de 80,0%. No entanto, somente um pequeno número de mulheres irá desenvolver câncer cervical.

1.3. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV

1.3.1. Organização e Expressão Gênica Viral

O vírus do HPV apresenta um capsídeo icosaédrico, não revestido por envelope lipídico, com 72 capsômeros e 55 nm de diâmetro, onde se encontra o DNA de dupla fita, em disposição circular com aproximadamente 8 kb (8.000pb), que codifica um total de 10 proteínas (Finnen et al, 2003; Sinal & Woods, 2005; Scheurer et al, 2005; Dunne & Markowitz, 2006) (Figura 1).

Cada genótipo viral é considerado único e existem diferenças entre as seqüências de bases nitrogenadas observadas em algumas regiões deste vírus os quais são classificados em subtipos específicos de acordo com estas seqüências. O vírus deverá ser classificado como sendo um tipo diferente se ele possuir mais que 10,0% de bases em sua seqüência diferentes da seqüência de qualquer outro tipo existente (Salvia et al, 2004). Estas diferenças conferem especificidade em relação ao comportamento biológico viral de cada tipo (Salvia et al, 2004).

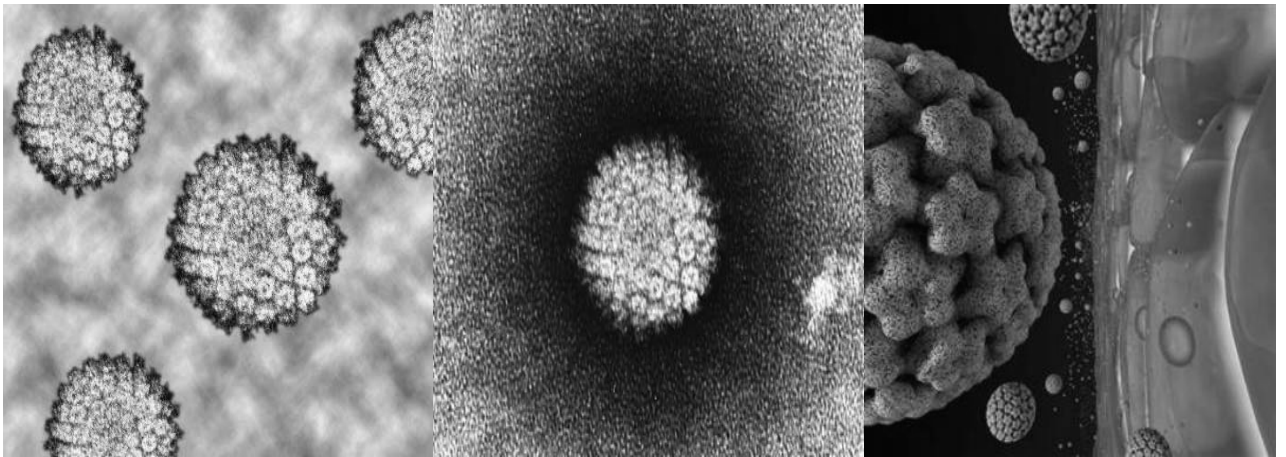


Figura 1. Representação do capsídeo viral de HPV. O vírus do HPV apresenta um capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros, onde se encontra o DNA de dupla fita, em disposição circular, e 55 nm de diâmetro (Münger et al, 2004) (<http://jornalmourinho.files.wordpress.com/2008/04/hpv1.jpg>) ([http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Papilloma_Virus_\(HPV\)_EM.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Papilloma_Virus_(HPV)_EM.jpg))

O genoma está organizado em três regiões principais, conhecidas como região precoce (*Early Region*), tardia (*Late Region*) e região controladora (*Long Control Region*) (Burd, 2003) (Figura 2).

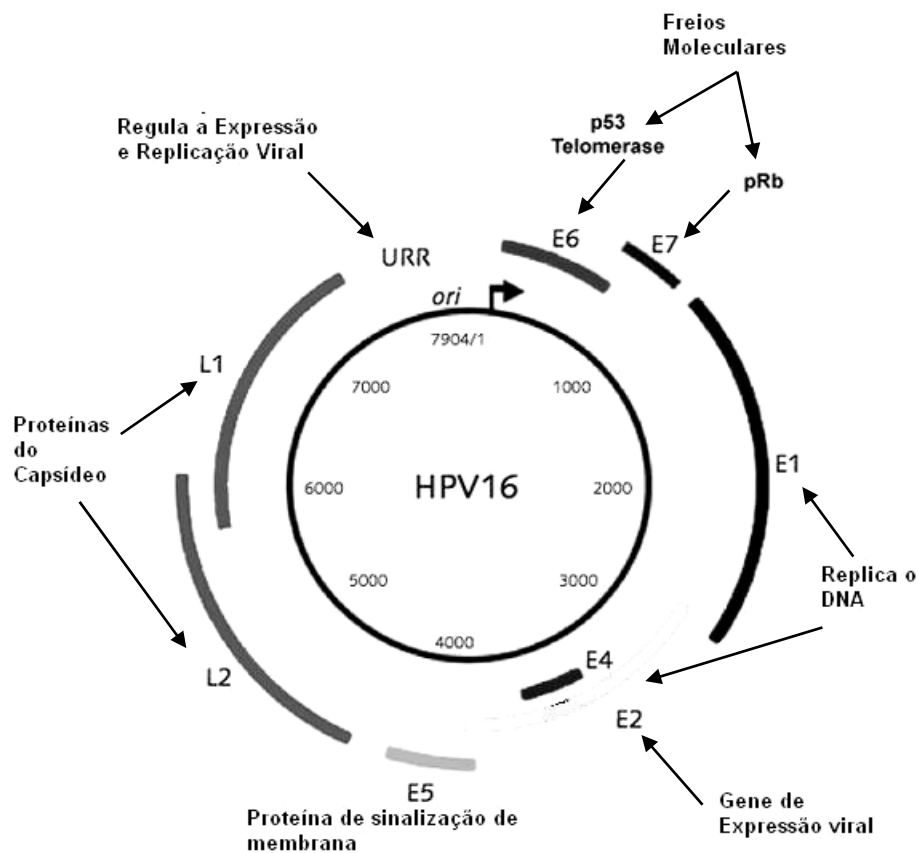


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR) (Fonte: www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html)

O genoma possui oito regiões conhecidas como ORFS (*Open Reading Frames*), um complexo de proteínas funcionais codificadas pelos genes precoces e tardios (Scheurer et al, 2005). A região precoce contém vários genes (*E1, E2, E4, E5, E6 e E7*) envolvidos na replicação e transcrição viral durante o estado epissomal (DNA viral não integrado ao genoma hospedeiro), e estes são expressos imediatamente após a infecção da célula hospedeira pelo vírus (Chan et al, 1995; Howley 1996; Schiffman et al, 2007; Scheurer et al, 2005; Hoory et al, 2008).

A região tardia (*Late Region*) contém os genes que serão expressos tardiamente após a infecção viral e está dividida em duas estruturas de leitura aberta (ORFS), a *L1* e *L2* (Munger, 2004; Scheurer et al, 2005).

A estrutura *L1* é a maior porção da região codificadora tardia responsável pela formação do cápsideo viral; a *L2* é a porção menor, responsável pelo empacotamento do DNA viral com os outros produtos dos genes. A expressão dos genes da região codificadora inicial controla a replicação, transcrição e transformação celular do DNA viral e, adicionalmente, apresenta um papel na proliferação celular não controlada (Howley, 1996; Burd, 2003; Münger, 2004; Scheurer et al, 2005).

A região controladora (*LCR*) possui a origem de replicação, compreende cerca de 10,0% do genoma e contém elementos do controle que interagem com proteínas celulares (Alani & Münger, 1998; Moodley et al, 2003).

As regiões *E1* e *E2* codificam proteínas essenciais para a replicação do DNA extracromossomal e para o desenvolvimento completo do ciclo viral. Os produtos do gene *E2* do HPV não atuam apenas na transcrição viral, mas é também a região mais significativa para a integração do HPV no genoma do hospedeiro. Como resultado, a função reguladora normal do *E2* é perdida, resultando na expressão exagerada das oncoproteínas *E6* e *E7* (Münger et al, 1991; Motoyama et al, 2004; Scheurer et al, 2005).

A proteína *E4* é expressa nos estágios tardios da infecção quando os vírions estão sendo formados, mas não apresentam propriedades de transformação; no entanto, desempenham um importante papel na maturação e replicação do vírus (Motoyama et al, 2004).

Com relação a *E5*, esta é uma proteína hidrofóbica associada à membrana que regula o receptor de crescimento da epiderme, resultando na estimulação de crescimento celular (Scheurer et

al, 2005; Tsai & Chen, 2003). Segundo Tsai & Chen (2003), a proteína E5 também está relacionada com a inibição da expressão do gene supressor de tumor p21, afetando o controle do ciclo celular.

Nos casos de carcinoma cervical, a região E5 é freqüentemente deletada das células, indicando que este gene não é essencial na manutenção da transformação maligna das células hospedeiras (Motoyama et al, 2004).

Por outro lado, os genes E6 e E7 codificam, além dos produtos para a replicação viral, oncoproteínas que têm um papel fundamental na imortalização e transformação da célula hospedeira. As proteínas virais E6 e E7, produzidas pelo HPV de tipos de risco elevado, são críticas para a transformação maligna devido à sua capacidade de se ligar e inativar as proteínas celulares codificadas pelos genes supressores tumorais p53 e retinoblastoma (Rb) do hospedeiro, respectivamente. A capacidade de ligação destas proteínas produzidas pelo HPV dos tipos de risco elevado é muito maior do que a observada para aqueles de tipos de risco baixo (Münger et al, 1991; Motoyama et al, 2004; Scheurer et al, 2005).

A função da proteína p53 é preservar a integridade do genoma celular, através do controle da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular durante a qual ocorre a replicação do DNA e da apoptose celular (Ullrich et al, 1992; Scheurer et al, 2005).

A oncoproteína E6 inativa a proteína p53 por aumento de sua degradação. Assim, as células que expressam esta oncoproteína demonstram uma instabilidade cromossômica, progressão aberrante do ciclo celular e resistência à apoptose, além de alterações que aumentam de maneira dramática a probabilidade de transformação maligna das células infectadas pelo HPV (Scheurer et al, 2005).

Adicionalmente, a interação da oncoproteína E6 com outras proteínas da célula hospedeira, que estão envolvidas na expressão gênica transcricional, na adesividade celular, transdução, supressão tumoral e regulação da telomerase, contribui para a imortalização celular e progressão tumoral (Villa LL, 1997; Nishimura et al, 2000; Veldman et al, 2002; Altiock, 2003).

Nas células infectadas pelo HPV de alto risco, a oncoproteína E7 interage com a proteína Rb, liberando o E2, o qual estimula a transcrição dos genes E2, permitindo a replicação do DNA e alterando desta maneira o mecanismo de controle do crescimento celular (Scheurer et al, 2005). Adicionalmente, a oncoproteína E7 induz a divisão celular, resultando em um número aberrante de centrôsomos, o que contribui para a transformação maligna (Duensing et al, 2003; Altiock, 2003).

Deste modo, como discutido acima, este parece ser o componente central do processo de transformação maligna das células do colo uterino. A instabilidade genética resultante pode permitir, através de co-fatores adicionais ou de mutações ao acaso, um aumento da lesão celular, promovendo a transição de uma infecção assintomática para a displasia e o carcinoma (Duensing et al, 2003; Fehrmann & Laimins, 2003; Pan et al, 2003).

1.3.2. Integração Viral

O câncer é o resultado de um acúmulo de eventos que interferem nas funções essenciais da célula, processo este que pode durar longos períodos de tempo (Villa, 1997; Graham et al, 2000).

A característica mais específica do HPV é que na maioria dos tumores benignos, como verrugas anogenitais, o genoma viral é preservado como DNA episossomal (Yu et al, 2005).

Já a integração do DNA-HPV está relacionada ao aumento da expressão gênica viral e ao crescimento celular, sendo esta forma muito observada em casos de câncer cervical e lesões pré-cancerosas, como as neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) (Yu et al, 2005).

Segundo Gallo et al (2003), o fenômeno da integração é considerado um importante mecanismo para a progressão de tumor na cérvix uterina, sendo uma característica importante observada nestes tumores as elevadas taxas de carga viral.

A entrada do vírus HPV nas células hospedeiras pode ser compreendida através de três eventos: (1) o DNA do vírus HPV é mantido sob a forma episossomal, estabelecendo uma infecção latente; (2) ocorre a conversão da infecção latente para infecção produtiva, associada à completa formação dos vírions; (3) o DNA viral é integrado no genoma hospedeiro (Steben & Duarte-Franco, 2007).

É conhecido, atualmente, que a integração do DNA viral de HPV no genoma hospedeiro e a subsequente expressão das oncoproteínas E6 e E7 representam dois mecanismos de progressão de lesões pré-invasivas para o carcinoma cervical. A integração de seqüências genômicas virais pode ocasionar deleções e/ou ruptura do gene E2, resultando na perda de sua função como regulador da expressão gênica viral. Este evento é freqüentemente seguido pela super estimulação da transcrição dos genes E6 e E7, que descontrolam o ciclo celular através da interação com diferentes proteínas celulares, como por exemplo, os produtos do gene supressor de tumor (p53) e a proteína

retinoblastoma (Rb), induzindo a transformação e a imortalização de células infectadas pelo HPV (Steben & Duarte-Franco, 2007).

Vários estudos têm demonstrado a presença de genomas integrados de HPV 16 e 18 em um número vasto de casos de câncer e em linhagens celulares isolados de lesões cervicais, considerando o fenômeno da integração o maior evento que favorece a transformação maligna do epitélio cervical displásico. Porém, este dado ainda é discutido, pois há alguns estudos que reportam somente a presença de formas episomais do HPV 16 em lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas (Steben & Duarte-Franco, 2007).

Matsukura et al (1989) detectou formas episomais de HPV 16 no epitélio cervical infectado, sendo esta forma presente em 70,0% dos casos de lesões cervicais. Similarmente, Fuchs et al (1989) e Das et al (1992) reportaram a presença do DNA HPV 16 em mais de 30,0% dos carcinomas cervicais, e novamente, o DNA viral era exclusivamente na forma episomal.

Tecidos cancerosos podem conter tanto o DNA integrado quanto o episomal ao mesmo tempo, sendo que a integração ocorre com maior frequência em câncer cervical associado à infecção por HPV 18 (Morrison et al, 1991).

No estudo realizado por Yu et al (2005), a maioria das integrações são ocasionadas pelo HPV-16 e HPV-18, todas dentro de sítios comuns e frágeis do genoma. Segundo Graham et al (2000), o local da integração viral comumente está na ORF de E2 ou próximo dela, a qual regula a manifestação de E6 e E7. Com a perda da regulação, E6 e E7 podem fornecer às células um fenótipo maligno. Além disso, no mesmo estudo foi encontrado um número significativo de regiões cromossomais que apresentavam múltiplos HPV integrados e muitos genes relacionados ao câncer ao redor destes sítios de integração. Segundo o autor, as integrações dentro de sítios frágeis são frequentemente associadas a alterações grosseiras e deleções de mais de cem quilobases no genoma, comprometendo o funcionamento das atividades celulares (Yu et al, 2005).

Os sítios frágeis comuns de integração são regiões de profunda instabilidade que se expandem de muitos quilobases para mais de nove megabases. Estes sítios têm sido observados quando ocorrem deleções, translocações e ampliações de genes encontrados em células tumorais (Yu et al, 2005).

A integração está frequentemente associada ao remodelamento do genoma viral, bem como do sítio de integração no genoma hospedeiro (Yu et al, 2005).

1.3.3. Carga Viral de HPV

A carga viral de HPV, em conjunto com o tipo viral, pode influenciar na história natural da infecção por HPV (Dalstein et al, 2003; Schlecht et al, 2003; Scheurer et al, 2005).

Diversos estudos têm sugerido a carga viral como um fator de risco para a infecção persistente e progressão de neoplasia cervical (Brisson et al, 1996; Josefsson et al, 2000; Dalstein et al, 2003; Schlecht et al, 2003; Golijow et al, 2005). Entretanto, esta evidência ainda não está claramente elucidada, e a sua real contribuição como marcador da existência de infecção persistente e desenvolvimento de lesões mais severas permanece desconhecida.

Alguns pesquisadores têm relacionado a alta carga viral com lesões cervicais de alto grau (NIC II e III) (Brisson et al, 1996; Swan et al, 1999; Ylitalo et al, 2000; Josefsson et al, 2000; da Silva et al, 2006; Hernandez-Girón et al, 2005); mas em outros estudos, há evidências de que a carga viral seja um excelente preditor para as lesões de baixo grau (ASC-US e NIC I), sugestionando apenas o início da progressão destas lesões para alto grau (Brisson et al, 1996; Lorincz et al, 2002; Schlecht et al, 2003).

Gravitt et al (2003) demonstrou que a carga viral apresenta importante papel na detecção de lesões severas do colo uterino em mulheres com colpo-citologia apresentando células escamosas atípicas ou sugestivas de lesões escamosas de baixo grau.

Segundo Santos et al (2003), em seu estudo sobre carga viral como fator preditivo de NIC, a alta carga viral foi significativa em mulheres com lesões de alto grau (NIC II e III).

Josefsson et al (2000) e Ylitalo et al (2000) também sugerem que altas cargas virais em epitélio citologicamente normal são consideradas um fator de risco para a progressão de neoplasias.

Sun et al (2002) em seu estudo sobre a importância da carga viral de HPV de alto risco em lesões intraepiteliais escamosas cervicais encontrou dados que revelam que as mulheres infectadas com elevada carga viral apresentavam maiores chances de desenvolver câncer invasivo do que as mulheres infectadas com baixa carga viral (RC=19,6%; IC=4,0-96,8). Estes resultados reforçam o fato de que a infecção por altas cargas virais aumenta o risco de persistência e futura progressão para lesões severas do colo uterino.

A carga viral pode aumentar gradativamente conforme a gravidade da lesão, porém não são todos os tipos oncogênicos de HPV que apresentam esta associação. Swan et al (1999) sugere que

há uma associação específica e genotípica da carga viral de HPV e a progressão neoplásica. Em seu estudo, mulheres com lesões tipo NIC II e III apresentavam até seis mil vezes mais a quantidades de partículas de HPV 16 com relação à quantificação de HPV 18, 31 e 45 em mulheres positivas e com o mesmo tipo de lesão. Entretanto, alguns estudos na Europa e na América do Norte não encontraram associação entre a carga viral e a gravidade da lesão (Maciag et al, 2000; Nussbaum et al, 2002).

Já ao comparar mulheres com HPV 16 citologicamente alteradas e normais, foi possível verificar que a carga viral encontrada na citologia alterada foi trinta vezes superior à citologia normal (Prokopczyk et al, 1997; Fernandes et al, 2008).

1.3.4. Ciclo Fisiopatológico do HPV e Manifestações Clínicas

O HPV é um organismo intracelular obrigatório, caracterizado como epiteliotrópico, infectando células basais em fase mitótica ativa, através de microtraumas (Münger et al, 2004). Após a infecção, inicia o ciclo viral, coordenado por fatores que regulam a resposta imunológica do hospedeiro (Münger et al, 2004).

Os estados físicos do DNA viral apresentam-se diferenciados nas lesões benignas e malignas. Nas primeiras, está presente na forma episomal e em múltiplas cópias. Nas lesões malignas, integra-se ao genoma da célula hospedeira, formando uma ligação estável e tornando-se dependente do ciclo celular hospedeiro (Dias, 1993; Gil, 1998).

A maioria dos casos de câncer cervical ocorre na zona de transformação. Nesta região há o encontro do epitélio colunar da endocérvice com o epitélio estratificado escamoso da exocérvice. Neste ponto de encontro dos dois tipos de epitélio ocorre proliferação constante de células, facilitando a entrada do vírus no genoma da célula hospedeira (Hoory et al, 2008).

Segundo Hoory et al (2008), mais de 85,0% dos casos de câncer cervical são escamosos e uma pequena proporção, adenocarcinomas.

No evento da carcinogênese, há uma integração do genoma viral em sítios cromossomais, ocorrendo em lugares frágeis do genoma humano, porém não há evidências de locais específicos para esta integração (Thorland et al, 2003; Ziegert et al, 2003). Há estudos que demonstram relações importantes entre as proteínas virais E1 e E2 e a formação de tumores (Janicek & Averette, 2001; Münger et al, 2004). O resultado da integração do vírus é a imortalização das células em que o HPV foi integrado (Ferenczy & Winkler, 1993; Ferenczy, 1995). Tais células exibem morfologicamente

figuras de mitoses anormais, pleomorfismo nuclear, valores de DNA aneuploides, consistentes com número cromossomal anormal e alteração arquitetural dos cromossomos.

A infecção aguda causada pelo HPV ocorre quando não há integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira (Dunne & Markowitz, 2006; Hoory et al, 2008).

O vírus penetra inicialmente nas células da camada basal do epitélio através de microlacerações e sofre maturação à medida que progride através das camadas para-basal, espinhosa e granular. Uma vez presente na camada granular do epitélio, observa-se a replicação do DNA viral, a síntese das proteínas tardias e, finalmente, a formação das partículas virais (Perez, 2001; Carvalho e Oyakawa, 2000) (Figura 3).

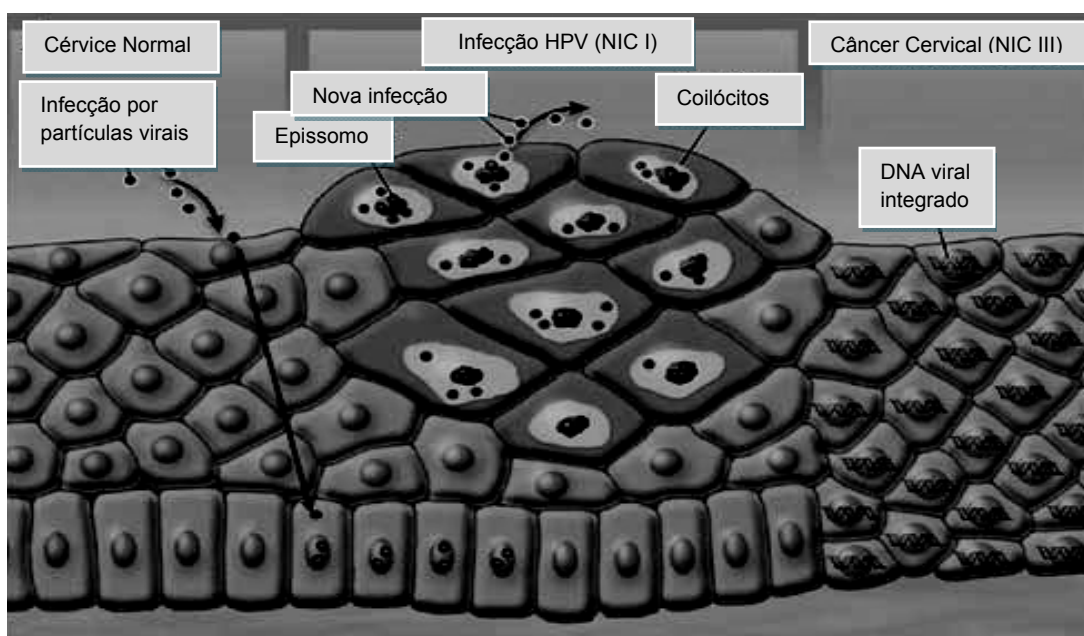


Figura 3. Representação esquemática da infecção viral na célula normal: formação de coilócitos, NIC I e NIC III (Fonte: www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html).

Os primeiros sinais de transcrição do genoma viral aparecem cerca de quatro semanas após a infecção (Chang, 1990). O período de incubação pode variar de três a 18 meses e a persistência das lesões pode ser avaliada em semanas, meses ou anos. Essa variação parece estar mais relacionada com particularidades do hospedeiro que do vírus, a partir do que é observado em pacientes com imunodeficiências que parecem ser portadores de lesões mais exuberantes e persistentes (Myint & Shaw, 1995).

A manutenção do estado epissomal não replicativo do DNA viral, que corresponde ao estado de infecção latente, pode depender da expressão dos ORF E2 (Bauer et al, 1993). Na infecção

produtiva as células da camada basal da epiderme, que têm a capacidade de se replicar, sofrem aumento da taxa de proliferação, possivelmente pela combinação dos efeitos das proteínas expressas pelos ORF E5 (age com receptores de fator de crescimento epidérmico), E6 (integrada à proteína p53) e E7 (integrada à proteína Rb) (Bauer et al, 1993).

À medida que a célula se diferencia, há maior produção de antígenos e replicação viral nas células superficiais, de modo que a quantidade de DNA aumenta em direção à superfície do epitélio (Figura 4) (Chang, 1990; Ferenczy, 1995). Durante esse processo há acúmulo tanto de proteínas do genoma quanto de proteínas estruturais relacionadas ao capsídeo. As partículas virais são liberadas por interferência da proteína codificada a partir do gene E4 que desestabiliza a trama de ceratina intracelular (Chang, 1990). A vacuolização característica da célula pode ser resultado do colapso da citoceratina que interage com proteínas transcritas em ceratinócitos com diferenciação terminal a partir de E4 (Miller et al, 1986; Nigro et al, 1989; Holstein et al, 1991; Vogelstein & Kinzler, 1992; Myint & Shaw, 1995).

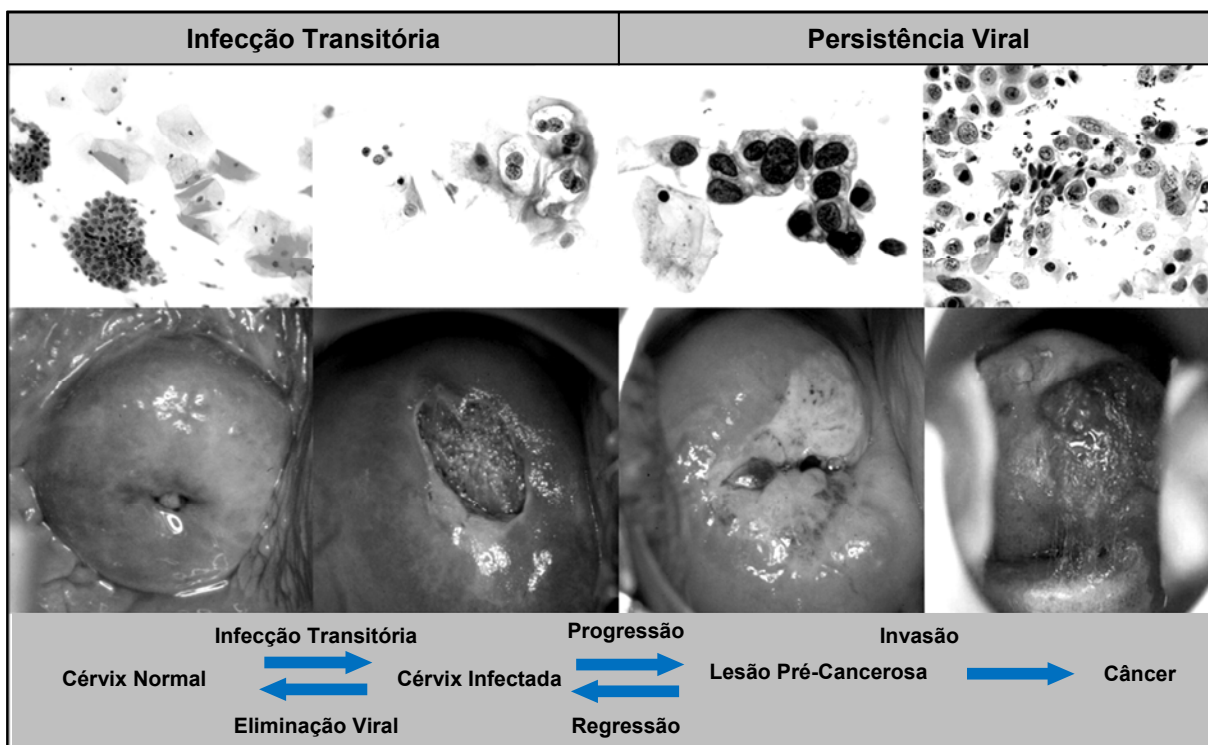


Figura 4. Etapas do desenvolvimento do câncer cervical, visualizados do exame citológico ao colposcópico. A maioria das infecções virais não apresenta anormalidades citológicas (Adaptado de Schiffman et al, 2007).

As manifestações clínicas causadas pela infecção viral podem ser caracterizadas como Infecção Transitória, Clínica, Latente e Persistente (Villa, 1997).

Na infecção transitória ocorre eliminação do genoma viral, através dos processos de apoptose, e a maioria das mulheres fica livre do vírus.

A infecção clínica é caracterizada pelas partículas virais intactas que são formadas através de replicação vegetativa do genoma do HPV e se manifesta através da proliferação das células do epitélio escamoso, o que determina a formação de tumores benignos (verrugas genitais e condiloma).

O condiloma acuminado manifesta-se como lesão verrucosa, com superfície granulosa, freqüentemente múltipla, da cor da pele, eritematosa ou hiperpigmentada, lesões grandes com aspecto de "couve-flor" e as menores com aspecto de pápula, placa ou ainda filiformes. No homem, as localizações preferenciais são na glande, frênulo, corona e prepúcio e nas mulheres, na parte posterior do intróito vaginal, lábio menor, clitóris e lábio maior, áreas mais susceptíveis a microtraumas durante o ato sexual (Jenson et al, 1987; Fisher SG, 1994; Villa, 1997; Franco et al, 1999; Russomano et al, 2000).

Podem ser observadas ainda lesões no meato uretral e na região perianal. Nos casos de lesão uretral, pode haver prurido, queimação, sangramento e obstrução (Figura 5) (Franco et al, 1999).

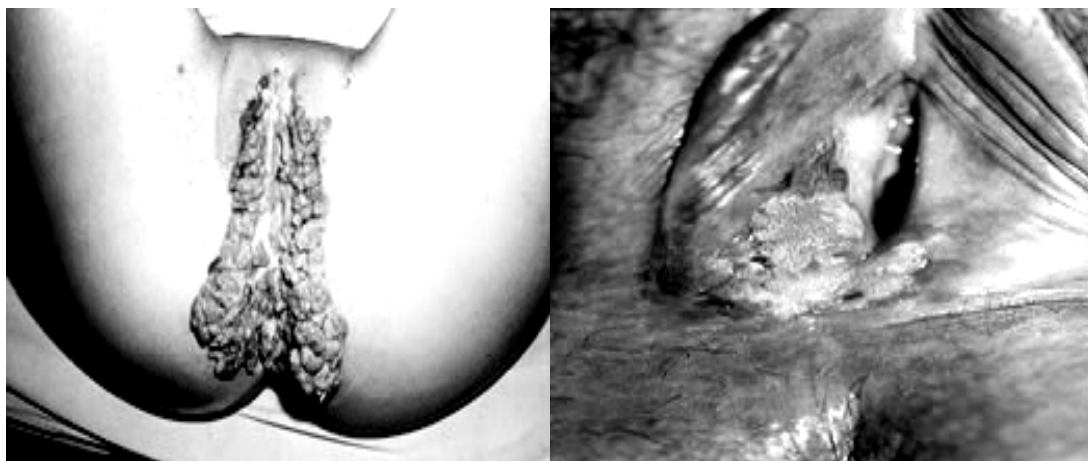


Figura 5. Verrugas genitais na região vulvar ocasionadas pela infecção viral.

(<http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/condiloma-acuminado/imagens/condiloma-16.jpg>)

As verrugas nas mãos e nos pés apresentam um período de incubação de 6 a 8 meses, e as verrugas genitais apresentam um período de incubação de 2 a 6 meses (Carvalho & Oyakawa, 2000).

A infecção latente representa a fase durante o período de incubação do vírus, que pode se estender indefinidamente, bem como a fase final da regressão da lesão. Morfologicamente, os ceratinócitos infectados são normais, apresentando DNA viral no núcleo das células basais infectadas (Cason et al, 1995). Nessa forma da infecção, o DNA viral é diagnosticado no trato genital feminino por técnicas moleculares, não existindo evidências clínicas, citológicas, colposcópicas ou histológicas dessa infecção (Richart & Wright, 1991).

Nessa forma da infecção, o DNA viral encontra-se na forma epissomal, aparentemente não-funcional e replica-se apenas uma vez a cada ciclo celular, o que seria menos que o número de cópias virais necessário para o diagnóstico molecular pelos métodos mais antigos, como a hibridização *in situ*.

Como o vírus não se encontra funcionando nessa forma de infecção, não existem alterações citológicas decorrentes de sua presença (Wright et al, 1992).

Atualmente, ainda não são bem conhecidos os mecanismos pelos quais o HPV permanece nesse estado em vez de estabelecer infecção persistente, na qual seriam observadas as alterações citológicas ou teciduais. Provavelmente, fatores imunológicos são determinantes dessa condição (Wright TC et al, 1992).

Seu significado biológico é desconhecido e não se sabe quanto tempo o vírus pode permanecer nesse estado nem quantos casos progredem dessa forma de infecção para as demais. Segundo Ferenczy, a presença do HPV em tecidos normais seria responsável pela recorrência de lesões apesar dos tratamentos (Ferenczy & Winkler, 1993).

Quando o genoma do HPV sofre replicação e expressão, podendo ser integrado ao genoma do hospedeiro, tem-se caracterizada a infecção persistente. A integração viral resulta na perda do controle que as oncoproteínas ou os supressores tumorais críticos exercem sobre a proliferação celular determinando o desenvolvimento de lesões cancerosas (Dunne & Markowitz, 2006; Hoory et al, 2008) (Figura 6).

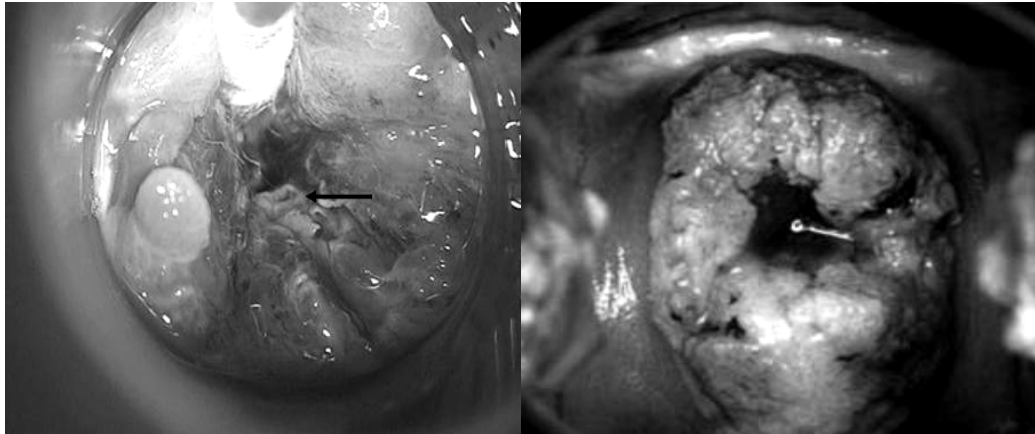


Figura 6. Câncer anal e cervical em mulheres com infecção por HPV (da esquerda para a direita (<http://embryology.med.unsw.edu.au/wwwhuman/MCycle/images/cervicalcancer.jpg>))

Uma série de lesões se modifica no decorrer de um período de tempo, acompanhado de progressão maligna destas lesões para carcinomas celulares escamosos (Hoory et al, 2008). A maioria das lesões tende a regredir espontaneamente. De fato, a probabilidade de resolução é considerada alta quando a lesão é de baixa severidade, embora isto decresça com o aumento da severidade da displasia (Figura 7).

Geralmente, as lesões severas se formam a partir de lesões displásicas que persistem por muitos anos (Liaw et al, 1999; Josefsson et al, 2000; Hoory et al, 2008).

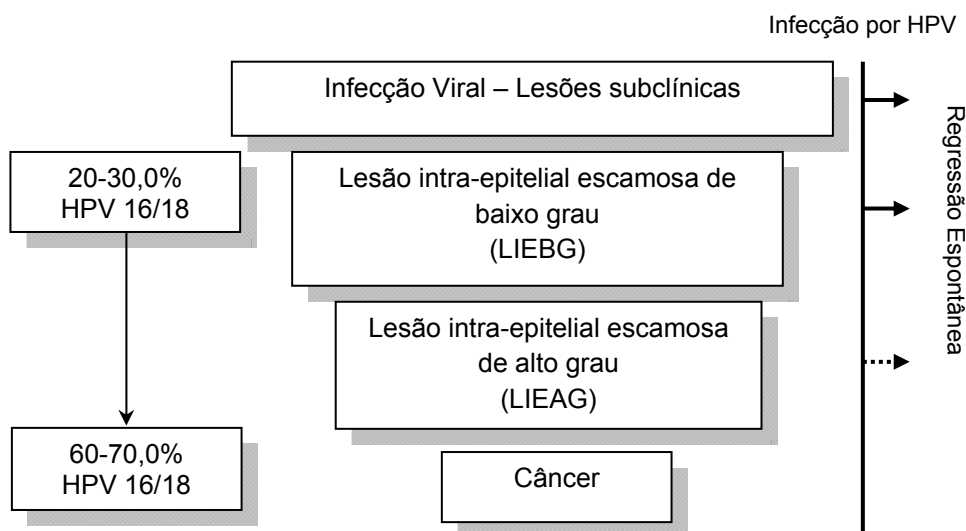


Figura 7. História natural de infecção cervical por HPV. A maioria das lesões intra-epiteliais de baixo grau (LGSIL) regredem espontaneamente, bem como poucas lesões intra-epiteliais de alto grau (HGSIL). Como a infecção progride de LGSIL a HGSIL, uma alta percentagem de casos está associada com HPV 16 e 18 (Adaptado de Hoory et al, 2008).

1.3.5. Vias de Transmissão e Aquisição do Vírus HPV

As infecções anogenitais por HPV são transmitidas comumente pelo contato pele-pele ou mucosa-mucosa (Burchell et al, 2006). Os mecanismos de infecção viral pelo ato sexual não apresentam diferenças entre os tipos de HPV e, também ainda não estão completamente elucidados, apesar de ser considerado um via de elevado poder de transmissibilidade (Burchell et al, 2006).

Devido a sua rota comum de transmissão, diversos tipos de HPV podem ser disseminados concomitantemente, resultando em uma alta proporção (20-30,0%) de infecções com diferentes tipos virais (Herrero et al, 2005). Homens também frequentemente são infectados por muitos tipos virais, sugerindo que o ato sexual possa ser considerado fonte de transmissão concomitante de tipos virais diferentes, de uma única vez (Schiffman et al, 2007).

Segundo Wright et al (2003), a infecção por HPV por si só não é suficiente para levar a uma transformação maligna, sendo que a história natural das mulheres com diagnóstico de lesões precursoras de baixo grau é caracterizada por regressão espontânea e apenas pequena percentagem persiste e evolui para câncer.

O risco de aquisição do vírus HPV é fortemente influenciado pela conduta na atividade sexual, como o número elevado de parceiros sexuais durante a vida, a idade em que ocorre a primeira relação sexual e o comportamento sexual dos parceiros sexuais masculinos (Wellings et al, 1994; Franco et al, 2001).

O sexo oral também pode levar à transmissão do vírus e ao conseqüente aparecimento de lesão (Ford et al, 2003). Existem estudos que indicam que a auto-inoculação ou transmissão através de objetos de uso diário também é possível (Gross & Barrasso, 1999; Perez, 2001).

Na forma de transmissão não-sexual, lesões verrucosas comuns da pele podem ser transmitidas por inoculação no próprio indivíduo ou em outro, através de fomites (coçaduras, toalhas, roupas íntimas e saunas coletivas). Vale ressaltar que este vírus tem preferência pelas células dos epitélios escamosos, sendo que através de microlacerações o vírus é inoculado e invade células da camada basal. Embora não se saiba por quanto tempo o vírus resista fora do organismo, considera-se a que a infecção por fomites seja viável por um curto período de tempo, e que mulheres e crianças sem atividade sexual também são considerados alvos para o desenvolvimento da infecção (Gross & Barrasso, 1999).

Já a transmissão materno-fetal pode ocorrer através do canal do parto (Tseng et al, 1998; Zoundi-Ouango et al, 2006). Em geral, durante a gestação as mulheres se tornam imunologicamente deprimidas e podem desenvolver lesões graves, por vezes de difícil tratamento, que podem regredir após o parto. Neste caso, o parto normal é contra-indicado. A inoculação acidental também é possível, ou seja, a manipulação das crianças pela mãe ou outro indivíduo com lesões verrucosas pode levar ao aparecimento de tais lesões (Gross & Barrasso, 1999).

1.3.6. Diagnóstico Clínico e Laboratorial

Como forma de auxiliar em um correto diagnóstico de lesões precursoras do câncer cervical e posterior tratamento da doença, o *screening* é uma das principais medidas adotadas, incluindo a triagem de resultados equivocados (falsos negativos e positivos) colposcopia seguida de biópsia para alterações celulares, acompanhamento no tratamento e investigação da mulher (Wright & Schiffman, 2003; Solomon et al, 2007).

O diagnóstico do vírus HPV pode ser feito através de exames colpocitológico e histológico. São exames que detectam com sensibilidade razoável (80%) a infecção pelo HPV, tornando-se possível evidenciar lesões ou neoplasias intra-epiteliais ou carcinomas do trato genital (Shyu et al, 2001).

A histologia permite a identificação de neoplasia intra-epitelial, a qual pode estar associada a infecções virais potencialmente oncogênicas e que são de risco para a progressão do câncer. Entretanto, a histologia não permite a predição do tipo viral associado ao efeito citopático. A interpretação histológica é difícil quando existem alterações mínimas associadas ao vírus, não permitindo a identificação da infecção latente.

O diagnóstico definitivo ou de certeza é feito através de biópsia da lesão suspeita. Além desses exames, existem métodos diagnósticos utilizando técnicas de biologia molecular como hibridização *in situ*, captura híbrida, PCR e o exame imunohistoquímico que podem auxiliar no diagnóstico clínico e terapêutico, principalmente nos casos de citologia indeterminada e lesões colposcópicas ou peniscópicas que mostrem alterações sugestivas da infecção viral, sem evidências de neoplasia intraepitelial já desenvolvida (Kaufman et al, 2000; Kino et al, 2000).

Segundo estudos, técnicas moleculares para a detecção de HPV têm sido desenvolvidas e introduzidas para melhorar a eficiência e maximizar a sensibilidade do rastreamento do câncer cervical. Atualmente há evidências de que os testes padronizados para a detecção de DNA viral são

mais efetivos e sensíveis para o diagnóstico de lesões pré-cancerosas em mulheres com citologia equivocada; porém, menos específico que métodos baseados na citologia líquida para o rastreamento de lesões primárias (Arbyn et al, 2004; Arbyn et al, 2006; Kulasingam et al, 2006).

Este fato sugere que os métodos moleculares possam ser utilizados juntamente com o diagnóstico convencional, o exame *Papanicolaou*, conduzindo o profissional a um parecer médico correto e, resultados clínicos duvidosos podem ser esclarecidos, encaminhando a paciente a uma conduta terapêutica menos invasiva e mais eficiente (Cuzick et al, 2003; Ronco et al, 2006; Walker et al, 2006; Kreimer et al, 2006).

1.3.7. Prevenção e Tratamento

A infecção pelo HPV é considerada um grave problema de saúde pública. Medidas de prevenção geralmente permitem a intervenção em diferentes aspectos na história natural da infecção viral: (i) antes que a infecção ocorra; (ii) após instalada a infecção, mas antes da ocorrência da doença clínica e, (iii) após o desenvolvimento de lesões clínicas.

A prevenção primária tem como objetivos a minimização ou a remoção dos fatores de risco antes mesmo que a infecção favorece o surgimento da doença. No caso da infecção pelo HPV, estas medidas incluem modificações no comportamento sexual e no uso de vacinas profiláticas (Scheurer et al, 2005).

As promoções de programas educacionais que promovem abstinência, uso consciente do preservativo, ou ambos, podem auxiliar na redução do risco de incidência de câncer cervical (Shepherd et al, 2000; Schiffman et al, 2005; Scheurer et al, 2005). Entretanto, a abstinência mútua de relações sexuais não é praticada pela população em geral, e o uso de preservativos não protege por completo os parceiros contra a contaminação pelo vírus, pois a região anogenital do parceiro masculino não é totalmente protegida pelos métodos usuais (Winer et al, 2006). Ainda, estudos sugerem que o uso concomitante de espermicidas e preservativos auxiliaria na remoção do vírus (Wright et al, 2003; Kyrgiou et al, 2006); porém, novas evidências têm demonstrado que o papilomavírus bovino possa não ser inativado pelo nonoxynol-9 (espermicida) (Cox, 1999).

Muitas pesquisas não mostraram associação entre o uso de preservativos e a detecção de DNA-HPV (Harro et al, 2001; Hogewoning et al, 2003; Khan et al, 2005; Seamans et al, 2006) porém, outros pesquisadores encontraram uma forte associação entre estas variáveis, observando que o uso

de preservativo conferia uma proteção para os parceiros, comparados àqueles que não utilizavam o método (Schiffman & Adrianza, 2000; Inglis et al, 2006; Palefsky et al, 2006)

Kjaer et al (2000) corrobora com estes resultados, observando um decréscimo significativo de 80,0% no risco de contaminação pelo HPV, entre profissionais do sexo usuárias de preservativos.

A prevenção secundária é importante para minimizar o desenvolvimento de lesões clínicas, mesmo que a infecção já esteja instalada. O rastreamento pelo método Papanicolaou (*Pap smear*) e por testes moleculares (*Polymerase Chain Reaction, Hybrid Capture*) objetivam a identificação de indivíduos assintomáticos que podem ser considerados potenciais reservatórios virais e contribuir para a disseminação (Goldie et al, 2005; Goldhaber-Fiebert et al, 2006; Franco et al, 2006).

Já a prevenção terciária está direcionada para o tratamento de lesões severas associadas a infecções persistentes, que podem incluir lesões anogenitais e pré-neoplásicas via quimioterapia, imunoterapia com vacinas terapêuticas, ou remoção cirúrgica (Goldie et al, 2005; Goldhaber-Fiebert et al, 2006; Franco et al, 2006).

Com relação ao tratamento, para as lesões condilomatosas visíveis e subclínicas deve haver a remoção, que é feita atualmente com procedimentos citodestrutivos, como excisão cirúrgica com bisturi, LASER, ácido salicílico, eletrocirurgia, crioterapia, ácido bicloro e tricloroacético, cantaridina e ácido nítrico fumegante (Fusté et al, 2008; Huh & Roden, 2008).

Também são utilizados métodos antivirais e/ou imunomoduladores, como interferon- β e γ , imiquimod, cidofovir, quimioterapia com bleomicina, 5-fluorouracil, podofilina, podofilotoxina (Fusté et al, 2008; Huh & Roden, 2008). Para evitar a re-infecção viral, recomendam-se métodos contraceptivos de barreira, como preservativos masculinos e femininos, sendo importante manter abstinência sexual durante o tratamento (Jacyntho et al, 1994).

1.3.7.1. Vacinas

Uma vez que o HPV é considerado o principal responsável pelo desenvolvimento do câncer cervical, duas formas de prevenção são propostas: o rastreamento das lesões precursoras com testes diagnósticos sensíveis ou a imunização contra o HPV (Franco & Harper, 2005).

Embora a incidência do câncer genital venha diminuindo devido aos métodos de rastreamento, seu custo ainda é elevado. Logo, a prevenção das doenças relacionadas ao vírus deveria ser disponível sob a forma de vacinação (Soper, 2006).

Desde a década passada, iniciaram-se os testes clínicos com várias vacinas que tinham como alvo os tipos comuns do HPV, classificadas como profiláticas ou terapêuticas. As vacinas profiláticas evitam a infecção pelo HPV e as doenças relacionadas e as terapêuticas induzem a regressão das lesões pré-cancerosas e remissão do câncer invasivo (Franco & Harper, 2005; Kahn & Bernstein, 2005).

A vacina bivalente (Glaxo) protege contra os tipos de HPV 16 e 18, mostrando eficácia de 91,6% contra infecção incidental e 100,0% contra as persistentes por estes tipos de HPV. A vacina demonstrou ser segura, bem tolerada e altamente imunogênica (Franco & Harper, 2005; Ault, 2006; Harper et al, 2004; Weaver, 2006). Além disso, a análise dessa vacina contra infecção incidental por outros tipos oncogênicos indicou alto grau de proteção contra o HPV 31 e 45, o terceiro e o quarto tipos virais mais comumente associados ao câncer cervical.

Já a vacina quadrivalente (Merck) contra os tipos 6, 11, 16 e 18 tem mostrado redução significativa da incidência de infecções persistentes pelo HPV (Soper, 2006). Esta vacina que protege contra os tipos oncogênicos e não oncogênicos mais comuns, também conferiu 100,0% de eficiência para prevenir doenças associadas aos tipos virais 16 e 18, sugerindo que a vacinação em massa diminuirá os casos de câncer cervical provocadas pelas doenças associadas ao HPV (Weaver, 2006).

As vacinas vêm se mostrando mais efetivas quando administradas antes do início da atividade sexual e as campanhas de vacinação deverão ter como alvo os adolescentes e os pré-adolescentes (Ault, 2006; Soper, 2006). Devido a pouca idade do público-alvo para a vacinação, os médicos e os pais deverão auxiliar na tomada de decisão (Gonik, 2006).

De qualquer forma, a vacina contra o HPV é uma das esperanças para o futuro e a proposta do programa de vacinação. A expectativa é que em 10 a 20 anos possam ocorrer reduções das taxas de incidência de lesões precursoras do HPV e, desta forma, a redução do câncer cervical (Linhares & Villa, 2006).

1.4. Co-fatores Virais na Oncogênese Cervical

Entre os fatores de risco para o surgimento do câncer cervical uterino e de lesões precursoras, a infecção pelo HPV tem sido estabelecida dentro dos critérios de causalidade. O desenvolvimento do câncer cervical é quase improvável na ausência da infecção pelo HPV e de fatores coexistentes que conferem a persistência da infecção (Castellsagué, 2002; da Silva et al, 2006; Scheuer et al, 2005; Horry et al, 2008; Motoyama et al, 2004).

Diversos fatores sócio-comportamentais podem estar relacionados ao desenvolvimento de uma lesão precursora do câncer cervical associada ao HPV. Entre esses se destacam a idade da mulher, o comportamento sexual, a idade precoce de início da atividade sexual, multiplicidade de parceiros, multiparidade, tabagismo, situação sócio-econômica, o uso prolongado de contraceptivo orais (ACO), precários hábitos de higiene pessoal, história de doenças sexualmente infecciosas e fatores imunológicos (Villa, 1997; Perez, 2001; Scheurer et al, 2005; Hoory et al, 2008).

Dentre estes co-fatores citados, o elevado número de parceiros sexuais durante a vida representa o mais evidente para a infecção pelo HPV (Burk et al, 1996; Scheurer et al, 2005). Estes achados suportam a transmissibilidade sexual do vírus. Alguns estudos mostraram uma forte associação entre o número de parceiros sexuais e a infecção viral (Bauer et al, 1991; Burk et al, 1996; Pham et al, 2003; de Sanjose et al, 2003), enquanto outros estudos encontraram uma moderada, fraca ou nula associação (Rohan et al, 1991; Hildesheim et al, 1993; Kjaer et al, 1993; Lazcano-Ponce et al, 2001; Sukvirach et al, 2003; Thomas et al, 2004; Silins et al, 2004).

Outras características de comportamento sexual, como idade na primeira relação sexual, frequência da atividade sexual e prática de sexo anal, não apresentaram associação significativa com o risco de infecção por HPV (Shin et al, 2003; Silins et al, 2004).

Um co-fator de extrema importância na variabilidade das taxas de infecção viral é a idade da mulher. Um decréscimo nas taxas de infecção viral tem sido relatado conforme o aumento da idade nas mulheres. A maior incidência de infecção ocorre entre mulheres com 15 e 25 anos e então declina bruscamente por volta dos 40 anos de idade (Scheurer et al, 2005). Altas taxas observadas entre mulheres jovens podem refletir a transmissão de nova infecção no início da atividade sexual (Ho et al, 1998; Moscicki et al, 2001). Já a associação inversa entre a idade e a prevalência de HPV parece demonstrar um ajustamento no comportamento sexual (Burk et al, 1996; Herrero et al, 2000).

Em relação ao tabagismo, a exposição ao fumo, a idade de início, o período e frequência de consumo de cigarros, todos estes fatores parecem influenciar na incidência do câncer cervical (Haverkos et al, 2000; Kjellberg et al, 2000; Castellsangué et al, 2002). Os dois mecanismos principais pelo qual o hábito de fumar contribui para a oncogênese cervical incluem a exposição direta do DNA de células epiteliais cervicais a nicotina e a cotidina, bem como a outros produtos metabólicos e componentes da fumaça do cigarro (Pinto et al, 2002).

Substâncias químicas carcinogênicas provenientes do tabaco podem exercer diretamente efeito mutagênico sobre o processo de mitose celular, causando danos em nível de DNA (Castellsagué et al, 2002). Muitos autores sugestionam que a exposição ao tabaco pode afetar de forma considerável a resposta imunológica local a infecções virais, reduzindo, concomitantemente, a quantidade de células de Langerhans e outras células de defesa (Poppe, 1995; Szarewski, 1996; Scheurer et al, 2005).

Recentemente, o tabaco tem sido considerado um preditor para a persistência da infecção viral. A duração média da infecção pelo HPV é mais elevada entre fumantes, com aproximadamente 10,7 meses, comparados aos 8,5 meses para não-fumantes (Giuliano et al, 2002).

Moscicki et al (2001) em seu estudo sobre os fatores de risco na etiologia de lesões cervicais, observou um aumento de 67,0% no risco de aparecimento de lesões cervicais de baixo risco entre mulheres fumantes quando comparadas a não-fumantes. Castle et al (2002) avaliou mulheres positivas para HPV oncogênico e observou um aumento significativo de lesões de alto grau (NIC II e III) entre fumantes, comparadas as não-fumantes.

Entretanto, em relação ao uso de contraceptivos orais, é difícil avaliar sua relação com a infecção pelo HPV. Segundo Wang et al (2003), hormônios esteróides na forma de contraceptivos comumente administrados durante a fase reprodutiva parecem aumentar a atividade transformadora dos oncogenes do HPV e interferir na resolução eficiente de lesões causadas pelo vírus na cérvix de mulheres jovens.

Poucos estudos têm sugerido a associação entre a infecção viral e o uso de ACO (Pham et al, 2003). Ainda são desconhecidos os mecanismos pelos quais os contraceptivos orais podem contribuir para o risco de aquisição, persistência e progressão da infecção para o câncer cervical (Schneider, 1994; Villa, 1997).

Estudos experimentais observaram que fatores hormonais podem influenciar a transcrição do genoma viral. Moodley et al (2003) e de Villiers (2003) sugerem que um aumento da exposição da área de transformação do colo uterino a potenciais carcinogênicos pode ser um fator determinante a formação de câncer cervical. Hormônios como o estrogênio e a progesterona estimulam a proliferação celular e a transcrição viral, aumentando a expressão dos oncogenes E6 e E7 e promovendo a degradação do gene p53, resultando na perda da atividade supressora de tumor (Moodley et al, 2003).

Outro fator importante e determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico é a resposta imune do hospedeiro. A prevalência da infecção pelo HPV bem como a progressão para lesões displásicas ou mesmo o câncer é mais freqüente em mulheres imunodeficientes, quando comparado a mulheres imunocompetentes (Parkin, 2002; Anschau et al, 2008).

Segundo Scott et al (2001), o estudo do sistema imunológico, bem como a susceptibilidade genética do indivíduo na história natural da infecção pelo HPV tem sido o foco de muitas pesquisas. A resposta imune por anticorpos à infecção é considerada determinante na imunidade protetora e esta é utilizada como marcador de infecção passada e presente ou mesmo como preditor de neoplasia cervical (Konya et al, 2001; Scott et al, 2001; Wang et al, 2003).

1.4.1. Sistema Imunológico e HPV

O conhecimento de que diferentes tipos de microorganismos são combatidos por diversas células imunológicas data dos anos 50, quando foi documentada, através de muitos estudos, a importância dos anticorpos na destruição de bactérias extracelulares (Roitt et al, 2002).

Os anticorpos, concomitantemente com o complemento, podem lisar bactérias e funcionar como opsoninas, facilitando a fagocitose. Os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos exercem a função microbicida de forma mais ampla contra vários tipos de agentes e são células importantíssimas para a defesa do hospedeiro (Roitt et al, 2002).

A resposta mediada pelas células T é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares, como vírus, protozoário, fungos e bactérias. Estas células podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células CD8+ ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares (Nussbaum et al, 2002).

Recentemente, foi descoberta a heterogeneidade das células TCD4+ (*T helper*), sendo constituída de dois tipos: as células Th1 e Th2. Esse achado tem contribuído de forma efetiva para o entendimento da imunopatogênese da maioria das doenças infecciosas. A resposta Th1 está relacionada com defesa de protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra helmintos e bactérias extracelulares (Nussbaum et al, 2002).

O sistema imunológico apresenta uma homeostasia e uma resposta imune balanceada, pois algumas citocinas são responsáveis pela modulação negativa da resposta de outras citocinas. O IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e IL-10, a resposta Th1, proporcionando, desta forma, o equilíbrio no sistema imune (Nussbaum et al, 2002).

Os genes do sistema imune desempenham uma grande importância clínica em transplantes, doenças auto-imunes e respostas a infecções, como ainda oferecem excelentes modelos para a análise da variação humana e expressão gênica. Os fatores genéticos exercem um papel relevante não apenas na resposta imune normal, mas também no desenvolvimento de reações e doenças imunológicas (Nussbaum et al, 2002).

Relatos na literatura sugerem uma forte associação existente entre a oncogênese e progressão neoplásica relacionada ao HPV e ao sistema imunológico. Entretanto, os mecanismos exatos que disparam essa resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV ainda não são totalmente conhecidos. Eles podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico ou à susceptibilidade genética do hospedeiro (Pinto et al, 2002; Scheurer et al, 2005).

A presença de lesões pré-malignas e malignas a nível tissular pode favorecer a entrada de células do sistema imunológico (linfócitos e macrófagos) e, juntamente com as do próprio tecido infectado, iniciar uma resposta ao processo infeccioso (Pardo-Govea et al, 2005).

Indivíduos com infecção persistente e com elevado número de parceiros sexuais estão mais susceptíveis a uma resposta sorológica ao HPV (Hagensee et al, 2000; Heim et al, 2002; Viscidi et al, 2003; Nonnenmacher et al, 2003). Todavia, co-fatores imunológicos, comportamentais e genéticos são considerados importantes na etiologia do câncer cervical. Muitas citocinas que modulam o controle imunológico estão implicadas no desenvolvimento de lesões do colo uterino (Clerici et al, 1997; Dranoff G, 2004).

A resposta imune local pode ser do tipo *T-helper-1* (Th1) que inclui a Interleucina-2 (IL-2), o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e o Interferon-gama (IFN- γ); e o tipo *T-helper-2* (Th2), com a IL-4,

IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Gonçalves & Donaldi, 2004). Um estudo realizado por Scott et al (2001) observou que o padrão de resposta imune tipo Th1, através das expressões de IFN- γ e IL-2 está associado com a presença do vírus HPV no tecido cervical.

Al-Saleh e colaboradores (1998) demonstraram que a progressão ao câncer cervical está associada à resposta imunoregulatória tipo Th2 (IL-4, IL-6). Já Wu et al (1996), com estudos *in vitro* observou que o TNF- α , juntamente com o INF- γ e a IL-2 apresentam um papel crítico para a regulação da susceptibilidade dos queratinócitos cervicais para a infecção viral em mulheres com NICII e III.

Os polimorfismos existentes no Sistema Leucocitário Humano (HLA) são alguns dos co-fatores de susceptibilidade genética para a infecção viral, sendo muito investigados na aquisição e na história natural do HPV. Alguns polimorfismos estão intimamente relacionados à proteção contra infecções virais persistentes (DRB1*0301-DQB1*0201) (Maciag et al, 2000; Ho et al, 2002). Controversamente existem haplótipos que estão associados ao risco de infecção, como por exemplo, DRB1*1601-DQ*0502 e DRB1*0807-DQB1*0402 (Maciag et al, 2000; Ho et al, 2002).

Estudos têm documentado também a associação dos polimorfismos das citocinas TNF- α , IL-10, IL-6 e IFN- γ com o câncer cervical (Stanczuk et al, 2001; Roh et al, 2002; Stanczuk et al, 2003; Govan et al, 2003).

1.4.2. Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

O Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*), existente em todos os vertebrados, é constituído, entre outros, por genes com importantes funções imunológicas. Em 1937, Gorer identificou um grupo de antígenos em camundongos, que, quando idênticos entre animais doadores e receptores, aumentavam gradativamente a sobrevivência do transplante (Gorer, 1937; Roitt et al, 2002).

Jean Dausset, precursor das pesquisas, em 1958 publicou as suas observações sobre a capacidade do soro de pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinar leucócitos de outros indivíduos. Dausset (1958) descobriu assim o primeiro antígeno humano, denominado MAC (agora HLA-A*02), um dos produtos dos genes do Sistema Humano de Antígenos Leucocíticos (HLA - *Human Leukocyte Antigens*), o correspondente humano do MHC.

Já em 1963, Jon van Rood e van Leeuwen descobriram um novo gene do sistema HLA a que deram o nome de FOUR (atualmente denominado HLA-B). Com a invenção da técnica de cultura linfocitária mista em 1964 foram-se acumulando resultados que conduziram à descoberta de novos genes, denominado HLA-DR na década de 70 (Bach & Hirschhorn, 1964; Bain et al, 1964).

O envolvimento do Complexo Maior de Histocompatibilidade na resposta imunitária do organismo só foi confirmado no início da década de setenta do século XX (Bjorkman et al, 1987; Brown et al, 1993).

Devido às suas múltiplas funções, resultados vêm sido obtidos no que diz respeito aos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), principalmente aos genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA), que desempenham a regulação do sistema imune (Araujo & Villa, 2003).

Os genes HLA são divididos em genes de Classe I (A, B e C), Classe II e Classe III. A Classe I é representada por antígenos que são fundamentais à imunocompetência e estão diretamente relacionados ao reconhecimento de antígenos. Os genes da classe II estão organizados em várias sub-regiões que codificam os antígenos (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) (Araujo & Villa, 2003).

Os genes da Classe III...

Estudos recentes demonstram a relação de alguns alelos encontrados em populações de mulheres com lesões cervicais (Zoodsma et al, 2005; Dao et al, 2005). A maioria dos achados aponta o envolvimento de genes do HLA de classe II, tanto como fator de proteção quanto de indução à formação de lesões e do câncer cervical. O envolvimento dos genes HLA-DQ e HLA-DR foi bem relatado em um estudo envolvendo mais de 1.000 mulheres nos Estados Unidos, onde os genes foram associados ao carcinoma escamoso da cérvix (Zoodsma et al, 2005).

Alelos estudados, como o HLA DQB1*03, mostram sua associação com lesões pré-malignas e provavelmente com a persistência da infecção por HPV em alguns casos (Odunsi et al, 1995). Outros alelos estudados em diferentes populações enfatizam o envolvimento do gene HLA-DQB1 de classe II (Dao et al, 2005).

Os alelos que conferem proteção ao desenvolvimento de lesões cervicais têm sido amplamente estudados e já foram relatados em alguns estudos (Hildesheim et al, 2002; Araujo & Villa, 2003). Hildesheim e colaboradores (2002) observaram um efeito protetor dos alelos HLA

DRB1*13/DQB1*0603 de classe II contra a infecção e persistência viral, sendo estes, os achados mais consistentes na literatura.

Poucos estudos foram realizados avaliando a associação entre HLA de classe I e o possível desenvolvimento de lesões pré-malignas da cérvix, mesmo conhecendo seu potencial (Araujo & Villa, 2003).

1.4.3. Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor- α*)

Macrófagos desempenham um papel primordial na imunidade mediada por células. Estes estão envolvidos tanto na fase inicial das respostas imunes, como células apresentadoras de antígenos, como células inflamatórias, tumoricidas e microbicidas, além de possuírem funções regulatórias (Roitt et al, 2002).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, secretada por macrófagos ativos e localizado no cromossomo 6 (região p21.3) (Kirkpatrick et al, 2004; Duarte et al, 2005).

A descoberta do Fator de Necrose Tumoral (FNT- α) foi através de dois sistemas experimentais. O primeiro foi a indução de necrose em tumores por injeção de soro contendo o fator nos animais portadores de tumores. Este fenômeno ocorria se o animal doador recebia uma injeção de BCG, *corynebacterium parvum* ou ovos de esquistossoma cerca de duas semanas antes de uma injeção de lipossacarídeo (LPS) (Roitt et al, 2002).

Agindo em sinergia com Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6), o TNF- α é importante para a compreensão das conseqüências da infecção e da imunopatologia que pode acompanhar as respostas mediadas por células (Roitt et al, 2002).

Constituinte do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), dentro da região HLA classe III, esta citocina exerce um importante papel no desenvolvimento da resposta imunológica (Desphande et al, 2005; Duarte, 2005).

Presente nos macrófagos ligado à membrana, o TNF- α pode ser liberado pela clivagem da mesma e por inúmeros estímulos, como por exemplo, componentes de bactérias, protozoários e algumas células tumorais (Roitt et al, 2002).

Diversos estudos sugerem que o TNF- α possa atuar como um promotor endógeno de tumores em inúmeros tipos de câncer, como por exemplo, câncer de mama, linfoma, próstata, câncer epitelial

ovariano, endométrio uterino, câncer de pele e carcinoma gástrico (Moore, et al, 1999; Oh et al, 2000; Sasaki et al, 2000; Machado et al, 2003).

Segundo outros pesquisadores, o TNF- α também está associado com doenças infecciosas, como a malária cerebral, artrite reumatóide, doença meningocócica e asma (McGuire et al, 1994; Mulcahy et al, 1996; Nade et al, 1996; Moffatt & Cookson, 1997).

No caso de tumores, a citocina parece ser responsável pela maior parte da atividade tumoricida dos monócitos humanos e pode desempenhar alguma função na ação das células linfóides citotóxicas.

No que diz respeito ao HPV, esse está relacionado com o controle direto e indireto na infecção; no controle direto da infecção, o TNF- α induz a apoptose nas células infectadas pelo vírus e nas células tumorais. Desta forma, há estimulação da resposta inflamatória através do aumento da regulação das moléculas de adesão vascular e de citocinas, que controlam o crescimento da infecção viral e a regulação do gene de transcrição viral (Desphande et al, 2005).

Em relação ao controle indireto no desenvolvimento da infecção pelo HPV, a regulação dos níveis de TNF- α , localizados e sistêmicos, ocorre em níveis genéticos (Desphande et al, 2005).

Alterações nos níveis de TNF- α podem influenciar na resposta imune a diversos patógenos que estão associados com a susceptibilidade para doenças infecciosas. Foi demonstrada a associação de um polimorfismo de microsatélite, TNF- α -11, com infecção pelo HPV-16 e com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), quando combinados com os alelos do gene HLA-DQB (Desphande et al, 2005).

Segundo Fernandes et al (2008), o genótipo G/G ou a presença do alelo G no polimorfismo -308 confere ao indivíduo um fenótipo de baixa produção desta citocina; já os genótipos A/G e A/A, um fenótipo de alta produção.

A baixa produção desta citocina está relacionada com a presença de lesões de baixo grau (LG-SIL) e o genótipo A/G e A/A em lesões de alto grau (HG-SIL) e câncer cervical invasivo (Fernandes et al, 2008; Duarte et al, 2005).

1.4.4. Interferon-gama (IFN- γ)

Os interferons (IFNs) consistem de um grupo de proteínas que são importantes nas infecções virais. Um tipo de interferon é produzido por células que sofreram ação da infecção viral, outro é liberado por certos linfócitos T ativados.

Estas proteínas induzem um estado de resistência antiviral em células teciduais não infectadas e já são produzidas desde o início da infecção, sendo a primeira linha de resistência contra muitas viroses (Roitt et al, 2002).

Existem pelo menos 15 tipos de IFN- α , os genes de cada qual apresentando 85,0% de homologia. O IFN- β , juntamente com o IFN- α formava originalmente o IFN tipo I, sendo duas moléculas completamente independentes. O IFN- γ é o original IFN tipo II ou interferon imune, e não apresenta qualquer homologia com qualquer outro tipo.

Os IFNs são liberados por diversos tipos de células e resposta à infecção viral, RNA de dupla hélice, endotoxina e estímulos mitogênicos e antigênicos. Em geral, o IFN- γ difere dos demais porque é liberado como uma linfocina por linfócitos T ativados, apesar de, sob determinadas circunstâncias, os macrófagos também o secretarem (Roitt et al, 2002).

Um dos efeitos principais dos IFN- γ é facilitar o reconhecimento de agentes virais pelo sistema imunológico, através do aumento de glicoproteínas de classe I e de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). Também age destruindo alvos infectados por vírus, ativando células exterminadoras naturais (EN) e macrófagos e, inibindo diretamente a replicação viral.

Além destas propriedades, existem relatos de que o IFN- γ possa inibir o crescimento celular (incluindo atividade antitumoral), bem como a penetração viral em células e o brotamento a partir de células infectadas.

Sabendo-se que o IFN- γ aumenta a imunidade celular e estimula a imunidade humoral, a avaliação dos padrões de citocina na infecção associada ao HPV revela que alterações no equilíbrio das mesmas estão relacionadas ao desenvolvimento dessa infecção (Maciag & Villa, 1999).

Vários fatores regulam o equilíbrio entre Th1 e respostas Th2, tal como citocinas produzidas por células de imunocompetentes. Enquanto citocinas Th1 estimulam a resposta imune celular, as citocinas Th2 favorecem a repressão da resposta celular (Abbas et al, 2007). Embora evidências experimentais indiquem que moléculas de CHP poderiam participar na regulação e no equilíbrio de

Th1 e Th2, o papel destas moléculas de regulação ainda não está claro (Hanson et al, 1999; Song et al, 2008).

Estudos comprovam que vários polimorfismos no gene do IFN- γ estariam associados com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento do câncer cervical (Song et al, 2004).

1.4.5. Interleucina-10 (IL-10)

As citocinas são moléculas importantes na resposta imune contra infecções virais. Geneticamente determinadas, podem apresentar predomínio para padrão associado com a eliminação viral, ou associadas com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais, como a IL-10, no caso do HPV (Clerici et al, 1997; Zoodsma et al, 2005).

Avaliações da produção de citocinas pelos linfócitos T do sangue periférico têm sido realizadas em mulheres apresentando a infecção pelo HPV e portadoras de lesões cervicais de diferentes graus de severidade. Estes estudos sugerem que o desenvolvimento das lesões cervicais está associado, preferencialmente, ao padrão local de citocinas imunoinibitórias, como a IL-10 e não a um padrão de resposta imune pró-inflamatória, que seria mais apropriada contra infecções virais e tumores (Fernandes et al, 2008).

A IL-10 é uma citocina tipo Th-1 que apresenta efeito supressivo mediada por células do sistema imunológico (de Waal Malefyt et al, 1991; Moore et al, 1993; Chang et al, 1995). Em certos tumores, a produção observada de IL-10 foi extremamente elevada, como por exemplo, nos casos de câncer pulmonar, linfomas e doença de Hodgkin, câncer renal, ovariano, cólon e câncer de pele (Pisa et al, 1992; Chen et al, 1994; Kim et al, 1995; Herbst et al, 1996).

Nos casos de NICs e câncer cervical, a presença bem como a progressão para o câncer está associada com o aumento dos níveis sorológicos de IL-10 (Chopra et al, 1998; Jacobs et al, 1998).

Sabe-se que existem três SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) descritos na região promotora do gene da IL-10, nas posições -1082, -819 e -592 (Turner et al, 1997; Eskdale et al, 1998). A presença do nucleotídeo A na posição -1082 está correlacionada com baixa produção da IL-10. Os polimorfismos do gene da IL-10 da região promotora parecem ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL-10 (Zoodsma et al, 2005).

Segundo Clerici et al (1997), o polimorfismo -1082 tem sido importante na determinação dos níveis de produção da citocina IL-10, sendo em baixa (AA), intermediária (AG) e alta (GG). Somente dois estudos mostraram a associação destes alelos com o câncer cervical (Stanczuk et al, 2001; Roh et al, 2002). Stanczuk et al (2001) encontrou associação deste polimorfismo (-1082) com o desenvolvimento de câncer em uma população de mulheres em Zimbábue (*Odds Ratio* (OR): 0,28 para AG, comparado a AA, com um Intervalo de Confiança (IC) de 95,0%: 0,12-0,61).

Já Roh et al (2002) não encontrou associação de nenhum dos três polimorfismos (AA, AG e GG) com o câncer cervical em mulheres koreanas.

A capacidade de secretar diferentes níveis de citocinas, herdadas geneticamente, parece ser relevante na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais. No entanto, são raros os estudos avaliando polimorfismos de citocinas nas lesões cervicais (Bidwell et al, 1999; Haukim et al, 2002).

Um estudo avaliando o polimorfismo -1082 do gene da IL-10 demonstrou que as mulheres portadoras do alelo G e com câncer cervical parecem estar imunogeneticamente predispostas a produzir altos níveis de IL-10 (Stanczuk et al, 2001).

Além disso, foi observado que a prevalência do alelo associado (-1082 A) à baixa produção foi menor no grupo de casos com câncer cervical quando comparados com o de mulheres saudáveis, no qual não foram observados alelos para alta produção. Estes resultados sugerem que a habilidade, geneticamente determinada, de produzir altos níveis da IL-10 (-1082 G) pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer cervical (Stanczuk et al, 2001).

Segundo Giannini et al (2002) níveis aumentados de IL-10 em mulheres com lesões cervicais infectadas pelo HPV, em relação às mulheres saudáveis apresentando colos uterinos normais, indicam a ocorrência de imunossupressão local, visto que a IL-10 estaria inibindo a apresentação de antígenos, a função das células T citotóxicas, a proliferação das células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas inibições contribuem para a instalação e o desenvolvimento de lesões cervicais após infecção pelo HPV.

Acredita-se que a presença da infecção pelo HPV-16, tipo viral predominantemente encontrado em estudos brasileiros, parece influenciar na produção da IL-10, aumentando sua produção em mulheres que geneticamente estariam predispostas a produzir níveis reduzidos dessa citocina,

deixando-as mais susceptíveis a instalação e progressão de lesões cervicais, precursoras do câncer do colo uterino (Fernandes et al, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, Lichtman A. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª Edição. Editora Elsevier, 2007.
- Alani RM, Münger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol*. 1998;16(1):330-7.
- al-Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, Moutschen M, Doyen J, Boniver J., et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol*. 1998 Mar;184(3):283-90.
- Altiok S. Molecular markers in cervical cytology. *Clin Lab Med*. 2003; 23(3):709-28.
- Anschau F, Schmitt VM, Lambert AP, Gonçalves MA, Machado DC. Transition of cervical carcinoma in situ to invasive cancer: Role of p16(INK4a) expression in progression and in recurrence. *Exp Mol Pathol* 2008 Nov 28 [Epub ahead of print].
- Araújo Souza PS, VILLA LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutation Research*. 2003; 544 (2-3):375-83.
- Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96(4):280-93.
- Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:S78-89.
- Ault KA. Vaccines for the prevention of human papillomavirus and associated gynecologic diseases: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2006; (61):26-31.
- Bach FH, Hirschhorn K. Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science*. 1964; (142): 813-4.
- Bain B, Vaz MR, Lowenstein L. The development of large immature mononuclear cells in mixed lymphocyte culture. *Blood*. 1964; (23):108-116.

- Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005; (32):16-24.
- Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, et al. Determinants of genital papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 1993; 20(5):274-8.
- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA.* 1991;265(4):472-7.
- Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 1998.
- Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. *Eur J Immunogenet.* 1999; Apr-Jun 26(2-3): 135-223.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 1987; (329): 506-12.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008; 26(10):1-16.
- Bosch FX, Castellsagué X, de Sanjosé S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *Br J Cancer.* 2008; 98(1):15-21.
- Brisson J, Bairati I, Morin C, Fortier M, Bouchard C, Christen A, et al. Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis.* 1996;173(4):794-9.
- Brown DR, Bryan JT, Wools K, Rodriguez M, Tyring S. Detection of Human Papillomavirus L1 Protein in Condylomata Acuminata from Adults With Defects in Cell-Mediated Immunity. *J Med Virol.* 1993; (64):79-84.
- Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3:S52-61.

- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; (16): 1-17.
- Burger MP, Hollema H, Gouw AS, Pieters WJ. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *Br Med J.* 1993; 306(6880):749-52.
- Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis.* 1996;174(4):679-89.
- Calhoun ES, McGovern RM, Janney CA, Cerhan JR, Iturria SJ, Smith DI, et al. Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer. *Clin Chem.* 2002; 48(8):1218-24.
- Campion MJ, Greenberg MD, Kazamel TIG. Manifestações clínicas e história natural das infecções pelo papilomavírus humano. In: Lorincz AT, Reid R (ed.) *Papailomavírus Humano II.* Clin Obstet Ginecol Am Norte. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996; P. 759-86.
- Carvalho JJM, Oyakawa N. *I Conselho Brasileiro de HPV - Papilomavírus Humano.* São Paulo: Editora BG cultural; 2000.
- Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, et al. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol,* 1995; (4)7:209-18.
- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002; 89(2):191-2.
- Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, et al. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(18):1406-1414.
- Chan PK, Chang AR, Cheung JL, Chan DP, Xu LY, Tang NL, et al. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high- and low-oncogenic risk types. *J Infect Dis* 2002; 185(1):28-35.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995; 69(5):3074-3083.

- Chang CH, Furue M, Tamaki K. B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon-gamma or by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1995 Feb;25(2):394-8.
- Chang F. Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol* 1990; 43(4):269-276.
- Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer.* 1994 Mar;56(5):755-60.
- Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest.* 1998;16(3):152-9.
- Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Feb 5; 89(3):245-50.
- Cox JT. Management of cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet.* 1999; 353(9156):857-59.
- Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet.* 2003; 362(9399):1871-6.
- da Silva CS, Adad SJ, Hazarabedian de Souza MA, Macêdo Barcelos AC, Sarreta Terra AP, Murta EF. Increased frequency of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* in pregnant women with human papillomavirus infection. *Gynecol Obstet Invest.* 2004; 58(4):189-93.
- da Silva TT, Guimarães ML, Barbosa MIC, Pinheiro MFG, Maia AF. Identificação de tipos de Papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial. *Ver Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28(5):285-91.
- Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003;106(3):396-403.
- Dao DD, Sierra-Torres CH, Robazetti SC, de Gomez MN, König R, Lema C, et al. HLA-DQB1 and cervical cancer in Venezuelan women. *Gynecol Oncol.* 2005; 96(2):349-54.

- das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol.* 1992; (73):2327-36.
- Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 1958; 20(1-4):156-66.
- de Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutat Res.* 2003; 544(2-3):375-83.
- de Sanjose S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N, et al. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis.* 2003; 30(10):788-93.
- de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2003;103(6):705-8.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991 Nov 1;174(5):1209-20.
- Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, Wheeler CM. TNF- α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16-Associated Cervical Cancer. *J Infect Dis,* 2005; 191(6):969-76.
- Dias EP. Papilomavírus Humano: aspectos biológicos, clínicos e morfológicos. *J Bras Med.* 1993; (64):206-17.
- Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(1):11-22.
- Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, et al. G-308A TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(2):588-92.
- Duensing S, Münger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol.* 2003; 77(22):12331-5.

- Dunne EF, Markowitz LE. Emerging Infections: Genital Human Papillomavirus Infection. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(5):624-9.
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1998 Aug 4;95(16):9465-70.
- Farzaneh F, Roberts S, Mandal D, Ollier B, Winters U, Kitchener HC, et al. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *Int J Obst Gynaecol.* 2006; 113(8):961-4.
- Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22(33):5201-07.
- Ferenczy A, Winkler B. Cervical intraepithelial neoplasia and Condyloma. In: Kurman RJ. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* 3rd ed. 1993. P.179-182.
- Ferenczy A. Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; (172):1331-9.
- Fernandes AP, Gonçalves MA, Duarte G, Cunha FQ, Simões RT, Donadi EA. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology.* 2005; 334(2):294-8.
- Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 140(2):241-4.
- Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 2003; 77(8):4818-26.
- Fisher SG. Epidemiology: a tool for the study of human papillomavirus-related carcinogenesis. *Intervirology* 1994; (37):215-25.
- Fonseca ASK, Lunge VR, Ikuta N. Detecção e tipagem molecular de Papilomavírus Humano (HPV) em amostras de cérvix uterino. *Laes & Haes.*1998; (114):148-54.

- Ford K, Reed BD, Wirawan DN, Muliawan P, Sutarga M, Gregoire L. The Bali STD/AIDS study: human papillomavirus infection among female sex workers. *Int J STD AIDS*. 2003; 14(10):681-7.
- Franco EL, Cuzick J, Hildesheim A, de Sanjosé S. Chapter 20: Issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:171-7.
- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical câncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001; 164(7):1017-25.
- Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*. 2005; 23(17-18):2388-94.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999; 180:1415-1423.
- Fuchs PG, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases? *Int J Cancer*. 1989; (43):41-4.
- Fusté P, Santamaría X, Carreras R. New therapeutic strategies for human papillomavirus related anogenital lesions in HIV patients: highly active antiretroviral therapy and HPV vaccines. *Med Clin (Barc)*. 2008; 131(1):30-4.
- Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*. 2003; 56(7):532-6.
- Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer*. 2002 Feb 10;97(5):654-9.
- Gil AO. Análise crítica da associação do papilomavírus humano (HPV) e da proteína p53 no câncer de pênis. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP; 1998.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; (25):709-20.

- Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harri R, Baldwi S, Papenfuss MR, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(9):839-46.
- Goldhaber-Fiebert JD, Goldie SJ. Estimating the cost of cervical cancer screening in five developing countries. *Cost Eff Resour Alloc*. 2006; (4):13.
- Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahé C, et al. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med*. 2005; 353(20):2158-68.
- Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol Oncol*. 2005; 96(1):181-6.
- Gonçalves MA, Donaldi EA. Immune cellular response to HPV: Current Concepts. *Braz J Infect Dis*. 2004; 118(1):1-9.
- Gonik B. Strategies for fostering HPV vaccine acceptance. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006; 2006 Suppl: 36797.
- Gorer PA. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol*. 1937; (44): 691-7.
- Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog*. 2003 May 16;2(1):3-7.
- Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol*. 2000; 53(4):201-06.
- Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Meth*. 2003; (112):23-33.

- Gross GE, Barrasso R. Infecção pelo papilomavírus humano: Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artes Médicas 1999. P. 431.
- Hagensee ME, Koutsky LA, Lee SK, Grubert T, Kuypers J, Kiviat NB, et al. Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. *J Infect Dis.* 2000;181(4):1234-9.
- Hanson MS, Cetkovic-Cvrlje M, Ramiya VK, Atkinson MA, MacLaren NK, Singh B, et al. Quantitative thresholds of MHC Class II I-E expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *J Immunol.* 1999; (157):1279-87.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuid A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004; 364(9447):1757-65.
- Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(4):284-92.
- Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes Immun.* 2002 Sep;3(6):313-30.
- Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmacother.* 2000; 54(1):54-9.
- Heim K, Widschwendter A, Pirschner G, Wieland U, Awerkiew S, Christensen ND, et al. Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(4):705-11.
- Herbst H, Foss HD, Samol J, Araujo I, Klotzbach H, Krause H, et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood.* 1996 Apr 1;87(7):2918-29.

- Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Lazcano E, Hernández-Avila M, Salmerón J. High-risk human papillomavirus detection and related risk factors among pregnant and nonpregnant women in Mexico. *Sex Transm Dis.* 2005; 32(10):613-18.
- Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005;191(11):1796-1807.
- Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, Kurman RJ, Barnes W, Jones S, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington, D.C. *Sex Transm Dis.* 1993; 20(5):279-85.
- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of Cervical Cancer: a review. *Virus Res.* 2002; 89(2): 229-40.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998; 338(7):423-8.
- Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer.* 2003; 107(5):811-16.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. P53 mutations in human cancers. *Science.*1991; (253):49-53.
- Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc.* 2008; 107(3):198-217.
- Howley PM. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM editores. *Virology.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1996; P. 2045-76.
- Huh WK, Roden RB. The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 109 Suppl 2: 48-56.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. Lyon: IARC Monographs, 1995; Vol.64. 381pp. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/index.php>. Accessed November 29, 2008.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. Lyon: IARC Monographs, 2007; Vol.90. 670pp. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/index.php>. Accessed November 29, 2008.

Igansi CN. Prevalência de papilomavírus humano (HVPV) e Chlamydia Trachomatis (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, 2005. 186pp.

INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008. [Homepage Internet]. Acessado dia 15 de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.

Inglis S, Shaw A, Koenig S. Chapter 11: HPV vaccines: commercial research, development. Vaccine. 2006; 24 Suppl 3:99-105.

Jacobs N, Giannini SL, Doyen J, Baptista A, Moutschen M, Boniver J, et al. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. Clin Exp Immunol. 1998 Jan; 111(1):219-24.

Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. CA Cancer J Clin. 2001; 51(2):92-114.

Jenson AB, Kurman RJ, Lancaster WD. Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. Obstet Gynecol Clin North America. 1987; 14(2):397-406.

Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Lancet. 2000; 355(9222):2189-93.

- Kahn JA, Bernstein DI. Human papillomavirus vaccines and adolescents. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005;17(5):476-82.
- Kaufman RH, Adam E, Vonka V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. *Clin Obstet Gynecol.* 2000; 43(2):363-80.
- Khan MJ, Partridge EE, Wang SS, Schiffman M. Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer.* 2005; 104(1):61-70.
- Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol.* 1995 Aug 15;155(4):2240-7.
- Kino N, Sata T, Sato Y, Sugase M, Matsukura T. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a novel human papillomavirus (type 82) associated with vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(1):91-5.
- Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, Glew S. TNFalpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 2004; 92(2):675-9.
- Kjaer SK, de Villiers EM, Cağlayan H, Svare E, Haugaard BJ, Engholm G, et al. Human papillomavirus, herpes simplex virus and other potential risk factors for cervical cancer in a high-risk area (Greenland) and a low-risk area (Denmark)--a second look. *Br J Cancer.* 1993; 67(4): 830-7.
- Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis.* 2000; 27(8):438-45.
- Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer.* 2000; 82(7):1332-8.

- Konya J, Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res.* 2001; (82): 205-38.
- Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997;102(5):3-8.
- Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(5):908-14.
- Kulasingam SL, Kim JJ, Lawrence WF, Mandelblatt JS, Myers ER, Schiffman M, et al. Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(2):92-100.
- Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2006; 367(9509):489-98.
- Laukkanen P, Koskela P, Pukkala E, Dillner J, Läärä E, Knekt P, et al. Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland. *J Gen Virol.* 2003; 84(8):2105-09.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 2001; 91(3):412-20.
- Liaw KL, Glas AG, Manos MM, Greer CE. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(11):954-60.
- Linhares AC, Villa LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). *J Pediatr (Rio J).* 2006; 82 Suppl 3:25-34.

- Lorenzato FR, Singer A, Ho L, Santos LC, Batista Rde L, Lubambo TM, et al. Human papillomavirus detection for cervical cancer prevention with polymerase chain reaction in self-collected samples. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(5):962-8.
- Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet.* 2002; 360 (9328):228-9.
- Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 2003 Aug;125(2):364-71.
- Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol.* 2004; 79(6):647-64.
- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(11):1183-91.
- Maciag PC, Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32(7):915-22.
- Matsukura T, Koi S, Sugase M. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology.* 1989; (172):63-72.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alfa promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.*1994;(371):508-10.
- Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature.* 1986; 319(6056):783-4.
- Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):551-4.
- Moodley M, Sewart S, Herrington CS, Chetty R, Pegoraro R, Moodley J. The interaction between steroid hormones, human papillomavirus type 16, E6 oncogene expression, and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13(6):834-42.

- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; (11):165-90.
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med.* 1999 Jul; 5(7):828-31. Erratum in: *Nat Med* 1999 Sep; 5(9):1087.
- Morrison EA, Ho GY, Vermund SH, Goldberg GL, Kadish AS, Kelley KF, et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer.* 1992; 52(1):164-7.
- Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA.* 2001; 285(23):2995-3002.
- Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL, Maruo T. The role of Human Papilloma Virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(1): 9-19.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004; 78(21):11451-60.
- Münger K, Yee CL, Phelps WC, Pietenpol JA, Moses HL, Howley PM. Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J Virol.* 1991; 65(7):3943-8.
- Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK, et al Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 1996 Sep; 59(3):676-83.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000; 19(1-2):1-5.
- Myint SH, Shaw PAV. Laboratory identification of human papilloma virus infection In: Mindel A. *Genital Warts Human Papillomavirus Infection.* London: Edward Arnold, 1995. pp. 35-52.

- Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1996 Oct;174(4):878-80.
- Naud P. DST e AIDS. Porto Alegre: Editora Artes Médicas; 1993. P. 118-132.
- Nigro HM, Baker SJ, Presinger AC. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989; (342):705-6.
- Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, et al. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol.* 2000; 74(8):3752-60.
- Nonnenmacher B, Pintos J, Bozzetti MC, Mielzinska-Lohnas I, Lorincz AT, Ikuta N, et al. Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. *Int J STD AIDS.* 2003;14(4):258-65.
- Nussbaum R, McInnes R, Willard H. *Genética Médica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002; 6ª ed. P. 244-254.
- Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Association between HLA DQB1 * 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Mol Med.* 1995; 1(2):161-71.
- Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, Ryu SB, Park YI, Carroll P, et al. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer. *J Urol.* 2000 May;163(5):1584-7.
- Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e patogênese do Papilomavírus Humano (HPV). In: Carvalho JJM, Oyakawa N. *I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano.* São Paulo: BG Cultural, 2000. P. 143.
- Palefsky JM, Gillison ML, Strickler HD. Chapter 16: HPV vaccines in immunocompromised women and men. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3:140-6.
- Pan W, Datta A, Adami GR, Raychaudhuri P, Bagchi S. P19ARF inhibits the functions of the HPB 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 2003; (22):5496-5503.

- Pardo-Govea T, Callejas D, Núñez-Troconis J, Araujo M, Costa L, Pons H, 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. *Invest Clin*. 2005; 46(1):5-13.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (Editors). *Cancer incidence in five continents*. Lyon (France): IARC; 2002.
- Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical Cancer, Treatment, and Prevention. *Clin Lab Sci*. 2001; 14(3):183-6.
- Pham TH, Nguyen TH, Herrero R, Vaccarella S, Smith JS, Nguyen Thuy TT, et al. Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer*. 2003;104(2):213-20.
- Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. HPV cofactors in cervical carcinogenesis. *Rev Assoc Med Bras*. 2002 Jan-Mar; 48(1):73-8.
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Aug 15;89(16):7708-12.
- Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest*. 1995; 39(1):34-8.
- Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89(12):868-73.
- Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(2):181-4.
- Richart RM, Wright JR. Pathology of the cervix. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1991; (3):561-7.

- Roh JW, Kim MH, Seo SS, Kim SH, Kim JW, Park NH, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett.* 2002 Oct 8;184(1):57-63.
- Rohan T, Mann V, McLaughlin J, Harnish DG, Yu H, Smith D, et al. PCR-detected genital papillomavirus infection: prevalence and association with risk factors for cervical cancer. *Int J Cancer.* 1991; 49(6):856-60.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia.* São Paulo: Editora Manole; 2002.
- Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. New Technologies for Cervical Cancer screening Working Group. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006; 7(7):547-55.
- Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Dec;199(6):617.e1-7. Epub 2008 Sep 16.
- Russomano AB, Reis A, camargo MJ, Dutra MVP, Fonseca SC, Anderson J. Efficacy in treatment of subclinical cervical HPV infection without intraepithelial neoplasia: systematic review. *São Paulo Med J.* 2000; 118(4):109-15.
- Salvia PN, Bergo SM, Bonesso-Sabadini PI, Tagliarini EB, Hackel C, De Angelo Andrade LA. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14(1):126-32.
- Santos ALF, Derchain SFM, Calvert EB, Martins MR, Duflath RM, Martinez EZ. Performance of cervical cytology with review by different observers and hybrid capture II in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 and 3. *Cad Saude Publica.* 2003; 19(4):1029-37.
- Santos ALF, Derchain SFM, Martins MR, Sarian LO, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *São Paulo Med J.* 2003; 121(6): 238-43.

- Santos ALF, Derchain SFM, Sarian LO, Campos EA, Santos MR, Fonsechi-Carvasan GA. Resultados Histológicos e Detecção do HPV em Mulheres com Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado e Lesão Escamosa Intra-epitelial de Baixo Grau na Colpocitologia Oncológica. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004; 26(6):457-62.
- Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Fujino T, Oh BR, Fujimoto S, et al. Frequent genotype changes at -308 of the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human uterine endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2000 Mar-Apr;7(2):369-73.
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 2005; 15(5):727-46.
- Schiffman M, Adriansa ME. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Cytol.* 2000; 44(5):726-42.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370(95): 890-7.
- Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, et al. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(2):147-50.
- Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2003;103 (4):519-24.
- Schneider A. Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirology.* 1994; 37(3-4):201-14.
- Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; (8):209-20.
- Seamans Y, Sellors J, Broekhuizen F, Howard M. Preliminary report of a gas conditioner to improve operational reliability of cryotherapy in developing countries. *BMC Womens Health.* 2006; (6): 2.
- Shepherd J, Weston R, Peersman G, Napuli IZ. Interventions for encouraging sexual lifestyles and behaviours intended to prevent cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; (2):CD001035.

- Shin HR, Lee DH, Herrero R, Smith JS, Vaccarella S, Hong SH, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Busan, South Korea. *Int J Cancer*. 2003;103(3):413-21.
- Shyu JS, Chen CJ, Chiu CC, Huang SC, Harn HJ. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: an in-situ polymerase chain reaction approach. *J Surg Oncol*. 2001; 78(2):101-9.
- Silins I, Wang X, Tadesse A, Jansen KU, Schiller JT, Avall-Lundqvist E, et al. A population-based study of cervical carcinoma and HPV infection in Latvia. *Gynecol Oncol*. 2004; 93(2):484-92.
- Silva Silveira LM, Araújo SH, Paiva IP, Furtado VMP. Cytomorphologic criteria for the diagnosis of HPV and its relation with the gravity of cervical intraepithelial neoplasia. *Rev Bras Anal Clin*. 2005; 37(2):127-32.
- Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005; 16(4):306-16.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121(3):621-32.
- Solomon D, Breen N, McNeel T. Cervical cancer screening rates in the United States and the potential impact of implementation of screening guidelines. *CA Cancer J Clin*. 2007; 57(2):105-11.
- Song SH, Lee JK, Lee NW, Saw HS, Kang JS, Lee KW. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol Oncol*. 2008; 108(3):543-8.
- Soper D. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006; 14(1):83-4.
- Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV, et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer*. 2001 Dec 15; 94(6):792-4.

- Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Mar-Apr;13(2):148-53.
- Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 2007; 107(2 Suppl 1):S2-5.
- Sukvirach S, Smith JS, Tunsakul S, Muñoz N, Kesararat V, Opasatian O, et al. Population-based human papillomavirus prevalence in Lampang and Songkla, Thailand. *J Infect Dis*. 2003; 187(8):1246-56.
- Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, et al. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet*. 2002; (76):41-7.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(4):1030-4.
- Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, et al. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. *Anticancer Res*. 2006; 26(6C):C4729-40.
- Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ, et al. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet*. 1996; 347(9006):941-3.
- Táborá N, Zelaya A, Bakkers J, Melchers WJ, Ferrera A. Chlamydia trachomatis and genital human papillomavirus infections in female university students in Honduras. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73(1):50-3.
- Thomas JO, Herrero R, Omigbodun AA, Ojemakinde K, Ajayi IO, Fawole A, et al. Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan, Nigeria: a population-based study. *Br J Cancer*. 2004; 90(3):638-45.
- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV-16 intergrations in cervical tumors. *Oncogene*. 2003; 22(8):1225-37.

- Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*. 2006;12 (17 Suppl):S462-72.
- Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*. 2003;148(8):1445-53.
- Tseng CJ, Lin CY, Wang RL, Chen LJ, Chang YL, Hsieh TT, et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; (166):35-40.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24(1):1-8.
- Ullrich SJ, Anderson CW, Mercer WE, Appella E. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem*. 1992; 267(22):15259-62.
- Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO, et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(11):2148-53.
- Van Rood JJ, van Leeuwen A. Leukocyte grouping. A method and its application. *J Clin Invest*. 1963; (42):1382-90.
- Vargas VRA, Dalla Corte EA. Prevalência das lesões intra-epiteliais escamosas em exame citológico numa determinada população de Santo Ângelo, RS. [Monografia]. Porto Alegre: Especialização da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Regional Sul, Porto Alegre, RS; 2002.
- Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(14):8211-6.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000; 81(Pt 12):2959-68.
- Villa LL. Human papillomavirus and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res* 1997; (71): 321-341.

- Viscidi RP, Ahdieh-Grant L, Schneider MF, Clayman B, Massad LS, Anastos KM, et al. Serum immunoglobulin A response to human papillomavirus type 16 virus-like particles in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Infect Dis.* 2003;188(12):1834-44.
- Walker JL, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. Predicting absolute risk of CIN3 during post-colposcopic follow-up: results from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(2):341-8.
- Wang SS, Schiffman M, Shields TS, Herrero R, Hildesheim A, Bratti MC, et al. Seroprevalence of human papillomavirus-16, -18, -31, and -45 in a population-based cohort of 10000 women in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2003; 89(7):1248-54.
- Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.* 2006; 106 (3 Suppl 1):2-8.
- Wellings K, Field J, Johnson A, Wadsworth J. Sexual behavior in Britain – The National Survey of Sexual attitudes and Lifestyles. England: Penguin, 1994.
- Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 2006; 354(25):2645-54.
- Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 ASCCP-sponsored Consensus Workshop. 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2003; 7(3):154-67.
- Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003; 348(6):489-90.
- Wright TC, Richart RM, Ferenczy A. RIGHT. Electrosurgery for HPV-Related Diseases of The Lower Genital Tract. A Practical Handbook for Diagnosis and Treatment by Loop Electrosurgical Excision and Fulguration Procedures. Arthur Vision, Inc, BioVision, Inc. New York/Quebec, 1992.
- Wu R, Coleman N, Stanley M. Different susceptibility of cervical keratinocytes containing human papillomavirus to cell-mediated cytotoxicity. *Chin Med J (Engl).* 1996 Nov; 109(11):854-8.

- Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee S, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(4):343-51.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(11):796-802.
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Pontén J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet.* 2000; 355(9222):2194-8.
- Yu T, Ferber M, Cheung TH, Chung TKH, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; (158):27-34.
- Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Eienkel J, Hoeckel M, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene.* 2003; 22(25): 3977-84.
- Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15 Suppl 3: 282-90.
- Zoundi-Ouango O, Morcel K, Classe JM, Burtin F, Audrain O, Levêque J. Uterine cervical lesions during pregnancy: diagnosis and management. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2006; 35(3):227-36.
- zur Hausen H, de Villiers EM. Human papilloma viruses. *Annu Ver Microbiol.* 1994; (427):427-47.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst.* 2000; 92(9):690-8.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Verificar a associação dos polimorfismos -1082 (A/G) e -308 (A/G) dos genes do sistema imunológico, Interleucina-10 (IL-10) e do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), respectivamente, com a infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV);

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar as associações das variáveis estudadas (demográficas, reprodutivas e de comportamento sexual) com a presença de infecção cervical por HPV;

- Descrever a distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos na população estudada;

- Verificar a frequência genotípica dos polimorfismos IL-10 -1082 (A/G) e TNF- α (-308 A/G) em lesões cervicais de alto (HGSIL) e baixo grau (LGSIL).

- Verificar a associação dos genótipos estudados com tipos virais oncogênicos (-16, -18 e -31)

ARTIGO I

***Interleucin-10 -1082G/A polymorphism analysis among Brazilian women
presenting with Human Papillomavirus (HPV)-related cervical lesions***

***Interleucin-10 -1082G/A polymorphism analysis among Brazilian women with
Human Papillomavirus (HPV)-related cervical lesions***

Cristine Nascente Igansi¹, Gabriela Tonini¹, Viviane Kubiszewski dos Santos^{2, 3}, Maria Lúcia da Rosa Rossetti², Sabrina Esteves de Matos Almeida⁴, Miriam Alice Frantz⁴, Mary Clarisse Bozzetti^{1,5}

¹ Postgraduate Program in Epidemiology at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Center of Scientific and Technological Development (CDCT) of Central Laboratory (LACEN), Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴ University Center FEEVALE of Novo Hamburgo city, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁵ Department of Social Medicine, Faculty of Medicine at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

This research was funded by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil; University Center FEEVALE, Brazil; MC Bozzetti is a recipient of a research award from the CNPq.

Corresponding Author:

Cristine Nascente Igansi, MD, MSc

Rua São Simão, 836/203. Bairro Jardim do Salso – CEP 91420-560 – Porto Alegre, RS –
Brazil

Phone: + 55 51 33985549

E-mail: cnascente@gmail.com

Resumo

Introdução: Os polimorfismos no gene da IL-10 têm sido implicados na susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores. Na infecção pelo HPV, a IL-10 pode apresentar predomínio para o padrão associado com a eliminação viral ou com a persistência da infecção e com a progressão para lesões cervicais.

Objetivos: Verificar a associação entre o polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL-10 e a infecção genital pelo HPV.

Materias e métodos: Trata-se de um estudo de caso-controle. O grupo de casos corresponde a 84 mulheres com infecção genital pelo HPV que apresentavam anatomopatológico alterado. Já o grupo controle foi composto por 211 mulheres que apresentavam resultado negativo para HPV genital, através da técnica de PCR, e nenhuma alteração ao exame citopatológico da cérvix uterina. A técnica de amplificação refratária de mutações (ARMS-PCR) foi utilizada para a identificação do polimorfismo da IL-10. Regressão logística múltipla foi utilizada para verificar a associação das variáveis estudadas com o desfecho (infecção genital pelo HPV). O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências alélicas e genotípicas observadas são concordantes com as esperadas na população em estudo.

Resultados: A frequência genotípica observada no grupo de mulheres com infecção foi de 12,0% (AA), 29,0% (AG) e 59,0% (GG); a frequência alélica foi de 26,0% para A e 74,0% para G. No grupo controle, a frequência genotípica encontrada foi 22,0% (AA), 49,0% (AG) e 29,0% (GG); a frequência alélica foi de 47,0% para A e 53,0% para G. Houve diferença significativa entre os grupos estudados, tanto para a frequência alélica quanto para a genotípica ($p < 0,0001$). Entre as mulheres com infecção, encontramos associação das lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LGSIL) com o genótipo GG ($p = 0,02$). As variáveis idade (RC=4,70; IC95%: 2,61-8,40), co-infecção por HIV (RC=11,21; IC95%: 1,002-125,33) e o genótipo GG (RC=4,22; IC95%: 1,84-9,61) permaneceram independentemente associadas ao desfecho (infecção genital pelo HPV).

Conclusão: Os resultados sugerem que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL-10 pode estar associada à infecção pelo HPV e ao processo de

transformação maligna, mostrando a importância da resposta imunológica do hospedeiro no processo de infecção.

Palavras-Chave: IL-10, polimorfismo IL-10 (-1082), lesões cervicais, HPV.

Abstract

Background: The gene polymorphism in the IL-10 has been related to the susceptibility of the development of cancers. In Human Papillomavirus (HPV) infection, the IL-10 may present predominant to the pattern associated with the elimination of the virus, or associated with persistence of infection and progression to cervical lesions.

Objective: To evaluate the frequency of polymorphism -1082 A/G present in the promoter region of the gene of IL-10 and its role in the development of cervical lesions.

Material and method: A case-control study was conducted..The case group included 84 HPV positive women with abnormal anatomopathological results. The control group included 211 healthy women, which were HPV negative and had a normal cytology. The amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) technique applied to identify the polymorphism of the IL-10. Multiple logistic regression was used to verify the association between the study factors and the outcome (genital infection by HPV). The Hardy-Weinberg equilibrium was used to verify whether the observed allelic and genotypic frequencies were according with the expected in the studied population.

Results: The genotypic frequency observed among cases was 12.0% (AA), 29.0% (AG) and 59.0% (GG); the allelic frequency was 26.0% and 74.0% for A and G, respectively. In the control group, the genotypic frequency was 22.0% (AA), 49.0% (AG) and 29.0% (GG); the allelic frequency was 47.0% and 53.0% for A and G, respectively. There were significant differences between the groups, both for the allelic and for the genotypic frequencies ($p < 0.0001$). Among cases there was a significant association between the GG genotype and LGSIL lesions ($p = 0.021$). The variables age (OR=4.70; 95%IC: 2.61-8.40), HIV co-infection (OR=11.21; 95%IC: 1.002-125,33), and genotype GG (OR=4.22; 95%IC: 1.84-9.61) remained independently associated to the outcome (genital HPV infection).

Conclusion: The results suggest that the genetic predisposition for the interleukin high levels production may be related with cancer development, showing the importance of the immunologic response in the process of HPV infection and in the progression of cervical lesions caused by the Human Papillomavirus.

Keywords: IL-10, IL-10 (-1082) polymorphism, cervical lesion, HPV.

Introdução

Em todo o mundo, a incidência e a mortalidade do câncer cervical são superadas apenas pelas taxas de câncer de mama, ocupando o sétimo lugar em mortalidade na população total e o terceiro entre as mulheres^[1, 2]. Estima-se que cerca de 98,0% dos tumores cervicais estejam associados ao Papilomavírus Humano (HPV), indicando que a presença do vírus é fundamental para o desenvolvimento do câncer de colo uterino^[2].

As taxas de aquisição para a infecção por HPV são elevadas, principalmente em adultos jovens com vida sexualmente ativa^[2]. Diversos fatores sócio-comportamentais podem estar relacionados ao desenvolvimento de uma lesão precursora do câncer cervical associada ao HPV. Entre esses se destacam o comportamento sexual, a idade precoce de início da atividade sexual, multiplicidade de parceiros, multiparidade, tabagismo, uso prolongado de contraceptivos orais, precários hábitos de higiene pessoal e história de doenças sexualmente transmissíveis^[3, 4].

A resposta imune do hospedeiro também é um fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. A prevalência da infecção pelo HPV bem como a progressão para lesões displásicas ou mesmo o câncer é mais freqüente em mulheres imunodeficientes, quando comparado a mulheres imunocompetentes^[1].

As citocinas são moléculas importantes na defesa do organismo contra infecções virais. Elas podem atuar de forma indireta, através da determinação de um padrão de resposta imune ou diretamente pela inibição da replicação viral^[5]. Evidências clínicas sugerem uma regulação cruzada entre os diferentes padrões de citocinas na resposta imune do hospedeiro. Se por um lado, as citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon-gama (IFN- γ), induzem uma resposta imune efetiva contra infecções virais e neoplasias, por outro lado, citocinas imunoinibitórias, como a Interleucina 10 (IL-10), induzem uma resposta imune adaptativa, que é eficaz contra antígenos extracelulares, entretanto, permissiva ao desenvolvimento de tumores^[6].

Avaliações da produção de citocinas por linfócitos T do sangue periférico têm sido realizadas em mulheres portadoras de lesões cervicais em vários graus de gravidade, sugerindo que o desenvolvimento das lesões está associado, preferencialmente, ao padrão local de citocinas

imunoinibitórias, como no caso da IL-10^[6]. Os diferentes níveis secretados de IL-10 podem estar associados à eliminação do HPV, ou à persistência da infecção e progressão para lesões cervicais^[6].

Segundo Giannini *et al* (2002), níveis aumentados de IL-10 em mulheres com lesões cervicais infectadas pelo HPV em relação às mulheres saudáveis indicam a ocorrência de imunossupressão local, uma vez que a IL-10 estaria inibindo a apresentação de antígenos, a função das células T citotóxicas, a proliferação das células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias^[7].

Já foram descritos três polimorfismos simples de nucleotídeos (SNPs) na região promotora do gene da IL-10, nas posições -1082, -819 e -592. Estes parecem ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL-10^[8, 9]. Um estudo avaliando o polimorfismo -1082 observou que mulheres com câncer cervical portadoras do alelo G parecem estar imunogeneticamente predispostas a produzir altos níveis da IL-10. Além disso, foi observado que a prevalência do alelo associado à baixa produção (-1082 A) foi menor no grupo de mulheres com câncer cervical quando comparado com o grupo controle, no qual não foram observados alelos para alta produção. Estes resultados sugerem que a habilidade, geneticamente determinada, de produzir altos níveis da IL-10 pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer cervical^[10].

Frente a estas considerações, este estudo tem como objetivo verificar a associação entre o polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL-10 e a infecção genital pelo HPV.

Materiais e Métodos

Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo de caso-controle. O desfecho considerado para este estudo foi a infecção genital pelo HPV. Fazem parte do estudo uma amostra de mulheres que participaram de um estudo de Coorte, realizado no período de Fevereiro de 2003 a Dezembro de 2006^[11], em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Essas mulheres procuraram atendimento na Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, pertencente ao Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS) para a realização do exame citopatológico (preventivo) de colo uterino.

Todas as mulheres no momento da entrada no estudo não apresentavam queixas e/ou relatos ginecológicos.

O protocolo do estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em pesquisa do Centro Universitário Feevale e do Grupo Hospitalar Conceição (CEP – GHC). Todas as participantes assinaram um Termo de Consentimento Informado.

Amostra e Amostragem

Foram utilizadas amostras de lavado cérvico-vaginal de mulheres através de uma escova citológica (*cytobrush*) para a pesquisa de DNA viral e humano obtidas da ectocérvice. O transporte das amostras foi realizado em condições de baixas temperaturas e conservado à temperatura de -20°C até o momento da extração. O protocolo de extração de DNA utilizado foi descrito por Bauer^[12] e Coutlée^[13]. Todas as amostras foram avaliadas quanto à presença do DNA viral e genotipados para os tipos oncogênicos -16, -18 e -31.

Informações sobre as participantes e dados laboratoriais (citopatológico, colposcopia e anatomopatológico) foram extraídas da base de dados existentes para o estudo de coorte.

Para a avaliação do DNA humano dois grupos de mulheres (casos e controles) foram estudados.

Definição de Casos: foram considerados casos todas as mulheres desta base de dados que apresentavam infecção genital pelo HPV, detectadas através da técnica de PCR e com resultado anatomopatológico alterado. O número definido para o estudo foi de 84 casos.

Definição de Controles: foram considerados potenciais controles as mulheres HPV negativas e com resultado citológico sem alterações. Foram selecionadas de forma consecutiva 211 mulheres para o grupo controle.

Todas as mulheres elegíveis nesse estudo, tanto para o grupo de casos como para o grupo de controles preencheram os critérios acima, considerando uma proporção de 3 controles para cada caso (3:1), conferindo um poder de 80,0%.

Detecção do polimorfismo IL-10 -1082A/G

A detecção dos alelos A ou G na posição - 1082 na região promotora do gene da IL-10 foi realizada pela técnica de ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), descrita por Perrey^[14]. A seqüência dos *primers* utilizados na reação de PCR foram os seguintes:

IL-10 (-1082) *Primer* Genérico (antisense): 5'-cagtccaactgagaatttg-3'

IL-10 (-1082) *Primer* G (sense): 5'-ctactaaggcttcttgggac-3'

IL-10 (-1082) *Primer* A (sense): 5'-actactaaggcttcttgggaa-3'

O tamanho do produto amplificado corresponde a 258 pb.

Nas reações de PCR para cada alelo investigado, foram utilizados *primers* de controle interno para cada reação.

Primer de controle interno 1: 5'-gcctccaaccattccctta-3'

Primer de controle interno 2: 5'-tcacggattctgtgtgttc-3'

O tamanho do produto amplificado corresponde a 429 pb.

As reações foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), *primers* na concentração de 50 ng/ µl cada, 150 mM de Mg Cl₂, 200 mM de dNTP (Invitrogen), 1 µl de DNA e H₂O q.s.p.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas no termociclador MJ Research PTC 96. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de TEB 1X, contendo 0,5 mg/mL de Brometo de Etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

Análise Estatística

O Teste de Homogeneidade (χ^2 de *Pearson*) foi utilizado para comparação das variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho (infecção genital pro HPV); e o teste *t* de

student ou Mann-Whitney, para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho (infecção genital por HPV). O nível de significância de 5% foi utilizado nos testes de hipóteses.

A Razão de Chances (RC) foi estimada para as análises uni/bivariadas e multivariadas, através do método de Regressão Logística.

O software SPSS® (versão 16.0)^[16] foi utilizado para estas análises.

O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado a partir do software GraphPad Instat® (v. 3.06)^[17] e utilizado para verificar se as frequências alélicas e genotípicas observadas estavam de acordo com as frequências esperadas na população em estudo.

Resultados

As características sócio-comportamentais da população estudada encontram-se descritas na Tabela 1. Observaram-se diferenças significativas entre casos e controles em relação à média de idade ($p < 0,001$) e paridade ($p < 0,001$). Houve uma significância limítrofe com a idade na primeira relação sexual ($p = 0,06$), co-infecção por HIV ($p = 0,07$) e número de parceiros sexuais na vida ($p = 0,07$).

As variáveis sócio-comportamentais, como a multiplicidade de parceiros sexuais, multiparidade, tabagismo e o uso prolongado de anticoncepcional oral, também foram examinadas quanto a sua associação com o desenvolvimento de lesões e os tipos virais oncogênicos HPV-16, -18 e -31, mas não houve associação significativa entre essas variáveis.

A distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos nos dois grupos investigados é apresentada na Tabela 2. A frequência genotípica observada entre os casos foi de 12,0% (AA), 29,0% (AG) e 59,0% (GG); a frequência alélica foi de 26,0% para A e 74,0% para G. No grupo controle, a frequência genotípica encontrada foi 22,8% (AA), 48,8% (AG) e 28,4% (GG); a frequência alélica foi de 47,0% para A e 53,0% para G. Houve diferença significativa entre os grupos estudados, tanto para a frequência alélica quanto para a genotípica ($p < 0,001$). Através do Cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg verificamos que as frequências alélicas e genotípicas observadas foram concordantes com as frequências esperadas na população ($p < 0,001$).

Na Tabela 3 estão descritas as Razões de Chances brutas e ajustadas, com os correspondentes intervalos de confiança de 95%, para a associação entre as variáveis estudadas e o defecho. Observou-se uma associação significativa independente entre o grupo etário (RC=4,70; IC95%:2,61-8,40), co-infecção por HIV (RC=11,21; IC95%: 1,002-125,33) e o genótipo GG (RC=4,22; IC95%:1,84-9,61) com a infecção genital pelo HPV.

A Figura 1 mostra a distribuição dos genótipos do polimorfismo IL-10 -1082 em lesões de alto grau (HGSIL) e baixo grau (LGSIL). O genótipo GG foi o mais freqüente entre os casos, tanto nas lesões de alto grau (86,0%; $p=0,01$) quanto nas lesões de baixo grau (60,0%; $p=0,02$).

A freqüência de infecções por HPV-AR (alto risco) foi de 23,6% para HPV-16; 15,3% HPV-31 e 9,7% HPV-18, sendo que 41,0% dos casos apresentavam co-infecção com mais de um tipo viral. A freqüência dos genótipos de acordo com o tipo de HPV oncogênico (-16, -18 e -31) é apresentada na Figura 2. Das mulheres arroladas portadoras de HPV-16, 94,1% (16/17) apresentavam o alelo G; portadoras de HPV-18, 85,7% (6/7); e de HPV-31, 72,7% (8/11). Nas HGSIL, 66,3% apresentavam algum tipo de HPV investigado e nas LGSIL, 51,0%. Foi observada diferença significativa entre a distribuição da freqüência dos genótipos com tipos oncogênicos virais ($p=0,04$).

Discussão

Vários estudos têm avaliado a influência de fatores genéticos e produção de citocinas no desenvolvimento de lesões cervicais^[5, 18, 19, 20, 21]. As citocinas desempenham um papel fundamental na resposta imune do hospedeiro, sendo que a infecção pelo HPV pode apresentar diferentes formas de evolução, associadas com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais, ou com a eliminação do HPV^[22].

Normalmente as populações nas quais são verificadas as lesões cervicais apresentam uma média de idade entre 30-35 anos^[23], uma vez que o vírus pode manter-se na sua forma latente e se manifestar no decorrer dos anos. A média de idade encontrada neste estudo foi de 35,6 anos ($\pm 14,0$), corroborando com os achados de Schiffman et al (2007). No presente estudo, a idade mostrou-se independentemente associada à infecção genital por HPV (<35 anos).

Vários estudos têm sugerido uma associação significativa entre os tipos de lesões cervicais e dados sócio-comportamentais, como idade da primeira relação sexual, número de parceiros, uso de contraceptivos orais e tabagismo^[24, 25, 26, 27]. Um trabalho realizado por Sun-Kuie *et al* (2004) sugere que a combinação entre o uso de contraceptivo oral e tabagismo está associada a HGSIL^[28]. Em nosso estudo não foi observada associação entre fatores sócio-comportamentais e o desenvolvimento de lesões cervicais (LGSIL e HGSIL).

Com relação à co-infecção por HIV, mulheres infectadas pelo HPV tendem a desenvolver mais lesões escamosas (LGSIL) e neoplasias intraepiteliais cervicais (HGSIL)^[29]. No presente estudo, a co-infecção mostrou-se independentemente associada à infecção por HPV (RC=11,21; IC95%:1,002-125,33). No entanto, estes achados devem ser analisados com cautela, pois o tamanho amostral de mulheres com co-infecção foi muito pequeno (n=03).

As freqüências alélicas para o polimorfismo -1082 da IL-10 têm sido descritas para populações de diferentes etnias. Para populações caucasóides saudáveis, a freqüência do alelo A varia de 47,0-60,0% e do alelo G de 37,0-52,0%^[30], e foram similares às freqüências encontradas no presente estudo (A=51,0% e G=49,0%).

Alterações na expressão dos níveis da IL-10 têm sido avaliadas em vários estudos^[22, 31, 32, 33, 34]. O genótipo homozigoto AA do gene da IL-10 na região promotora -1082, relacionado à baixa expressão da citocina, foi associado com vários tipos tumorais, incluindo avançados melanomas cutâneos^[22], câncer de mama^[9] e câncer de próstata^[33], enquanto a expressão elevada da IL-10 proporcionada pelo genótipo GG parece estar relacionada ao câncer cervical^[34].

No presente estudo, a infecção por HPV e a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões cervicais apresentou associação para o polimorfismo -1082 G/G do gene da IL-10, corroborando com os achados de trabalhos prévios nos quais o alelo G esteve associado à infecção viral e às lesões cervicais^[10, 35]. Além disso, em 86,0% das lesões HGSIL esteve presente o genótipo GG. Estes resultados corroboram com os achados de estudo realizado por Bermúdez-Morales *et al* (2008) no qual o genótipo GG também foi observado em 62,0% das HGSIL e em 84,0% dos casos de câncer^[35]. Outros estudos também relatam uma alta freqüência do genótipo GG (IL-10) nas amostras cervicais de câncer, bem como em outros tipos tumorais^[22, 31, 33, 35].

Sabe-se que os tipos oncogênicos do HPV estão relacionados ao desenvolvimento de lesões cervicais e à progressão para o câncer cervical^[5]. Observamos diferenças significativas entre os tipos

oncogênicos de HPV-16, -18 e -31 e a presença dos alelos A/G da IL-10. Encontramos uma associação do HPV-16 com uma elevada expressão do alelo G (94,1%), seguido do HPV-18 e -31. Apesar de não existirem trabalhos mostrando a relação dos genótipos da IL-10 com os tipos de HPV, estudos avaliando os níveis dessa interleucina nas lesões indicam que a presença da infecção pelo HPV-16 parece influenciar os níveis desta citocina^[5, 35].

Conclusão

Polimorfismos envolvendo genes de citocinas podem contribuir como marcadores para a identificação de indivíduos com predisposição ao desenvolvimento de doenças, principalmente do câncer. Entretanto, é importante salientar que diversos fatores envolvidos na progressão da doença ainda são pouco compreendidos. Além disso, uma análise em conjunto de diferentes citocinas poderia revelar um panorama mais consistente.

Os resultados deste estudo sugerem que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL-10 pode estar associada à infecção genital por HPV, o que ratifica a importância da resposta imunológica do hospedeiro na história natural da infecção viral e na progressão de lesões cervicais.

As limitações que devemos considerar em nosso estudo foram devidas ao pequeno número de casos de mulheres com lesões graves (NIC III e câncer), pois a extração de DNA de biópsias de amostras cervicais em blocos de parafina é considerada um procedimento laborioso e, geralmente com poucos resultados satisfatórios.

Referências Bibliográficas

1. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (Editors). Cancer incidence in five continents. Lyon (France): IARC; 2002.
2. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virology*. 2005; 32(4): 16-24.
3. Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical cancer, treatment, and prevention. *Clin & Lab Sci*. 2001; 14(3): 183-6.
4. Villa LL. Human papillomavirus and Cervical Cancer. *J Clin Oncol*. 1997; 71(9): 321-41.
5. Fernandes AP, Gonçalves MA, Duarte G, Cunha FQ, Simões RT, Donadi EA. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology*. 2005; 334(2): 294-8.
6. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins DI. Quantitative analysis of IL-10 and INF-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol*. 2001; 195(2): 179-85.
7. Gianini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Inter J Cancer*. 2002; 97(5): 654-9.
8. Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement. *Eur J Immunogenetics*. 1999; 26(3): 135-223.

9. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun*. 2006; 7(4):269-76.
10. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer*. 2001; (94): 792-4.
11. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-7. Epub 2008 Sep 16.
12. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-8.
13. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H et al. Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiology*. 2002; 40(3): 902-7.
14. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha and TGF-beta-1 gene polymorphism. *Transplant Immunology*. 1999; 7(2): 127-8.
15. Ebrahimi N & Bilgili D. A new method of testing for Hardy–Weinberg equilibrium and ordering populations. *J Genetics*. 2007 April; 86:1-7.
16. *Statistical Package for Social Sciences* – SPSS (Pacote Estatístico para Ciências Sociais) Versão 16.0. <http://www.spss.com/statistics>.

17. GraphPad InStat 3.06. Analyse, Graph and Organize your data. Versão 3.06.
<http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>
18. Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 Oct;140(2):241-4. Epub 2008 May 27.
19. Song SH, Lee JK, Seok OS, Saw HS. The relationship between cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2007 Mar;104(3):732-8. Epub 2006 Dec 22.
20. Sharma A, Rajappa M, Saxena A, Sharma M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Jul-Aug;17(4):879-85. Epub 2007 Mar 5.
21. Passmore JA, Morroni C, Shapiro S, Williamson AL, Hoffman M. Papanicolaou smears and cervical inflammatory cytokine responses. *J Inflamm (Lond).* 2007 Apr 24;4:8.
22. Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *J Nutrition.* 2007; (137): 194-9.
23. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; (370): 890-7.

24. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*. 2005 Dec 20;117(6):1007-12.
25. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA et al. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):113-20.
26. Syrjänen K. New concepts on risk factors of HPV and novel screening strategies for cervical cancer precursors. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008;29(3):205-21.
27. Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M, Boniver J et al. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Jan 29;264(1-2):1-5. Epub 2006 Dec 4
28. Tay Sun-Kuie, Tay Kae-Jack. Passive cigarette smoking is a risk factor in cervical neoplasia. *Gynecologic Oncology*. 2004; (93): 116-20.
29. Krishnan A, Levine AM. Malignancies in women with HIV infection. *Womens Health (Lond Engl)*. 2008 Jul; 4(4):357-68.
30. Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-gamma in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinogenesis*. 2003; 3(2): 1477-3163.

31. Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Della Ragione F. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem.* 2003; (49):1664-7.
32. Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun.* 2001; (2): 25-31.
33. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; (62): 3369-72.
34. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997; 1-8.
35. Bermúdez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-González JM, Burguete A, Madrid-Marina V. Correlation Between IL-10 Gene Expression and HPV Infection in Cervical Cancer: A Mechanism for Immune Response Escape. *Cancer Investigation*, 2008; 26(10): 1037-43.

Tabela 1. Distribuição das variáveis sócio-comportamentais de acordo com o grupo de mulheres arroladas no estudo.

Variáveis	Controles (n=211)	Casos (n=84)	Valor de p
Cor da Pele			
Branca	84,2%	77,4%	
Não-branca	15,8%	22,6%	0,22*
Idade (média em anos e DP)	44,3 (11,6)	35,7 (13,7)	<0,001**
Escolaridade			
Até 1º. Grau Incompleto	30,2%	24,4%	
De 1º. Grau Completo a 2º. Grau Incompleto	35,6%	30,5%	0,22*
De 2º. Completo a 3º. Grau Completo	34,2%	45,1%	
Infecção por Chlamydia			
Sim	5,1%	7,2%	0,58*
Não	94,9%	92,8%	
Fumo			
Sim	23,4%	28,6%	0,43*
Não	76,6%	71,4%	
Uso de Contraceptivo oral			
Sim	95,4%	100,0%	0,12*
Não	4,6%	0,0%	
Co-Infecção pelo HIV			
Sim	0,5%	3,6%	0,07*
Não	99,5%	96,4%	
Sexarca (média em anos e DP)	19,4 (4,2)	18,4 (4,1)	0,06**
Parceiros Sexuais na Vida (média e DP)	4 (4,0)	6 (13,0)	0,07**
Paridade (média e DP)	1,7 (1,4)	2,8 (1,6)	0,01**

* Teste de Homogeneidade (χ^2 de Pearson);

** Valores de p para testes t-Student ou Mann-Whitney; DP: desvio padrão.

Tabela 2. Proporção genotípica e frequência alélica da IL-10 no grupo de casos e controles.

Variáveis	Controles (n=211)	Casos (n=84)	<i>p</i> *
Genótipo n(%)			
AA	48 (22,8%)	10 (11,9%)	
AG	103 (48,8%)	24 (28,6%)	<0,0001
GG	60 (28,4%)	50 (59,5%)	
Frequência Alélica (%)			
A	47,0%	26,0%	
G	53,0%	74,0%	<0,0001

* *Teste de Homogeneidade (χ^2 de Pearson).*

Tabela 3. Razões de Chance (RC) Brutas e Ajustadas das variáveis estudadas em relação à infecção genital por HPV.

Variáveis	RCbruta (IC95%)*	RCajustado (IC95%)**
Grupo Etário (em anos)		
≤ 34	4,76 (2,76-8,26)	4,70 (2,61-8,40)
≥ 35 (Ref.)	1,0	1,0
Cor		
Branca (Ref.)	1,0	1,0
Não Branca	1,5 (0,83-2,92)	1,83 (0,89-3,75)
Fumo		
Sim	1,31 (0,74-2,30)	1,10 (0,57-2,07)
Não (Ref.)	1,0	1,0
Sexarca		
< 20	1,44 (0,83-2,48)	1,07 (0,57-2,03)
≥20 (Ref.)	1,0	1,0
Uso de Contraceptivo Oral***		
Sim	0,72 (0,67-0,77)	-
Não	1,0	1,0
Parceiros Sexuais na Vida		
≤ 3 (Ref.)	1,0	1,0
> 3	1,42 (0,83-2,44)	1,02 (0,54-1,92)
Infecção por HIV		
Sim	7,94 (0,82-76,92)	11,21 (1,002-125,33)
Não (Ref.)	1,0	1,0
Genótipos IL-10		
AA	2,13 (1,02-4,45)	1,0
AG	6,03 (3,43-10,61)	1,12 (0,48-2,64)
GG	6,41 (3,29-12,5)	4,22 (1,84-9,61)

* RC brutas; ** RC ajustadas para todas as variáveis no modelo.

*** A variável Uso de Contraceptivo Oral foi excluída do modelo de regressão devido à pequena diferença (4,6%) existente entre casos e controles que utilizavam este método.

% de Indivíduos

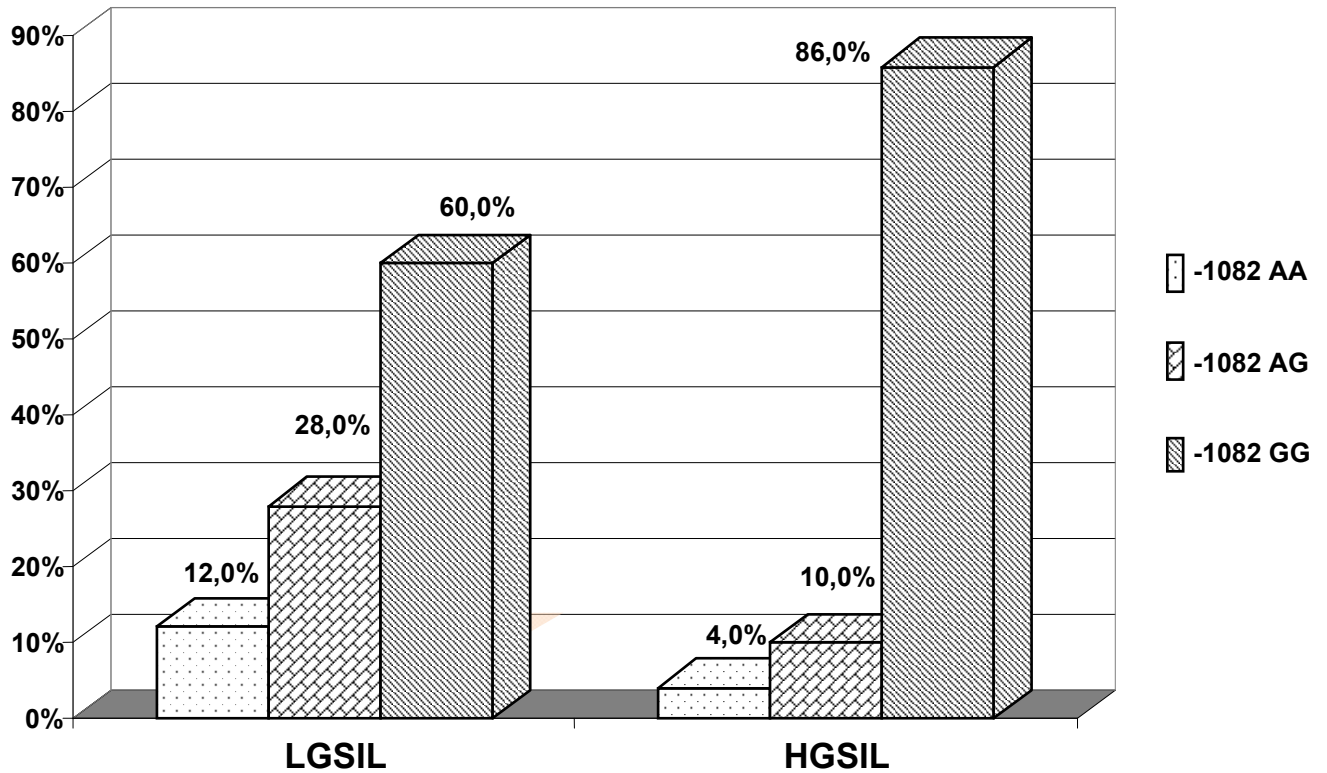


Figura 1. Frequências genóticas da IL-10 comparadas a lesões de alto (HGSIL) e baixo grau (LGSIL). LGSIL (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* - ASCUS, NIC I e alterações celulares devidas à infecção pelo HPV); HGSIL (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* - NIC II, NIC III e Câncer Cervical). Com o genótipo GG foi observada associação significativa com LGSIL (χ^2 ; $p=0,02$) e HGSIL (χ^2 ; $p=0,01$).

% de Indivíduos

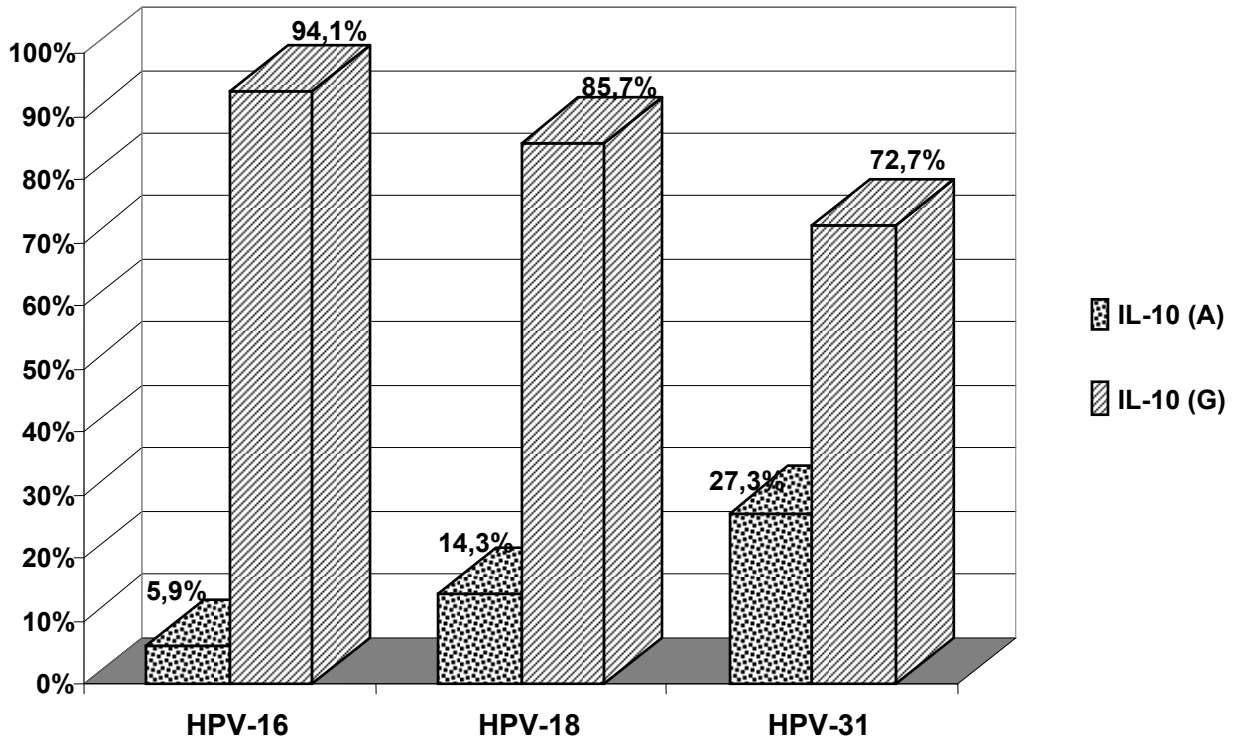


Figura 2. Distribuição das freqüências alélicas (IL-10 A/G) estudadas com os tipos virais oncogênicos (HPV-16, -18 e -31). Houve diferença significativa entre a distribuição da freqüência dos alelos com os tipos oncogênicos virais (χ^2 ; $p=0,04$).

ARTIGO II

***A case-control study of TNF α -308G/A polymorphism as a risk factor for high-risk
Human Papillomavirus (HPV) infection and cervical lesions***

A case-control study of TNF α -308G/A polymorphism as a risk factor for high-risk Human Papillomavirus (HPV) infection and cervical lesions

Cristine Nascente Igansi¹, Gabriela Tonini¹, Viviane Kubiszewski dos Santos^{2,3}, Maria Lúcia da Rosa Rossetti², Sabrina Esteves de Matos Almeida⁴, Miriam Alice Frantz⁴, Mary Clarisse Bozzetti¹

¹ Postgraduate Program in Epidemiology at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Center of Scientific and Technological Development (CDCT) of Central Laboratory (LACEN), Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ University Center FEEVALE of Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵ Department of Social Medicine, Faculty of Medicine at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

This research was funded by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil; University Center FEEVALE, Brazil; MC Bozzetti is a recipient of a research award from the CNPq.

Corresponding Author:

Cristine Nascente Igansi, MD, MSc

Rua São Simão, 836/203. Bairro Jardim do Salso – CEP 91420-560 – Porto Alegre, RS – Brazil

Phone: + 55 51 33985549

E-mail: cnascente@gmail.com

Resumo

Introdução: O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) é uma citocina pertencente à Classe Th1, envolvida na resposta inflamatória, anti-viral e anti-tumoral. Na infecção pelo HPV, o TNF- α pode apresentar redução dos seus níveis intralesionais, dependendo do tipo infectante e da agressão viral.

Objetivos: Avaliar a associação do polimorfismo presente na região promotora (-308) do gene do TNF- α com a infecção genital pelo HPV, incluindo os tipos oncogênicos (HPV-16, -18 e -31).

Material e métodos: Trata-se de um estudo de caso-controle. O grupo de casos corresponde a 84 mulheres com infecção genital pelo HPV que apresentavam anatomopatológico alterado. Já o grupo controle foi composto por 203 mulheres que apresentavam resultado negativo para HPV genital, através da técnica de PCR, e nenhuma alteração ao exame citopatológico da cérvix uterina. A técnica de amplificação refratária de mutações (ARMS-PCR) foi utilizada para a identificação do polimorfismo -308 A/G no gene do TNF- α . A caracterização do vírus em tipos oncogênicos (HPV-16, -18 -31) foi realizada pela técnica de PCR, com *primers* para a região E6 e E7 do genoma viral. Regressão logística múltipla foi utilizada para verificar a associação das variáveis estudadas com o desfecho (infecção genital pelo HPV). O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências alélicas e genotípicas observadas são concordantes com as esperadas na população em estudo.

Resultados: A homozigidade do alelo G (genótipo GG) foi encontrada em maior frequência nos casos (36,9%), seguido por 35,7% do genótipo AA e 27,4% do genótipo AG. Houve diferença significativa entre os grupos estudados, tanto para a frequência alélica ($p < 0,0002$) quanto para a genotípica ($p < 0,0001$). Observamos uma associação do genótipo GG com o tipo oncogênico HPV-16 ($p < 0,05$), com a co-infecção pelo vírus HIV ($p < 0,001$) e LGSIL ($p < 0,01$). As variáveis idade (RC=3,46; IC95%: 1,89-6,33), os genótipos AG (RC=9,21; IC95%: 4,29-19,75) e AA (RC=2,73; IC95%: 1,25-6,00) permaneceram independentemente associados ao desfecho (infecção genital pelo HPV).

Conclusão: Os achados deste estudo sugerem que o polimorfismo -308 G/G do gene do TNF- α possa estar associado com a infecção genital por tipos oncogênicos de HPV e com lesões de baixo grau (LGSIL)

Palavras-Chave: TNF- α , polimorfismo TNF- α (-308), lesões cervicais, HPV-AR.

Abstract

Background: The tumor necrosis factor (TNF- α) is a cytokine belonging to Class Th1, involved in inflammatory response, anti-viral and anti-tumor. In HPV infection, the TNF- α can reduce the levels present intralesional, depending on the type of aggression and infecting virus.

Objective: To evaluate the association of this polymorphism in the promoter region (-308) of the TNF- α gene with genital HPV infection, including oncogenic types (HPV-16, -18 e -31).

Material and method: A case-control study was performed. The case group included 84 HPV positive women with abnormal anatomopathological results. The control group included 203 healthy women, which were HPV negative and had a normal cytology. The amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) technique was applied to identify the -308 A/G polymorphism of the gene TNF- α . The characterization of the virus in oncogenic types (HPV-16, -18 -31) was performed by the technique of PCR with *primers* for the region E6 and E7 viral genome.

Multiple logistic regression was used to verify the association between the study factors and the outcome (genital infection by HPV). The Hardy-Weinberg equilibrium was used to verify whether the observed allelic and genotypic frequencies were according with the expected in the studied population.

Results: The homozygosity of the G allele (GG genotype) was found in higher frequency in cases (36.9%), followed by 35.7% of the genotype AA and 27.4% of genotype AG. There were significant differences between groups, both for the allelic frequency ($p < 0.0002$) and to the genotypic ($p < 0.0001$). Our results suggest an association between GG genotype with oncogenic type HPV-16 ($p < 0.05$), the HIV virus co-infection ($p < 0.001$) and LGSIL ($p < 0.01$). The variables age (OR=3.46; 95%IC: 1.89-6.33), genotypes AG (OR=9.21; 95%IC: 4.29-19.75) and AA (OR=2.73; 95%IC: 1.25-6.00) remained independently associated to the outcome (genital HPV infection).

Conclusion: The results suggest that the -308 G/G polymorphism of TNF- α gene may be associated with high-risk genital HPV infection and low-grade lesions (LGSIL). The variables age (OR=3.46; 95%IC: 1.89-6.33), genotypes AG (OR=9.21; 95%IC: 4.29-19.75) and AA (OR=2.73; 95%IC: 1.25-6.00) remained independently associated to the outcome (genital HPV infection).

Keywords: TNF- α , TNF- α (-308) polymorphism, cervical lesion, HR-HPV.

Introdução

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV), em especial pelos tipos oncogênicos HPV-16 e -18 é o principal fator etiológico para a transformação maligna de células cervicais^[1, 2]. Mas já está bem estabelecido que somente a infecção viral não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical, estando outros fatores envolvidos no processo carcinogênico^[3, 4]. Alguns estudos epidemiológicos associam a predisposição genética ao câncer, fatores comportamentais e imunológicos como sendo co-fatores que possam atuar juntamente com a infecção viral^[3, 4].

A resposta imune no epitélio cervical exerce um importante papel na patogênese do câncer de colo uterino. Muitas citocinas que modulam o controle imunológico estão relacionadas com o desenvolvimento desta patologia, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória importante na resposta imune que é secretado por macrófagos ativados. Há dois tipos de polimorfismos descritos no gene do TNF- α . Um deles ocorre dentro da região promotora (-308 e -238) e o outro na região codificante (+498)^[5, 6].

Estudos sugerem que a citocina TNF- α induz a carcinogênese através da proliferação, invasão e metástases de células tumorais^[6, 7]. A habilidade de produzir baixo, médio e alto nível de TNF- α é geneticamente determinada e o desenvolvimento do tumor está intimamente relacionado com a capacidade de o hospedeiro produzir altos níveis desta citocina. Muitos estudos têm investigado a associação entre o efeito do polimorfismo -308A/G na região promotora do TNF- α e o câncer cervical, mas os resultados têm sido contraditórios^[7, 8, 9, 10].

Um estudo realizado por Kirkpatrick et al (2004) com mulheres britânicas e diagnosticadas com lesões intra-epiteliais cervicais, observou uma frequência significativamente aumentada do genótipo secretor GG (nível baixo de citocina) entre todas as lesões presentes, particularmente entre as LGSIL, comparadas ao grupo controle.

Baseado nas evidências de que variantes genéticas na região promotora deste gene possam estar envolvidos na carcinogênese, investigamos uma possível associação entre o polimorfismo bialélico (-308A/G) na região promotora usando a técnica ARMS-PCR e a presença de infecção genital pelo HPV, incluindo os tipos oncogênicos HPV-16, -18 e -31.

Materiais e Métodos

Delineamento do Estudo e População

Trata-se de um estudo de casos e controles. O desfecho considerado para este estudo foi a infecção genital pelo HPV. Fazem parte do estudo uma amostra de mulheres que participaram de um estudo de Coorte, realizado no período de Fevereiro de 2003 a Dezembro de 2006^[11], em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Essas mulheres procuraram atendimento na Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, pertencente ao Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS) para a realização do exame citopatológico (preventivo) de colo uterino. Todas as mulheres no momento da entrada no estudo não apresentavam queixas e/ou relatos ginecológicos.

Todas as participantes assinaram um Termo de Consentimento Informado.

Definição de Casos: foram considerados casos todas as mulheres desta base de dados que apresentavam infecção genital pelo HPV, detectadas através da técnica de PCR e com resultado anatomopatológico alterado. Um total de 84 foi considerado o grupo de casos.

Definição de Controles: foram considerados potenciais controles as mulheres que eram HPV negativas e com resultado citológico sem alterações. Foram selecionados de forma consecutiva 203 mulheres para o grupo controle.

Todas as mulheres elegíveis nesse estudo, tanto para o grupo de casos como para o grupo de controles preencheram os critérios acima, considerando uma proporção de 3 controles para cada caso (3:1), conferindo um poder de 80,0%.

Amostras de lavado cérvico-vaginal para a pesquisa de DNA viral e humano foram obtidas durante a coleta do exame citopatológico. Informações sobre as participantes e dados laboratoriais (citopatológico, colposcopia e anatomopatológico) foram extraídos da base de dados do estudo de coorte. O protocolo de extração de DNA utilizado foi descrito por Bauer^[12] e Coutlée^[13].

Detecção de DNA-HPV-AR

As amostras cervicais foram obtidas utilizando escovas (*cytobrush*) e o material foi acondicionado em solução salina de Tris-EDTA (TE 1x pH 8,0), submetidos à refrigeração de -20°C até o momento da extração de DNA.

Após o protocolo de extração^[12, 13], o DNA foi submetido à amplificação para os tipos virais oncogênicos tipos -16, -18 e -31 com *primers* específicos para a região E6 e E7 do genoma viral, segundo Jacobs *et al* (1997)^[14].

Genotipagem Citoquina TNF- α -308A/G

A detecção dos alelos A ou G na posição -308 na região promotora do gene do TNF- α foi realizada pela técnica de ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), descrita por Perrey^[15]. A seqüência de *primers* utilizados na reação de PCR foram os seguintes:

TNF- α (-308) *Primer Genérico (antisense):* 5'-tctcggtttctctccatcg-3'

TNF- α (-308) *Primer G (sense):* 5'-ataggtttgaggggcatgg-3'

TNF- α (-308) *Primer A (sense):* 5'-aataggtttgaggggcatga-3'

O tamanho do produto amplificado é de 184 pb.

Nas reações de PCR para cada alelo investigado, foram utilizados *primers* de controle interno para cada reação.

Primer de controle interno 1: 5'-gcctccaaccattccctta-3'

Primer de controle interno 2: 5'-tcacggattctgtgttttc-3'

O tamanho do produto amplificado é de 429 pb.

As reações foram realizadas em volume final de 25 μ l, contendo 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), *primers* na concentração de 50 ng/ μ l cada, 150 mM de Mg Cl₂, 200 mM de dNTP (Invitrogen), 1,5 μ l de DNA e H₂O q.s.p.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas no termociclador MJ Research PTC 96. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão de TEB 1X, contendo 0,5 mg/mL de Brometo de Etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

Análise Estatística

O Teste de Homogeneidade (χ^2 de *Pearson*) foi utilizado para comparação das variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho (infecção genital por HPV); e o teste *t de student* ou Mann-Whitney, para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho (infecção genital por HPV). O nível de significância de 5% foi utilizado nos testes de hipóteses.

A Razão de Chances (RC) foi estimada para as análises uni/bivariadas e multivariadas, através do método de Regressão Logística.

O software SPSS® (versão 16.0)^[16] foi utilizado para estas análises^[16].

O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado a partir do software GraphPad Instat® (v. 3.06)^[17] e utilizado para verificar se as frequências alélicas e genotípicas observadas estão de acordo com as frequências esperadas na população em estudo.

Resultados

Características da População em Estudo

As características sócio-comportamentais da população estudada encontram-se descritas na Tabela 1. Observaram-se diferenças significativas entre casos e controles em relação à média de idade ($p < 0,001$) e paridade ($p < 0,001$). Houve uma significância limítrofe com a idade na primeira relação sexual ($p = 0,06$), co-infecção por HIV ($p = 0,07$) e número de parceiros sexuais na vida ($p = 0,07$).

Polimorfismo -308 no gene TNF- α

Entre os casos, a homoziguidade do alelo A (AA), que confere um *status* elevado de produção do TNF- α , foi de 35,7%; a heteroziguidade (AG) foi de 27,4% e a homoziguidade do alelo G (GG), *status* de baixa produção, foi de 36,9%. As freqüências alélicas foram de 51,0% para G e de 49,0% A.

Entre os controles, a freqüência genotípica foi de 22,2% (AA), 69,5% (AG) e 8,4% (GG). As freqüências alélicas foram de 43,0% para G e de 57,0% A (Tabela 2).

Houve diferença significativa entre os grupos estudados, tanto para a freqüência alélica ($p < 0,0002$) quanto para a genotípica: AA ($p = 0,03$), AG e GG ($p < 0,0001$).

Freqüências do polimorfismo TNF- α e lesões cervicais

Neste estudo, 72,2% dos casos apresentavam lesões escamosas intra-epiteliais de baixo grau (LGSIL) e 27,8% lesões de alto grau (HGSIL).

A Tabela 2 mostra as freqüências do polimorfismo na posição -308 comparadas entre mulheres com citologia normal e mulheres com diferentes graus de lesões cervicais. Foi observada associação positiva estatisticamente significativa do fenótipo -308/GG (baixo nível secretor) com as lesões cervicais, quando comparada ao grupo de mulheres com citologia normal ($p = 0,017$).

Com relação aos resultados do exame anatomopatológico, 36,8% dos casos com lesões LGSIL e 31,8% com HGSIL eram portadoras do genótipo AA enquanto que, 28,1% dos casos com LGSIL e 59,1% das HGSIL eram portadoras do genótipo GG. Foi observada associação significativa dos genótipos com as lesões LGSIL quando comparada às lesões HGSIL ($p = 0,01$) (Figura 1).

Freqüência dos Tipos Oncogênicos HPV-16, -18 e -31

Das 84 mulheres infectadas pelo HPV, 41,6% apresentaram algum tipo oncogênico de HPV. Destas, 23,6% foram positivas para HPV-16, seguida pelo HPV-31, com 15,3% e pelo HPV-18, 9,7%.

Ao avaliar a associação da infecção por estes tipos oncogênicos com o polimorfismo -308 do gene TNF- α , observou-se que o genótipo GG está relacionado ao HPV-16 ($p = 0,05$). Houve uma maior freqüência (52,9%) do HPV-16 em relação ao genótipo GG; do HPV-18 e -31, com o genótipo AA (42,9%) e (54,5%), respectivamente (Figura 2).

Polimorfismo TNF- α e Características Sócio-Comportamentais

Na análise multivariada, através de Regressão Logística, observou-se uma associação independente das variáveis idade (RC=3,46; IC95%:1,89-6,33), os genótipos AA (RC=2,73; IC95%:1,25-6,00) e AG (RC=9,21; IC95%:4,29-19,75) com o desfecho (infecção genital por HPV).

Discussão

Nesse estudo, avaliamos o polimorfismo -308 do gene TNF- α como uma citocina que possa influenciar na resposta para a infecção por HPV de alto risco, atuando como fator anti-tumoral (regressão de lesões cervicais) ou como um precursor para a progressão de HGSIL para o câncer cervical.

A maioria de nossos casos eram portadoras do genótipo AG e GG. Em relação às lesões LGSIL e HGSIL, o genótipo AA também foi representativo. Nas HGSIL, em 59,1% dessas está presente o genótipo GG.

Diversos estudos têm investigado as possíveis contribuições dos polimorfismos das citocinas e a prevalência de câncer cervical, bem como a associação com tipos oncogênicos virais^[9, 19, 20, 21]; entretanto, apenas alguns estudos têm avaliado a associação entre o polimorfismo -308 TNF- α e lesões cervicais entre mulheres portadoras do HPV^[21, 22].

Kirkpatrick et al (2004), em seu estudo com mulheres britânicas e diagnosticadas com lesões intra-epiteliais cervicais, observou uma frequência significativamente aumentada do genótipo secretor GG (nível baixo de citocina) entre todas as lesões presentes, particularmente entre as LGSIL, comparadas ao grupo controle^[22]. Nossos resultados corroboram com esses achados de Kirkpatrick et al (2004) e com os dados de Fernandes *et al* (2008), com 78,6% de frequência deste haplótipo nos casos^[1].

Duarte et al (2005) em seu estudo caso-controle, observou que o genótipo AA, raro haplótipo na população, foi mais frequente nos casos (29,2%) do que nos controles (18,0%)^[6]. Estes achados também corroboram com os dados encontrados no presente trabalho, no qual o grupo de casos apresentou 35,7% do genótipo AA, e o grupo controle, 22,2%. Em relação às lesões cervicais, esse haplótipo (AA) esteve presente em 36,8% das LGSIL e em 31,8% das HGSIL.

O alelo A foi o mais freqüente entre os casos. As mulheres com infecção por HPV têm em torno de 2,7 vezes a chance de serem portadoras do alelo A quando comparadas aos controles (AA; RC=2,73; IC95%:1,25-6,00). Os casos também apresentaram 9,2 vezes a chance de serem portadores dos alelos combinados (A/G) quando comparados aos controles (AG; RC=9,21; IC95%: 4,29-19,75).

Duarte e colaboradores (2005) sugerem que o polimorfismo -308A possa representar um aumento no risco para a progressão de câncer cervical, pois a freqüência desse alelo é maior nas mulheres com câncer do que no grupo controle^[6].

Segundo Balasubramanian et al (2002), o risco associado ao desenvolvimento de lesões com o aumento nos níveis de TNF- α pode ser devido ao fato de que esta citocina é considerada um potencial indutor do fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*), promovendo a angiogênese – formação de novos vasos sanguíneos – no local da inflamação. Este processo aumenta a probabilidade de crescimento e dispersão de células malignas (metástase)^[23].

O alelo A induz a capacidade geneticamente programada de produzir altos níveis de TNF- α , e esta, atuando sozinha, não consegue exercer efeito citotóxico nas células infectadas pelo HPV^[23].

Muitos estudos têm reportado que a infecção persistente por tipos oncogênicos (HPV-16, -18, -31 e -45) produz uma inflamação crônica no epitélio cervical, envolvendo a resposta imune não-específica do hospedeiro^[24, 25, 26]. Isto inclui a liberação de citocinas no local da infecção, fornecendo um crescimento preferencial vantajoso para células cervicais anormais *in vivo*^[4].

Pelo fato do gene TNF- α ser particularmente difícil de ser estudado isoladamente, pois faz parte de um complexo da classe III do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) e pode ser influenciado por outros genes, o efeito desta citocina tem sido relatado de forma controversa na literatura. Segundo Eksteen et al (2001), o gene do TNF- α pode atuar como fator necrótico de tumores, promotor do comportamento tumoral, bem como relativa proteção contra a progressão de LGSIL a HGSIL^[27].

Stanczuk et al (2003) não encontrou diferenças significativas na distribuição dos níveis de produção (baixa, média e alta) desta citocina entre mulheres com câncer e mulheres saudáveis^[9]. Govan et al (2006), corroborando com os achados de Stanczuk, também não observaram relação entre o polimorfismo -308 TNF- α e o desenvolvimento de câncer cervical, em mulheres do Sul da África^[28]. Entretanto, alguns estudos discordam com estes achados. Segundo Ghaderi et al (2002) e

Calhoun et al (2002), os dados encontrados sugerem que o polimorfismo -308 TNF- α aumenta significativamente a susceptibilidade à neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I)^[7, 10].

Segundo Bachmann et al (2002), o TNF- α atua fortemente no controle imunológico das displasias cervicais entre mulheres infectadas com HPV-AR-16 e -18^[29]. Kirkpatrick e colaboradores (2004), avaliando a frequência do polimorfismo -308 TNF- α e a presença de tipos oncogênicos de HPV observaram que a maioria dos casos com algum tipo de infecção por HPV-AR, 74,0% apresentaram o fenótipo de baixa secreção da citocina (genótipo GG)^[22]. No presente estudo, observou-se uma associação significativa entre o genótipo GG e a infecção por HPV-AR-16.

Segundo Fernandes *et al* (2005), a infecção pelos tipos oncogênicos HPV-16 e HPV-18 predispõe ao predomínio de citocinas do padrão Th2 (IL-10), mostrado pelo aumento nos níveis intralesionais da IL-10 e redução de IFN- γ e TNF- α (padrão Th1), respectivamente. A infecção pelo HPV-18 parece ser mais agressiva do que pelo HPV-16, sendo que as casos infectadas pelo tipo viral 18 mostraram redução dos níveis intralesionais de citocinas do padrão Th1 (IFN- γ e TNF- α)^[30].

Com relação à infecção por HIV, há poucos estudos na literatura que descrevem esta associação^[30, 31]. A infecção pelo HIV propicia uma inadequada resposta imune local com a mudança do padrão de ação das citocinas Th2, pois ocorre uma disfunção do sistema imune, reduzindo o número de linfócitos T-CD4⁺ e uma reversão na razão de CD4: CD8^[31].

Estas alterações predispõem a mulher à progressão de lesões cervicais de alto grau e conforme a gravidade da lesão, menor o número de células CD4⁺^[21]. No presente estudo, verificou-se uma associação entre mulheres HIV positivas e o polimorfismo -308 do gene do TNF- α , e observou-se que o genótipo GG parece estar relacionado a esta infecção.

Conclusão

Face aos dados apresentados sobre a associação da infecção pelo HPV com o câncer cervical e à escassez de estudos que abordassem a importância do sistema imune no desenvolvimento de lesões cervicais, pode-se sugerir que o polimorfismo -308 no gene do TNF- α poderia estar associado à infecção genital por tipos oncogênicos de HPV, bem como às lesões cervicais provocadas por esta infecção.

As limitações que devemos considerar em nosso estudo foram devidas ao pequeno número de casos de mulheres com lesões graves (NIC III e câncer), pois a extração de DNA de biópsias de amostras cervicais em blocos de parafina é considerada um procedimento laborioso e, geralmente, não se obtém resultados satisfatórios.

Referências Bibliográficas

1. Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 140(2):241-4.
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr;55(4):244-65.
3. Santos AM, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Pereira D, Vasconcelos A, et al. TP53 codon 72 polymorphism and risk for cervical cancer in Portugal. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Jun;159(2):143-7.
4. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan;4(1):11-22.
5. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Feb 5;89(3):245-50.
6. Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, et al. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 26;334(2):588-92.
7. Calhoun ES, McGovern RM, Janney CA, Cerhan JR, Iturria SJ, Smith DI, et al. Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer. *Clin Chem.* 2002; 48(8):1218-24.
8. Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, Wheeler CM. TNF- α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16-Associated Cervical Cancer. *J Infect Dis.* 2005; 191(6):969-76.

9. Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2003 Mar-Apr;13(2):148-53.
10. Ghaderi M, Nikitina L, Peacock CS, Hjelmström P, Hallmans G, Wiklund F, et al. Tumor necrosis factor a-11 and DR15-DQ6 (B*0602) haplotype increase the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Oct;9(10):1067-70.
11. da Rosa MI. O Papilomavírus Humano e Lesões do Colo Uterino. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, 2007. 195pp.
12. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-8.
13. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiology*. 2002; 40(3): 902-7.
14. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6+-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997; (35):791-5.
15. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNK-alpha and TGF-beta-1 gene polymorphism. *Transplant Immunology*. 1999; 7(2): 127-8.

16. Ebrahimi N & Bilgili D. A new method of testing for Hardy–Weinberg equilibrium and ordering populations. *J Genetics*. 2007 April; 86:1-7.
17. *Statistical Package for Social Sciences – SPSS* (Pacote Estatístico para Ciências Sociais). Versão 16.0. <http://www.spss.com/statistics>.
18. GraphPad InStat 3.06. Analyse, Graph and Organize your data. Versão 3.06. <http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>.
19. Roh JW, Kim MH, Seo SS, Kim SH, Kim JW, Park NH, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett*. 2002 Oct 8;184(1):57-63.
20. Stanczuk GA, Tswana SA, Bergstrom S, Sibanda EN. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Immunogenet*. 2002 Oct; 29(5):417-21.
21. Rocha RMA del R. Fatores associados ao desenvolvimento de lesões cervicais em mulheres mexicanas. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP, 2008. 134pp.
22. Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, Glew S. TNFalpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol*. 2004; 92(2):675-9.
23. Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MWR. Role of genetic polymorphism in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 2002; (87):1057-1065.
24. zur Hausen H. Papillomavirus causing câncer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000; (92):690-698.

25. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001; (286): 3106-3114.
26. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev. Immunol*. 2004; (4):46-54.
27. Eksteen JA, Scott PA, Perry I, Jankowski JA. Inflammation promotes Barrett's metaplasia and cancer: a unique code role for TNF- α . *Eur J Cancer Prev*. 2001; (10):163-66.
28. Govan VA, Constant D, Hoffman M, Williamson AL. The allelic distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer*. 2006 Jan 26;6:24.
29. Bachmann A, Hanke B, Zawatzky R, Soto U, van Riggelen J, zur Hausen H, et al. Disturbance of tumor necrosis factor alpha-mediated beta interferon signaling in cervical carcinoma cells. *J Virol*. 2002 Jan;76(1):280-91.
30. Fernandes AP, Gonçalves MA, Duarte G, Cunha FQ, Simões RT, Donadi EA. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology*. 2005; 334(2):294-8.
31. Dolei A, Curreli S, Marongiu P, Pierangeli A, Gomes E, Bucci M, et al. Human immunodeficiency virus infection in vitro activates naturally integrated human papillomavirus type 18 and induces synthesis of the L1 capsid protein. *J Gen Virol*. 1999 Nov;80 (Pt 11):2937-44.

Tabela 1. Distribuição das variáveis sócio-comportamentais de acordo com o grupo de mulheres arroladas no estudo.

Variáveis	Controles (n=203)	Casos (n=84)	Valor de p
Cor da Pele			
Branca	84,2%	77,4%	
Não-branca	15,8%	22,6%	0,22*
Idade (média em anos e DP)	44,3 (11,6)	35,7 (13,7)	<0,001**
Escolaridade			
Até 1º. Grau Incompleto	30,2%	24,4%	
De 1º. Grau Completo a 2º. Grau Incompleto	35,6%	30,5%	0,22*
De 2º. Completo a 3º. Grau Completo	34,2%	45,1%	
Infecção por Chlamydia			
Sim	5,1%	7,2%	0,58*
Não	94,9%	92,8%	
Fumo			
Sim	23,4%	28,6%	0,43*
Não	76,6%	71,4%	
Uso de Contraceptivo oral			
Sim	95,4%	100,0%	0,12*
Não	4,6%	0,0%	
Co-Infecção pelo HIV			
Sim	0,5%	3,6%	0,07*
Não	99,5%	96,4%	
Sexarca (média em anos e DP)	19,4 (4,2)	18,4 (4,1)	0,06**
Parceiros Sexuais na Vida (média e DP)	4 (4,0)	6 (13,0)	0,07**
Paridade (média e DP)	1,7 (1,4)	2,8 (1,6)	0,01**

* Teste de Homogeneidade (χ^2 de Pearson);

** Valores de p para testes t-Student ou Mann-Whitney; DP: desvio padrão.

Tabela 2. Frequência alélica e genotípica de TNF- α no grupo de casos e controles.

Variáveis	Controles (n=203)	Casos (n=84)	p^*
Genótipo			
AA	45 (22,2%)	30 (35,7%)	0,03
AG	141 (69,5%)	23 (27,4%)	<0,0001
GG	17 (8,4%)	31 (36,9%)	<0,0001
Frequência Alélica			
A	57,0%	49,0%	
G	43,0%	51,0%	<0,0002

* *Teste de Homogeneidade (χ^2 de Pearson);*

Tabela 3. Distribuição da frequência genotípica entre mulheres com citologia normal, LGSIL e HGSIL.

Variáveis	Citologia Normal (n=203)	§LGSIL** (n=57)	△HGSIL** (n=22)	Valor de p^*
Polimorfismo TNF-α (Fenótipo Secretor)				
AA/AG (Alto)	186 (83,8%)	41 (71,9%)	9 (40,9%)	0,02
GG (Baixo)	17 (8,4%)	16 (28,1%)	13 (59,1%)	0,02

* *Teste de Homogeneidade (χ^2 de Pearson);*

§ LGSIL - *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Escamosa Intra-Epitelial de Baixo Grau): ASCUS, AGUS e NIC I.

△ HGSIL - *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Escamosa Intra-Epitelial de Alto Grau): NIC II, NIC III e Câncer Invasor.

** *N amostral LGSIL e HGSIL = 79 (foram excluídas da análise as mulheres para as quais não foi possível realizar a tipagem para o polimorfismo -308 TNF- α). Dos 84 casos presentes nesse estudo, somente 79 foram analisados, devido ao insuficiente material cérvico-vaginal,*

Tabela 4. Razões de Chance (RC) Brutas e Ajustadas das Variáveis estudadas em relação à infecção genital por HPV

Variáveis	RCbruta (IC95,0%)*	RCajustado (IC95,0%)**
Grupo Etário (em anos)		
≤ 34	4,76 (2,76-8,26)	3,46 (1,89-6,33)
≥ 35 (Ref.)	1,0	1,0
Cor		
Branca (Ref.)	1,0	1,0
Não Branca	1,5 (0,83-2,92)	1,77 (0,85-3,69)
Fumo		
Sim	1,31 (0,74-2,30)	1,02 (0,51-2,06)
Não (Ref.)	1,0	1,0
Sexarca		
< 20	1,44 (0,83-2,48)	1,30 (0,67-2,53)
≥20 (Ref.)	1,0	1,0
Parceiros Sexuais na Vida		
≤ 3 (Ref.)	1,0	1,0
> 3	1,42 (0,83-2,44)	1,01 (0,52-1,96)
Uso de Anticoncepcional Oral***		
Sim	0,72 (0,67-0,77)	-
Não (Ref.)	1,0	1,0
Infecção por HIV****		
Sim	7,94 (0,82-76,92)	-
Não (Ref.)	1,0	1,0
Genótipos TNF-α		
AA	1,95 (1,12-3,40)	2,73 (1,25-6,00)
AG	6,03 (3,43-10,61)	9,21 (4,29-19,75)
GG	6,41 (3,29-12,5)	1,0

* RC brutas; ** RC ajustadas para todas as variáveis no modelo.

*** A variável Uso de Contraceptivo Oral foi excluída do modelo de regressão devido à pequena diferença (4,6%) existente entre casos e controles que utilizavam este método.

****A variável Infecção por HIV foi excluída do modelo de regressão devido ao pequeno número de mulheres portadoras (n=4), não sendo possível realizar a modelagem.

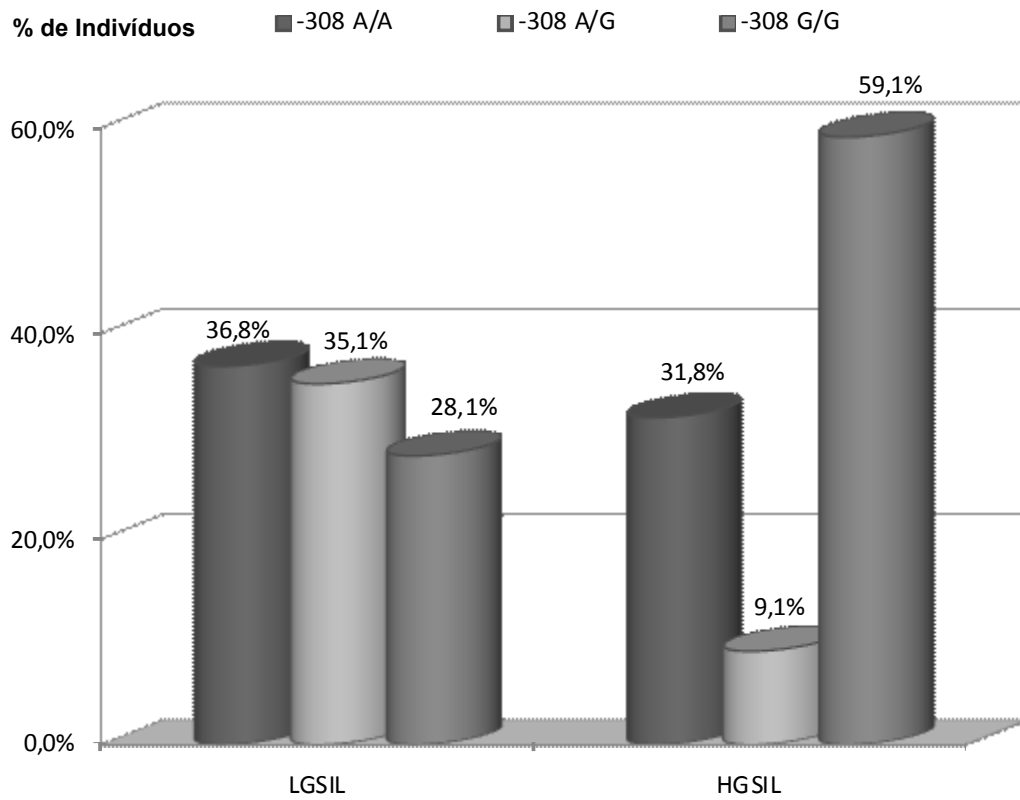


Figura 1. Distribuição do polimorfismo -308 TNF- α de acordo com os resultados anatomopatológicos (LGSIL e HGSIL).

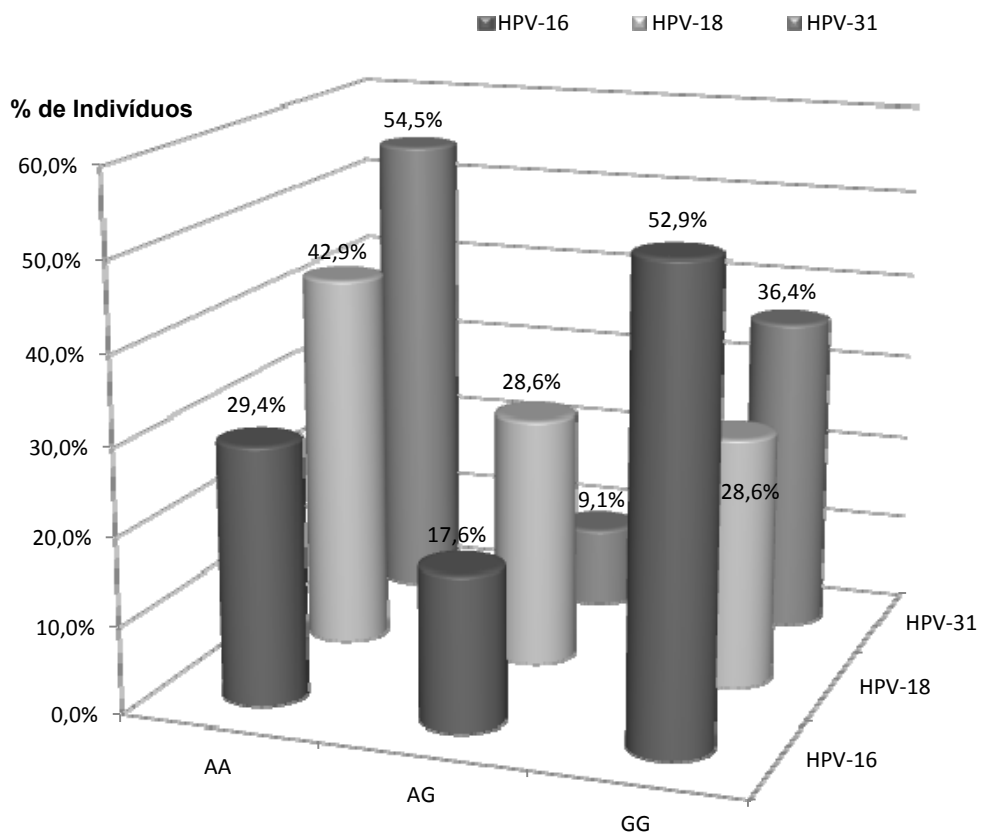


Figura 2. Distribuição dos tipos oncogênicos HPV-16, -18 e -31 de acordo com o polimorfismo -308 TNF- α . Foi observada associação significativa entre HPV-16 com o genótipo GG (χ^2 ; $p=0,05$); os tipos HPV-18 ($p=0,96$) e HPV-31 ($p=0,33$) não apresentaram associação significativa com o polimorfismo estudado.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelo Papilomavírus Humano é a doença sexualmente infecciosa que mais acomete a população jovem sexualmente ativa. Embora seja uma infecção assintomática na maioria dos casos, o câncer cervical ainda constitui um sério problema de Saúde Pública, mundialmente.

O câncer de colo uterino é responsável por quase 260.000 mortes anualmente, sendo que 80,0% dessas ocorrem em países em desenvolvimento. A infecção persistente por alguns tipos de HPV oncogênicos (16, 18, 31 e 33) já está estabelecida como a principal causa da transformação maligna de lesões no colo uterino.

No presente estudo, a frequência de infecções por HPV-AR (alto risco) foi de 23,6% para HPV-16; 15,3% HPV-31 e 9,7% HPV-18, sendo que 41,0% dos casos apresentavam co-infecção com mais de um tipo viral.

Diversos fatores estão associados à infecção pelo HPV. Dentre estes, podemos ressaltar a idade precoce da primeira relação sexual, o elevado número de parceiros sexuais na vida, o tabagismo, uso contínuo de contraceptivo oral e fatores genéticos relacionados à imunidade.

O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) apresenta genes que estão diretamente envolvidos na infecção pelo HPV, proporcionando a regressão ou a progressão da mesma. Além disso, existem genes da classe II relacionados à susceptibilidade genética ao câncer cervical em humanos.

Alguns genes como a Interleucina 10 (IL-10) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) têm polimorfismos importantes que já foram relatados como importantes marcadores na carcinogênese. No presente estudo avaliamos a associação dos polimorfismos -1082 IL-10 e -308 TNF- α com a infecção por HPV, em especial, com as lesões cervicais.

No presente estudo, 72,2% dos casos apresentavam lesões escamosas intra-epiteliais de baixo grau (LGSIL) e 27,8% lesões de alto grau (HGSIL) e a susceptibilidade ao desenvolvimento das mesmas apresentou associação para o polimorfismo -1082 do gene da IL-10, sendo que em 86,0% das HGSIL esteve presente o genótipo GG. Observamos, também, uma associação do HPV-16 com uma elevada expressão do alelo G (94,1%), seguido do HPV-18 e -31, sugerindo que este tipo viral possa estar influenciando os níveis desta citocina.

Para o polimorfismo -308 do TNF- α , 36,8% dos casos com lesões LGSIL e 31,8% com HGSIL eram portadoras do genótipo AA enquanto que, 28,1% dos casos com LGSIL e 59,1% das HGSIL eram portadoras do genótipo GG, sendo observada associação significativa dos genótipos com as lesões LGSIL quando comparada às lesões HGSIL ($p=0,01$).

E ao avaliar a associação da infecção por estes tipos oncogênicos com o polimorfismo -308 do gene TNF- α , observou-se que o genótipo GG está relacionado ao HPV-16 ($p=0,05$). Houve uma maior frequência (52,9%) do HPV-16 em relação ao genótipo GG; do HPV-18 e -31, com o genótipo AA (42,9%) e (54,5%), respectivamente.

Observamos, juntamente com estes achados, associação do genótipo GG com a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ($p=0,001$). Todas as mulheres HIV positivas presentes no estudo, apresentaram este haplótipo. Mulheres com idade menor a 35 anos apresentaram associação com os genótipos AA ($p=0,02$), AG ($p<0,001$) e GG ($p=0,003$). A atividade sexual iniciada anterior aos 20 anos de idade também foi associada aos genótipos AG ($p=0,01$) e GG ($p=0,03$). Em relação ao fumo, a maioria dos casos fumantes (71,7%) apresentou o genótipo AA ($p=0,05$).

As limitações que devemos considerar em nosso estudo foram devidas ao pequeno número de casos de mulheres com lesões graves (NIC III e câncer), pois a extração de DNA de biópsias de amostras cervicais em blocos de parafina é considerada um procedimento laborioso e, geralmente, não se obtém resultados satisfatórios.

Apesar de haver poucos trabalhos na literatura relacionados à imunogenética do câncer cervical, e esses ainda sugestionarem de forma contraditória o papel desses polimorfismos, nossos achados reafirmam a importância de aprofundar mais estudos com estas citocinas, avaliando estes como possíveis marcadores para a predisposição ao câncer.

Dessa forma, é possível sugerir que o conhecimento de polimorfismos relacionados a lesões e ao câncer do colo uterino pode auxiliar no entendimento da variabilidade genética das populações e no desenvolvimento de métodos de prevenção, como novas vacinas e de programas de vigilância epidemiológica para o controle das Doenças Sexualmente Infecciosas (DSI).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIABILIDADE EM GENES DO
SISTEMA IMUNOLÓGICO (IL-10, TNF- α) E LESÕES
CERVICAIS PRÉ-MALIGNAS RELACIONADAS COM A
INFECÇÃO POR HPV**

CRISTINE NASCENTE IGANSI

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2006

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIABILIDADE EM GENES DO
SISTEMA IMUNOLÓGICO (IL-10, TNF- α) E LESÕES
CERVICAIS PRÉ-MALIGNAS RELACIONADAS COM A
INFECÇÃO POR HPV**

CRISTINE NASCENTE IGANSI

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Curso de Pós-Graduação em Epidemiologia
Projeto de Doutorado**

**Orientador: Prof^ª. Dra. Mary Clarisse Bozzetti
Co-Orientadora: Dra. Sabrina Esteves de Matos Almeida**

Porto Alegre, Março de 2006

INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de DNA da família *Papillomaviridae* que foi descrito pela primeira vez em 1954. Atualmente, o HPV é a infecção viral sexualmente transmissível mais freqüente, atingindo cerca de 10,0 a 12,0% das mulheres com vida sexualmente ativa (CARVALHO, 2000; NAUD, 1993). Em relação às mulheres jovens, entre 20 e 29 anos, sua prevalência é ainda maior, de 20,0 a 40,0% (FERREIRA, 2003).

Já foram descritos mais de 100 tipos virais que são classificados em HPV de alto e baixo risco de acordo com a freqüência em que aparecem associados a processos cancerígenos, e, portanto, divididos de acordo com seu potencial oncogênico. O grupo considerado de baixo risco inclui os tipos HPV 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73, os quais são encontrados, na maioria das vezes, em verrugas genitais e na região anogenital que parecem não oferecer nenhum risco de progressão para a malignidade. O grupo que representa alto risco inclui os tipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68 e estão relacionados com o desenvolvimento de carcinoma cervical (BIBBO & SILVA FILHO, 1998; HAUSEN, 2000; VARGAS & DALLA CORTE, 2002; SILVA et al, 2006).

O câncer de colo do útero é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo superado pelo câncer de pele e pelo câncer de mama, estando então entre as principais taxas de incidência e mortalidade no país (INCA, 2008).

Estima-se que a incidência em escala mundial seja cerca de 500.000 casos por ano, sendo a patologia responsável por 15,0% de todas as neoplasias invasoras diagnosticadas em mulheres. Constitui-se um dos mais graves problemas de saúde pública, especialmente para os países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil, onde se estima que cerca de 40.000 casos novos surjam anualmente (SILVA et al, 2005).

Outros fatores restritos ao hospedeiro, tais como regulação hormonal, resposta imune e predisposição genética também têm sido relacionados ao câncer cervical (BURGER et al, 1993; PROKOPCZYK et al, 1997).

A investigação de fatores genéticos ligados à imunidade é essencial para o entendimento das associações do vírus com as células do hospedeiro. Estudos demonstram uma relação da atuação do vírus do HPV de alto risco no hospedeiro levando ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e também uma forte influência de fatores imunológicos e genéticos que impeçam a ação viral (HILDESHEIM & WANG, 2002; MACIAG et al, 2000).

A resposta imune do hospedeiro é um fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. Eles podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico ou à composição genética do hospedeiro (PINTO et al, 2002).

Os genes do sistema imune desempenham uma grande importância clínica em transplantes, doenças auto-imunes e resposta a infecções, como ainda oferecem excelentes modelos para a análise da variação humana e expressão gênica. Os fatores genéticos exercem um papel relevante não apenas na resposta imune normal, mas também no desenvolvimento de reações e doenças imunológicas (NUSSABAUM et al, 2002).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Associar a variabilidade dos polimorfismos presentes dos genes da IL-10 e TNF- α nas regiões promotoras (-1082) e (-308), respectivamente, e correlacioná-las com os diferentes graus de lesões pré-malignas e malignas provocadas pela infecção viral.

Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de tipos de HPV de alto risco na população em estudo;
- Determinar a frequência dos alelos encontrados nos polimorfismos dos genes do IL-10 (-1082) e TNF- α (-308) na população em estudo e na população normal;
- Relacionar os polimorfismos encontrados com os tipos de HPV e com os diferentes graus de lesões cervicais.

JUSTIFICATIVA

Em todo o mundo, a incidência e a mortalidade do câncer cervical apenas são superadas pelos índices de câncer de mama, ocupando o sétimo lugar em mortalidade na população total e o terceiro entre as mulheres (JANICEK & AVERETTE, 2001).

As lesões precursoras do câncer de colo uterino são de grande interesse científico, devido ao grande número de casos registrados mundialmente todos os anos. No Brasil, a estimativa que foi apresentada para o ano de 2006 mostrou 19.000 casos, com um risco estimado de 20 casos a cada 100 mil mulheres; no Rio Grande do Sul, para este mesmo ano, 3.840 casos foram registrados, e na capital, a estimativa foi de 570 casos de câncer do colo uterino (INCA, 2006). Para o ano de 2008, as estimativas do INCA para o Brasil é de 18.690 casos, novos, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008).

Os tipos de HPV de alto risco -16 e -18 estão presentes em cerca de 93,0% dos tumores malignos cervicais investigados em diferentes locais do mundo, demonstrando o importante papel desses tipos oncogênicos na formação de neoplasias cervicais (LORENZATO et al, 2001).

O HPV-16 é um dos tipos de alto risco mais freqüente entre as mulheres, e também o mais comum entre os casos de câncer cervical, com taxas de 23,4% nas mulheres, sendo ainda maior em adolescentes com idade média de 16-20 anos (HO et al, 1998; LIAW et al, 1999; RABELO et al, 2003). O subtipo do HPV-18, também classificado de alto risco, apresenta uma prevalência de 7,3% em mulheres com idade em torno dos 16 anos e 7,2% em mulheres com idade ao redor de 25 anos (BASEMAN et al, 2005).

Atualmente, a investigação de fatores genéticos ligados à imunidade é essencial para o entendimento das associações do vírus com as células do hospedeiro. Entretanto, os mecanismos exatos que disparam essa resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV ainda não são totalmente conhecidos.

A investigação de fatores genéticos ligados à imunidade é essencial para o entendimento das associações do vírus com as células do hospedeiro. Entretanto, os mecanismos exatos que disparam essa resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV ainda não são totalmente conhecidos.

METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

Delineamento

Trata-se de um Estudo Transversal envolvendo mulheres assintomáticas de uma área populacional assistida pela Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, pertencente ao Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (SSCGHC), localizado na Zona Norte de Porto Alegre.

Esse trabalho é parte do projeto “Associação entre a variabilidade do gene HLA classe I e o desenvolvimento de lesões cervicais pré-malignas relacionadas ao HPV” (Protocolo nº. 25.70.06.0401), do grupo de pesquisas em Bioanálises, já aprovado pelo Comitê de Ética da Feevale. O referido projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP – GHC) sobre o protocolo nº. 112/2002 (Anexo I).

Amostras

As amostras selecionadas para a análise pertenceram a um estudo de coorte realizado no período de fevereiro de 2003 a abril de 2005. Foram convidadas a participar do estudo, mulheres selecionadas aleatoriamente, que atenderam os critérios de elegibilidade e concordaram em participar do estudo proposto assinando um Termo de Consentimento e respondendo um questionário epidemiológico padronizado (Anexos II e III). Para ser elegível a paciente deve pertencer à área geográfica acima descrita, deve ter iniciado vida sexual e não deve ter diagnóstico prévio de câncer de colo uterino.

Serão analisados dois grupos: um grupo controle de mulheres com resultado negativo para HPV pelo teste de PCR e resultado normal para o teste citopatológico e um segundo grupo de mulheres HPV positivo e exame citopatológico alterado, em amostras de lavado cérvico-vaginais e em biópsias.

Amostras de lavado cérvico-vaginais

As amostras de lavado cérvico-vaginais para a pesquisa de DNA-HPV foram coletadas da ectocérvice previamente higienizada com gaze para remoção do excesso de muco e realizada a

coleta de três *swabs*, utilizando a escova citológica (*cytobrush*), para a obtenção de uma quantidade representativa de células.

Um dos *swabs* foi utilizado na análise microscópica direta de microorganismos. Após a análise direta, foi coletado o próximo *swab* para transferência do material a uma lâmina estéril, para realização do exame de rotina de Papanicolaou; e o terceiro *swab* foi imerso em 2mL de meio de transporte TE (10mM Tris-HCL Ph 8,5; 1mM EDTA) para a realização da análise molecular do vírus através da PCR.

O transporte das amostras foi realizado em condições de baixas temperaturas e logo depois, foram conservadas à temperatura de -20°C até o momento da extração.

Amostras parafinizadas

Os casos que apresentaram resultados positivos para DNA-HPV no teste de PCR e/ou exame citopatológico alterado foram encaminhadas ao exame colposcópico. Se o resultado deste exame apresentasse alterações, a paciente era submetida à realização de biópsia e o material encaminhado para o Setor de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para o processo de parafinização e análise. Os procedimentos de exame colposcópico e biópsia foram realizados na própria Unidade de Saúde do Jardim Leopoldina.

Extrações de Material Biológico

As extrações serão realizadas de acordo com protocolos descritos na literatura.

Extração de DNA das amostras de lavado cérvico-vaginais

O protocolo de extração de DNA em amostras cérvico-vaginais encontra-se no anexo IV anteriormente descrito por Bauer et al (1993) e Coutlée et al (2002).

Extração de DNA das amostras parafinizadas

O protocolo de extração das amostras parafinizadas encontra-se no anexo V determinado a partir dos estudos realizados pelos autores Coura et al (2005) e Miller et al (1988).

Reação de Amplificação (PCR)

O trabalho será desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) localizado na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), em Porto Alegre.

O DNA das amostras clínicas será submetido à amplificação pela metodologia de ARMS – PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), uma técnica muito utilizada para determinar vários tipos de polimorfismos nos diferentes alelos dos genes da IL-10 e TNF- α . Acredita-se que esta metodologia tenha muitas vantagens, além de ser precisa, rápida e confiante para a determinação de genótipos de um grande número de amostras de DNA para os diversos polimorfismos de citocinas (PERREY et al, 1999).

A técnica também apresenta benefícios em estudos de susceptibilidade e/ou prognóstico de doenças genéticas. Será utilizado no presente estudo para o polimorfismo da IL-10 -1082(A/G) e para TNF- α -308(A/G) as seqüências de *primers* a seguir:

IL-10 (-1082)	<i>Primer</i> Genérico (antisense):	5'-cagtccaactgagaatttgg-3'
IL-10 (-1082)	<i>Primer</i> G (sense):	5'-ctactaaggcttcttgggac-3'
IL-10 (-1082)	<i>Primer</i> A (sense):	5'-actactaaggcttcttgggaa-3'

O tamanho do produto amplificado será de 258 pb.

TNF- α (-308A/G)	<i>Primer</i> Genérico (antisense):	5'-tctcggttcttctccatcg-3'
TNF- α (-308A/G)	<i>Primer</i> G (sense):	5'-ataggtttgaggggcatgg-3'
TNF- α (-308A/G)	<i>Primer</i> A (sense):	5'-aataggtttgaggggcatga-3'

O tamanho do produto amplificado será de 184 pb.

<i>Primer</i> de controle interno 1:	5'-gcctccaaccattccctta-3'
<i>Primer</i> de controle interno 2:	5'-tcacggatttctgtgtttc-3'

O tamanho do produto amplificado será de 429 pb.

Nas reações será realizada uma reação de PCR para cada alelo investigado, utilizando *primers* de controle interno para cada reação.

Os produtos amplificados serão monitorados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de TEB 1X, contendo 0,5 mg/mL de Brometo de Etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

Análise Estatística

Após a construção de um banco de dados com auxílio do Software estatístico SPSS® software (versão 17.0) serão realizadas as seguintes análises:

- Levantamento estatístico geral dos dados epidemiológicos e clínicos (teste do Qui-Quadrado para dados qualitativos e teste *t* independente para as variáveis quantitativas).

- Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -1082(A/G) localizado na região promotora do gene da IL-10 e -308(A/G) do gene do TNF- α .

- Analisar a possível associação dos polimorfismos estudados com o desenvolvimento de lesões cervicais em mulheres em idade reprodutiva (teste do Qui-Quadrado).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASEMAN JG. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virology. 2005; 32(4):16-24.
- BIBBO M & SILVA FILHO AM. Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 1998.
- BURGER MP, HOLLEMA H, GOUW AS, PIETERSWJ. Cigarette smoking and human papillomavirusin patients whith reported cervical cytological abnormality. British Medical Journal. 1993; 306(6880):749-52.
- CARVALHO, JJM; OYAKAWA N. I Conselho Brasileiro de HPV-Papilomavírus Humano 2000 São Paulo: Editora BG cultural.
- SANTOS, ALF; M. DERCHAIN, SF et al. Desempenho do exame citopatológico com revisão por diferentes observadores e da captura híbrida II no diagnóstico da neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3. Caderno De Saúde Pública vol.19 n°4. 2003. Rio de Janeiro.
- HAUSEN H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Jornal of the National Cancer Institute. 2000.
- HILDESHEIM A, WANG SS. Host and viral genetics and risk of Cervical Cancer: a review. Virus Research. 2002; 89 (2):229-40.

HO GY, BIERMAN R, BEARDSLEY L, CHANG CJ et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine*. 1998; 338(7): 423-8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Câncer do colo do útero. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>. Acessado em 10 de Agosto de 2008.

JANICEK, MF. Cervical cancer: Prevention, Diagnosis and Therapeutics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2001; 51(2):92-114.

LIAW KL, GLASS AG, MANOS MM, GREER CE et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *Institute National Cancer*. 1999; 91(11):954-60.

LORENZATO F, SINGER A, MOULD T, SANTOS LC, MAIA A, CARIRI L. Cervical cancer detection by hybrid capture TM and evolution of local risk factors. *International Journal of Gynecology e Obstetrics*. 2001; (73) 41-6.

MACIAG PC, SCHLECHT NF, SOUSA PSA, FRANCO EL, VILLA L, PETZL-ERLER, ML. Major histocompatibility complex classe polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian woman. *Cancer Epidemiology, Biomarkers e Prevention*. 2000; (9):1183-91.

NAUD, P. DST e AIDS. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1993. P. 118-32.

NUSSBAUM R, McINNES R, WILLARD H. Genética Médica. Editora Guanabara Koogan S.A. 2002; 6ª edição: 244-54.

PINTO AP, TULIO S, CRUZ OR. Hpv cofactors in cervical carcinogenesis. Revista Associação Médica Brasileira. 2002; (48):73-82.

PROKOPCZYK B, COX JE, HOFFMAN D, WAGGONER SE. Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. Journal of the National Cancer Institute. 1997; 89(12): 868-73.

RABELO SANTOS SH, ZEFERINO L, VILLA LL, SOBRINHO JP et al. Human Papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial Neoplasia III and Invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003; 98(2):181-4.

SILVA SILVEIRA LM, ARAÚJO SILVA H, PAIVA PEREIRA I, FURTADO PINHEIRO VM. Cytomorphologic criteria for the diagnosis of HPV and its relation with the gravity of cervical intraepithelial neoplasia. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2005; 37(2): 127-132.

SILVA TT, GUIMARÃES ML. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2006; 28(5).

VARGAS VRA, DALLA CORTE, E.A. Prevalência das lesões intra – epiteliais escamosas em exame citológico numa determinada população de Santo Ângelo, RS. Monografia Especialização Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Regional Sul 2002. Porto Alegre.

II. Parecer do Comitê de Ética do Grupo Hospitalar Conceição (CEP-GHC)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO CEP - GHC RESOLUÇÃO

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.


O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

Nº 112/2002

Título: A distribuição de papilomavirus humanos oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical.

Pesquisador (es): Mary Clarisse Bozzetti

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento livre e Esclarecido, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer **APROVADO**. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.



Dr. Mário Roberto Silveira
Coordenador
Comitê de Ética do GHC

III. Termo de Consentimento Informado

Título do Projeto: A Distribuição de Papilomavírus Oncogênicos e Sua Associação Com Lesões do Colo Uterino

Protocolo nº: _____

Financiamento: CAPES-PROF (UFRGS); FIPE/HCPA; FAPERGS; LACEN/RS.

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. É causada pelo vírus conhecido como Papilomavírus Humano ou HPV. Este vírus é o principal agente causador do câncer de colo de útero. Pelo fato deste ser um câncer bastante comum entre as mulheres em nosso meio e, embora possa ser diagnosticado precocemente e as mulheres curadas, ele ainda é responsável por um grande número de mortes entre as mulheres em nosso meio. Por isso, a busca de métodos para um diagnóstico mais precoce e mais acessível à toda população têm sido tema de muitas pesquisas.

Nós planejamos um estudo que tem como principal enfoque a identificação e o acompanhamento de mulheres portadoras do HPV bem como de outras lesões associadas presentes no colo uterino. Por isso estamos convidando-a a fazer parte deste estudo, cujos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios estão descritos a seguir.

Objetivos do estudo:

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

Procedimentos:

As mulheres que concordarem em participar do estudo serão inicialmente entrevistadas para responder algumas questões relacionadas à sua saúde, após será realizado um exame ginecológico no qual será coletado, através do uso de uma escova especial para este exame, material da parte externa e do canal do colo uterino. Deste material será realizado exame citológico, (preventivo do câncer de colo de útero) e material para investigar a presença do HPV.

As mulheres que tiverem o exame citológico alterado e/ou que tiverem a presença do HPV serão encaminhadas para a realização de uma colposcopia, no qual se observa o colo do útero com lente de aumento. Se neste exame for constatada a presença de alguma lesão no colo do útero, será realizada uma biópsia desta lesão, que significa retirar um pequeno fragmento da lesão e encaminhar para um exame mais minucioso, chamado exame histopatológico e também, neste mesmo fragmento será estudado se existe alguma alteração na proteína P16.

Também será coletado nas mulheres que concordarem em participar do estudo, 20 ml de sangue. Deste sangue será isolado o soro, que será congelado e posteriormente será feita a verificação da presença do HPV.

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas poderá ser no mínimo semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

Riscos e Desconfortos:

Os riscos e desconfortos às participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima, ou seja, a coleta de material para o exame citológico e para o HPV poderá de modo pouco freqüente, causar um pequeno sangramento local, que cessará espontaneamente. Para as mulheres que necessitarem a realização de biópsia, poderá também ocorrer um pequeno sangramento com melhora espontânea e eventualmente poderá haver um pouco de dor local, também passageira. A coleta de sangue é de uma quantidade pequena (20 ml) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos às participantes do estudo.

Benefícios:

Os benefícios diretos do estudo às participantes serão: estas terão a oportunidade de serem identificadas com lesões pré-cancerosas do colo de útero e tratadas antes da evolução destas lesões; aquelas que forem positivas a algum tipo de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino e que não tiverem lesões aparentes serão acompanhadas com uma frequência maior visando acompanhar e tratar as possíveis lesões que se desenvolverem.

Como benefício indireto estas mulheres estarão contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução (prognóstico) para o conhecimento científico, já que está é uma doença altamente prevenível e curável se detectada precocemente e que, no entanto ainda está entre as causas de morte por câncer mais comum entre as mulheres, especialmente em nosso meio.

Compensação financeira:

Não haverá nenhum pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo, bem como as participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

Confidencialidade:

Toda a informação que será fornecida pelas participantes do estudo e os resultados advindos dos procedimentos realizados serão considerados confidenciais e será somente conhecida da equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo que será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas serão esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Mary Clarisse Bozzetti em qualquer momento do estudo pelo telefone 3333 8779.

Em caso de danos:

Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo ou se tem alguma pergunta sobre os cuidados médicos que necessita esta deverá contatar a coordenadora do estudo Dra. Mary Clarisse Bozzetti pelo seguinte telefone: 33338779.

Se houver algum dano à sua saúde resultante de sua participação, receberá os cuidados médicos necessários sem custos adicionais. Não haverá, no entanto, compensação financeira, apenas atendimento médico e hospitalar quando indicado.

Participação voluntária:

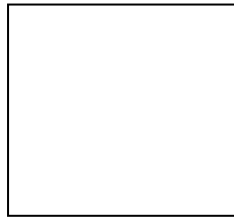
A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia durante o decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

O Significado de Sua Assinatura:

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo.

VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO



Carimbo do estudo

Assinatura da paciente e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data:

Assinatura do coordenador do estudo Data:

Coordenadora

Dr^a Mary Clarisse Bozzetti

Rua Ramiro Barcelos 2600, 4^o andar Sala 417 D

Bairro Santana, Porto Alegre CEP 90035-003

Responsável pelo Projeto

Cristine Nascente Igansi

Rua Ramiro Barcelos 2600, 4^o andar Sala 417 D

Bairro Santana, Porto Alegre CEP 90035-003

Fone: 51-84117004

IV. Ficha de Coleta de Dados

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

I. QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST _ _ _ _

1. Nome: _____

2. Endereço: _____

3. Telefone de contato: _____

4. Data de nascimento? ___ / ___ / ____ (dd/mm/aaaa)

DNASC: ___ / ___ / ____

5. Data da entrevista? ___ / ___ / ____ (dd/mm/aaaa)

DENT: ___ / ___ / ____

6. Idade: __ (em anos)

IDADE: __

7. Estado marital:

ESTMARIT: _

(1) Casada ou com companheiro fixo há pelo menos 1 ano

(2) Com companheiro há menos de 1 ano (3) Solteira

(4) Divorciada/desquitada (5) Separada

(6) Viúva

8. Ocupação: _____

OCUP: __

9. Cor da pele:

(1) branca (2) negra (3) mulata (4) amarela

COR: _

10. Escolaridade:

ESCOLAR: _

(1) analfabeta (2) primeiro grau incompleto

(3) primeiro grau completo (4) segundo grau incompleto

(5) segundo grau completo (6) terceiro grau incompleto

(7) terceiro grau completo (9) ignorado

11. Número de pessoas que residem na casa: __

PCASA: __

12. Renda da família (anotar a renda em reais) _____ RENDA: __

13. Você fuma? (1) Sim (2) Não

FUMO: _

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 13 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 16

14. Se sim, há quanto tempo? __ (em anos)

TFUMO: __

15. Se sim, quantos cigarros fuma por dia? __

CIGDIA: __

16. Idade da primeira menstruação: __

MENARCA: __

17. Seus ciclos menstruais são regulares? _____(intervalo)

CMENST: _

18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não

MENOP1: _

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 18 FOR “SIM” PULE PARA A QUESTÃO 22

19. Se não, há quanto tempo? __ (em anos)

MENOP2: __

20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal?

MENOP3: _

(1) Sim (2) Não

21. Se sim, por quanto tempo? __ (em anos)

MENOP4: __

22. Qual a idade da primeira relação sexual: __

SEXARCA: __

23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: __

PARSEX1: __

24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: __

PARSEX2: __

25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional?

ACO1: _

(1) Sim (2) Não

26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou?

ACO2: __

(1) Anticoncepcional oral; (2) Anticoncepcional injetável;

(2) Condon (camisinha); (4) Diagrama;

(5) “Camisinha” feminina; (6) DIU/Mirena;

(7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;

(10) Não se aplica; (11) Outro: _____

27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não

GESTA1: _

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 27 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 33

28. Se sim, quantas vezes? __

GESTA2: __

29. Que idade tinha na primeira gestação?

GESTA3: __

30. Quantos filhos nasceram vivos?	FVIVOS: __
31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não	ABO1: _
32. Se sim, quantos? __	ABO2: __
33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe	
Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _	COND: _
AIDS/ HIV positiva: _	HIV: _
Sífilis: _	SIFILIS: _
Gonorréia: _	GONO: _
Candidíase genital: _	CANDIDA: _
Clamídia genital: _	CLAMIDIA: _
Herpes genital: _	HERPES: _
Outra, qual?: _____	OUTDST: _
34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?	TRAT1: _
35. Se sim, qual? _____	TRAT2: _
36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe	
Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _	CONDM: _
AIDS/ HIV positivo: _	HIVM: _
Sífilis: _	SIFILISM: _
Gonorréia: _	GONOM: _
Candidíase genital: _	CANDIDAM: _
Clamídia genital: _	CLAMIDIAM: _
Herpes genital: _	HERPESM: _
Outra, qual?: _____	OUTDSTM: _
37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?	TRATM1: _
38. Se sim, qual? _____	TRATM2: _
39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe	CP1: _
40. Se sim, qual a data do último exame? ____ / ____ (mm/aaaa)	DATCP: __ / __

41. Você costuma realizar auto-exame de mamas? MAMA1: _
 (1) Sim (2) Não
42. Se sim, com que frequência? MAMA2: _
 (1) diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: _____
43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde?
 (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
- Doença cardiovascular (HAS, DIC): _ HDCV: _
 Lesões pré-invasivas de colo de útero: _ HLPCU: _
 Doença endócrino-metabólica (diabetes): _ HDEM: _
 Doença Respiratória (asma, dpoc): _ HDR: _
 Doença psiquiátrica (depressão): _ HDP: _
 Câncer ginecológico: _ HCAG: _
 Outro tipo de câncer: _ HC: _
44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o TRATPS1: _
 seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não
45. Se sim, qual o tratamento? _____ TRATPS2: _ _
46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou
 teve algum dos seguintes problemas de saúde?
- (1) Sim (2) Não (9) Não sabe
- Doença cardiovascular (HAS, DIC): _ HFDCV: _
 Lesões pré-invasivas de colo de útero: _ HFLPCU: _
 Doença endócrino-metabólica (diabetes): _ HFDEM: _
 Doença Respiratória (asma, dpoc): _ HFDR: _
 Doença psiquiátrica (depressão): _ HFDP: _
 Câncer ginecológico: _ HFCAG: _
 Outro tipo de câncer: _ HFC: _
 AIDS(HIV positivo): _ HFAIDS: _
47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o TRATPSF1: _
 este problema de saúde? (1) Sim (2) Não
48. Se sim, qual o tratamento? _____ TRATPSF2: _ _

49. História de óbito na família nos últimos cinco anos?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe

ÓBITOF: _

50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: __ (anos)

OBFIDAD: __

51. Se sim, qual a causa da morte? _____

CAUSAOBF: __

OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR:

.....

.....

.....

.....

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

II. QUESTIONÁRIO DE DADOS DO EXAME E COLETA DE MATERIAL

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST _ _ _ _

1. Nome: _____

2. Foram realizados os seguintes exames na participante do estudo:

Coleta para exame cito - patológico da cérvix uterina (CP):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado do CP?

CP: _ _

(1) Normal; (2) AGUS; (3) ASCUS

(4) NIC 1; (5) NIC 2; (6) NIC 3;

(7) Ca in situ; (8) Ca invasivo; (9) Outro: _____

Coleta de material para PCR (PCR):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da PCR (HPV-DNA)?

HPVDNA: _

(1) Positiva (2) Negativa

Se positiva, qual o tipo de HPV identificado? _____

THPV: _

Coleta de sangue para a sorologia p/HPV (SORO):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da sorologia para o HPV?

SOROHPV: _

(1) Positiva (2) Negativa

Foi indicado colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não

Foi realizada colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não, porque?

Resultados da colposcopia?

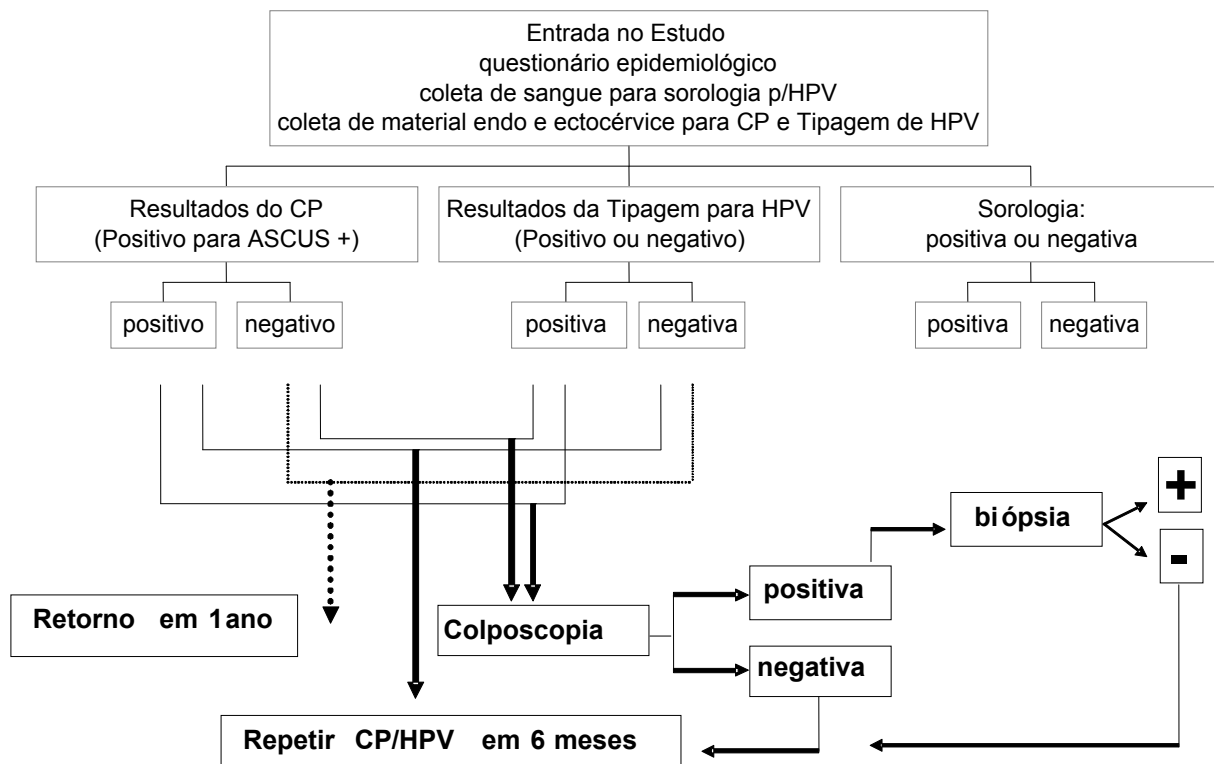
COLPO: _

(1) Anormal com realização de biópsia;

(2) Anormal sem realização de biópsia (por quê?). _____

(3) Normal

V. Fluxograma de Seguimento das Participantes do Estudo



VI. Protocolo de extração de DNA em amostras de lavado cérvico-vaginais

1. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas à extração de DNA através da solução de Proteinase K/TE-50 (200 µg/mL de proteinase K 'DNase/Rna free' Gibco, 2% Tween 20, 1mM EDTA, mM Tris-HCl pH 8,5) e deixadas em banho-maria por 18 horas.
2. Inativar a 94°C por 10 minutos;
3. Desproteinizar as amostras com o mesmo volume de fenol/ clorofórmio/ isoamilálcol;
4. Precipitar o DNA presente na fase aquosa com 1,0 volume de acetato de sódio 3M pH 4,7 e 0,9 volume de álcool isopropílico, em baixa temperatura (-20 °C por 4 horas; -80 °C por 15 minutos; nitrogênio líquido por 30 segundos).
5. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos.
6. Secar o precipitado contendo o DNA e ressuspender em 30 µL de água MilliQ esterilizada.
7. Manter o DNA a -20 °C até o momento da análise molecular.

VII. Protocolo para extração de DNA de tecido fixado em bloco de parafina

1. Adicionar 1 mL de xilol ao tubo eppendorff com o corte de bloco de parafina (20 micra), vortexar por 15 segundos e incubar a 55 C por 30 minutos.
1. Centrifugar (spin) e retirar o sobrenadante por pipetagem.
2. Adicionar novamente 1 mL de xilol, vortexar por 15 seg e incubar a 55 C por 30min.
3. Centrifugar (spin) e retirar o sobrenadante por pipetagem.
4. Adicionar 1 mL de etanol 100%, vortexar por 15 seg e incubar a 55 C por 5 min.
5. Centrifugar (spin) e retirar o sobrenadante por pipetagem.
6. Adicionar novamente 1 mL de etanol 100%, vortexar por 15 seg e incubar a 55 C por 5 min.
Retirar o sobrenadante, adicionar 1 mL de álcool 70%, vortexar 15 seg, centrifugar (spin), retirar o sobrenadante (2x) e
7. Adicionar 700µL de tampão de lise celular gelado;
8. Centrifugar por 3 min a 13.000 rpm;
10. Desprezar o sobrenadante (secar a borda do tubo com papel toalha);
11. Adicionar 1ml de tampão de lise celular, ressuspender o pellet e misturar por inversão por 5 min;
12. Centrifugar por 3 min a 13.000 rpm;
13. Adicionar 300µL de tampão de lise nuclear e 50µL de SDS 10% para cada pellet;
14. Agitar em vórtex;
15. Adicionar 700µL de tampão de lise celular gelado;
16. Centrifugar por 3 min a 13.000 rpm;
17. Desprezar o sobrenadante (secar a borda do tubo com papel toalha);
18. Adicionar 300µL de tampão de lise nuclear e 50µL de SDS 10% para cada pellet;
19. Agitar em vórtex;
20. Adicionar proteinase K: 20µL (10mg/ml) ou 10µL (20mg/ml) ou 100µL (2mg/ml), misturar manualmente;
21. Incubar a 65°C por 1 hora;
22. Adicionar 175µL de NaCl 5,3M, agitar com força e centrifugar a 13.000 por 3 minutos;
23. Transferir o sobrenadante para um novo tubo com a pipeta;
24. Adicionar 1 mL de etanol 100% gelado;

25. Inverter o tubo até aparecer o DNA;
26. Centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm;
27. Desprezar o sobrenadante, sendo cuidadoso para não perder o pellet;
28. Lavar o pellet com 1 mL de etanol 75%, ressuspender o pellet e centrifugar novamente por 3 minutos;
29. Desprezar o etanol;
30. Secar com a tampa aberta no termobloco a 37°C até evaporar todo o etanol;
31. Dissolver o pellet com 50-100µL de água destilada estéril;
32. Incubar a 65°C para dissolver o DNA.

VIII. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES DOUTORADO

Ano 2005	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Ou	Nov	Dez
<i>Delineamento do Projeto</i>								X	X			
<i>Revisão bibliográfica</i>								X	X	X	X	X
<i>Elaboração do projeto</i>								X	X	X		
<i>Submissão do Projeto ao Comitê de Ética</i>										X	X	
Ano 2006												
<i>Cortes histológicas das amostras parafinizadas</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Recrutamento das amostras de lavado cérvico-vaginal</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Revisão bibliográfica</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Construção dos bancos de dados</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Defesa do Projeto em Seminários de Pesquisa</i>										X		
Ano 2007												
<i>Construção dos bancos de dados</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Padronização dos protocolos de extração</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Revisão bibliográfica</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ano 2008												
<i>Realização das Técnicas Laboratoriais</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Análise estatística dos dados</i>							X	X	X	X	X	X
<i>Redação dos Artigos para publicação</i>						X	X	X	X	X	X	X
<i>Redação da Tese para Defesa Preliminar e Pública</i>									X	X	X	X
Ano 2009									X	X	X	X

<i>Defesa Fechada</i>		X										
<i>Defesa Final</i>		X										

IX. EQUIPE DE PESQUISA

Coordenador: Profª Drª Mary Clarisse Bozzetti

Pesquisadores colaboradores: Dr. Alexandre da Silva Aguiar, Dra. Daniela Montano Wilhelms, Dra. Adriana Rosa, Dra. Maria Lúcia da Rosa Rossetti, Dra. Sabrina de Mattos Esteves, Dra. Luciane Calil Mylius.

Alunos de Pós-Graduação (mestrado/doutorado): Doutoranda Cristine Nascente Igansi, Mestranda Gabriela Tonini, Mestranda Viviane Kubisweski dos Santos.

Bolsistas de Iniciação Científica: 5 (cinco) já selecionados (2 CNPq; 1 FAPERGS e 2 voluntários).

Serviços Colaboradores:

- Posto de Saúde Jardim Leopoldina/GHC: recrutamento das mulheres e realização do exame citopatológico;
- Coordenação do Programa da Mulher /SSC/GHC.
- Serviço de Patologia do GHC: citologia e histologia;
- Laboratório do Centro de Pesquisas do HCPA;
- Serviço de Patologia do HCP (gene p16);
- Serviço de ginecologia do GHC: colposcopia e tratamento;
- Gerencia de saúde Comunitária do GHC;
- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Laboratório Central (LACEN)/RS: extração de DNA, identificação viral e análise dos polimorfismos dos genes IL-10 e TNF- α , por Biologia Molecular.