

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Instituto de Biociências de Botucatu**

**Avaliação da concentração de citocinas no soro de
pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa
de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto
grau e carcinoma cervical invasor**

Danielle Ferreira e Silva

Orientador: Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas - Modalidade Médica.

Botucatu
2009

Danielle Ferreira e Silva

**Avaliação da concentração de citocinas no soro de
pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa
de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto
grau e carcinoma cervical invasor**

Orientador: Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas - Modalidade Médica.

Botucatu
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ferreira e Silva, Danielle.

Avaliação de concentração de citocinas no soro de pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma cervical invasor / Danielle Ferreira e Silva. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: João Manuel Grisi Candeias

1. Resposta imune 2. Carcinoma 3. Papiloma vírus humano

Palavras-chave: Citocinas; Elisa; HPV; Lesão

Dedicatória

“Dedico esta monografia, símbolo do meu esforço, trabalho, dedicação e, principalmente, da concretização do meu sonho, ao meu pai que, apesar não se encontrar mais nesse mundo, está sempre presente em meu coração, iluminando e orientando meu caminho. Dedico também à minha querida e amada mãe, que nada mais é do que a luz e razão do meu viver”.

Agradecimentos

Agradeço, inicialmente, ao professor João pela oportunidade e por acreditar sempre em mim e em meu potencial e também a professora Márcia por me acolher em seu laboratório, pela atenção e pelos ensinamentos, sempre fazendo elogios quando merecidos, mas também chamando a minha atenção quando necessário. E também à FAPESP, pela bolsa (2009/50258-9) concedida.

Em segundo lugar, eu gostaria de agradecer aos meus pais por terem me educado de maneira tão exemplar, por acreditarem e investirem em mim e, principalmente, pelo amor e carinho dedicados tanto nas horas felizes quanto nas horas tristes. Dedico todo sucesso de minha vida à minha mãe e meu irmão que, mesmo com toda a dificuldade encontrada após a perda do homem mais maravilhoso que já existiu, meu pai, encontraram forças e batalharam muito, junto comigo, para eu conseguir chegar aonde cheguei. Vocês são os alicerces da minha vida. Amo muito vocês dois.

Em terceiro lugar, eu gostaria de agradecer a minhas novas eternas amigas: Heloísa (k-Lúnia), Juliana (Kubitcheka) e Natália (Toprenha). Estas figuras importantíssimas fizeram todo o diferencial nessa reta final do curso, sem vocês eu não teria conseguido chegar até o fim. E é claro que eu também não poderia deixar de agradecer a minha irmã de coração e

companheira de república desde o primeiro ano, Cibele (Lêmore), por todos esses anos repletos de sorrisos e lágrimas, vitórias e fracassos, que mal chegaram ao fim e já deixam uma imensa saudade.

E por fim, eu gostaria de agradecer em especial a Jossimara, Jô, para os íntimos, que foi muito mais do que amiga nesse último ano de faculdade, ela foi professora, auxiliar de Elisa, administradora de laboratório, psicóloga, quebra-galho, entre outras milhões de funções que só a ela consegue dar conta de uma só vez. E também à Larissa, minha companheira de projeto, pela ajuda, pelas infinitas indas e vindas à Jauí (como ela mesma disse, “a estrada está aumentando a cada dia”, passando raiva com os caminhoneiros, mas compensando “às vezes” com umas comprinhas no território do calçado e, por fim pelas maratonas de Elisa, “Avelinos”! Essas sim, nos deixaram uns três anos mais velhas devido ao estresse né? Obrigada, meninas, do fundo do meu coração! Tanto pelos ensinamentos, quanto pela paciência e pela amizade. E para completar o pequeno time do laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-fetal, que quase não tem mulheres, gostaria de agradecer a Carol e Laura (o pouco que conheço dessas duas já é suficiente para dizer que eu as adoro), Camila e Bruna.

Agradeço todas essas pessoas fundamentais em meu processo de aprendizagem, amadurecimento e profissionalização.

Obrigada

Επίγραφε

**"Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar
a sabedoria."**

(Santo Agostinho)

SUMÁRIO

1. Resumo	2
2. Introdução	5
3. Objetivo	10
3.1 Objetivos específicos.....	10
4. Pacientes e métodos	12
4.1. Pacientes e métodos.....	12
4.2. Coleta de material.....	13
4.3. Análise histopatológica das lesões cervicais e detecção de HPV.....	13
4.4. Determinação de citocinas no soro por ELISA.....	13
4.5. Análise Estatística.....	15
5. Resultados	17
5.1. Variáveis sócio-demográficas.....	17
5.2. Análise histopatológica.....	18
5.3. Análise da concentração de citocinas entre os grupos.....	20
6. Discussão	22
7. Referências Bibliográficas	26
8. Anexos	32

Resumo

1. Resumo

Introdução: A infecção genital por Papilomavírus Humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST), de origem viral, mais prevalente no mundo. As lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LIEBG) e de alto grau (LIEAG), assim como carcinoma cervical invasor (CCI), estão associadas à presença do HPV. A resposta imune tem papel importante na infecção pelo HPV na cérvix uterina, sendo as citocinas importantes reguladoras da transcrição viral. **Objetivo:** Avaliar a concentração de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α no soro de mulheres portadoras de LIEBG, LIEAG e CCI. **Pacientes e Métodos:** Foram incluídas no estudo 40 mulheres com diagnóstico histopatológico de LIEBG (n=11), LIEAG (n=10), CCI (n=10) e 9 mulheres com suspeita de doença HPV induzida, mas sem alterações histopatológicas na biópsia do colo do útero (controle), atendidas no Ambulatório de Colposcopia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e no Ambulatório de Ginecologia Preventiva do Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP. O sangue periférico foi colhido por punção venosa e o soro armazenado até o processamento. A dosagem das citocinas no soro foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA). A pesquisa de HPV foi realizada empregando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os dados sócio-demográficos foram obtidos por entrevista no momento da consulta ginecológica. **Resultados:** A mediana de idade das pacientes do grupo controle, LIEBG, LIEAG, e CCI foi de 38 (21-69), 32,5 (17-51), 39 (23-65) e 51,5 (29-72), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa de mediana de idade das pacientes do grupo CCI quando esta foi comparada com os demais grupos. Em relação às características das pacientes, 76%

eram brancas, 68% relataram união estável, 31% concluíram o 2º grau, 42% eram fumantes, 37% das mulheres relataram 3 ou mais parceiros sexuais durante a vida, 9% apresentaram história de DST anterior e 35% das pacientes afirmaram usar anticoncepcional oral .. O DNA-HPV foi detectado em 100% das biópsias realizadas. A análise das citocinas de interesse não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. **Conclusão:** Considerando o tamanho amostral estudado, a dosagem de citocinas séricas não diferem entre as pacientes com LIEBG, LIEAG ou CCI.

Introdução

2. Introdução

As infecções genitais pelo papilomavírus humano (HPV) são as mais freqüentemente diagnosticadas entre as doenças sexualmente transmissíveis (DST) de origem viral, acometendo cerca de 30% da população ativa, prevalência esta que varia de 8,7 a 72% de acordo com a população e método diagnóstico empregado¹⁻⁵.

Na maioria dos casos, o contágio ocorre através do contato sexual entre pessoas com lesões genitais, com risco estimado em 60 a 80% de se adquirir através de um único contato⁶⁻⁸. Após o contágio, a ação viral está na dependência de muitos fatores e os acontecimentos seguintes são variáveis, não existindo um marcador que defina a evolução da infecção⁹. Porém, de maneira geral, essa evolução depende do inter-relacionamento entre as características do indivíduo, como sua resposta imune e o genótipo viral, que determinam a atividade do vírus. No hospedeiro, de acordo com o genótipo viral, o HPV pode ficar na forma epissomal ou incorporado ao DNA.

Os HPVs são vírus DNA de dupla hélice circular pertencentes à família *Papillomaviridae*. Foram descritos mais de 120 tipos que infectam o homem e representam diferentes repercussões clínicas¹⁰. As partículas do Papilomavírus humano medem aproximadamente 55nm de diâmetro, tem forma icosaédrica e não são envelopados. Replicam-se no núcleo de células epiteliais escamosas e seu genoma é composto por fita dupla de DNA circular. O DNA viral é associado com proteínas *histone-like*, possuindo aproximadamente 8000 pares de bases e é encapsulado por 72 capsômeros. O capsídeo consiste em duas proteínas estruturais pode ser dividido em três regiões: a região longa de controle (LCR), correspondendo a aproximadamente 10% do seu genoma, a região precoce (E-*early*) e a região tardia (L-*late*). Os genes da

região L codificam proteínas estruturais, a região E possui genes principalmente para funções regulatórias como regulação do DNA e ativação do ciclo lítico¹¹.

Os genes E5, E6 e E7 codificam proteínas relacionadas a funções de estimulação do crescimento. As proteínas codificadas pelo gene E5 interagem com os domínios transmembranas dos receptores das quinases, alterando suas funções. Os genes E6 e E7 são expressos na forma de RNA mensageiro (RNAm) transcrito da região promotora E6/E7. As duas regiões são separadas por uma curta distância e as proteínas codificadas pelo E6 estão associadas à degradação do gene p53, gene supressor tumoral, induzindo a degradação do mesmo, sendo tal gene essencial para o ciclo lítico da célula¹¹.

O primeiro passo da infecção viral ocorre com a adesão da partícula viral na célula, interagindo com receptores, os quais permitem a entrada do mesmo, através do reconhecimento de proteínas produzidas pelo próprio vírus. Após a entrada da partícula viral, há formação de vesículas e essas levam os vírus até o núcleo da célula. Os poros da membrana nuclear podem servir de porta de entrada para tais agentes, que ao entrarem no núcleo, fundem o seu genoma com o da célula hospedeira, fazendo com que este produza RNAm para proteínas virais¹¹. Em grande parte dos indivíduos expostos, o HPV permanece inativo, na forma latente por um longo prazo¹².

O estudo dos genótipos de HPV alavancou a possibilidade de pesquisas científicas e de triagem do risco de oncogênese nos pacientes portadores de infecção genital pelo HPV e tem sido estudado extensivamente nos últimos anos¹³⁻¹⁶.

Os HPVs genitais são classificados de acordo com seu potencial na indução do câncer: genótipo de alto risco (16,18,31,33,35,45,51, entre outros) e genótipo de baixo

risco (6,11,40,42,54,61)¹⁷. O carcinoma cervical é o segundo tumor maligno mais comum em mulheres no mundo e seu desenvolvimento é um processo de múltiplas etapas que envolve estágios precursores pré-invasivos. Os genótipos de alto risco estão associados às lesões precursoras do câncer cervical e ao desenvolvimento de carcinoma cervical invasor, sua infecção é um marcador para progressão da lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG), passando pela lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG), ao carcinoma cervical invasor(CCI)¹⁸.

Embora o genótipo viral seja importante marcador para progressão das lesões cervicais, outros preditores têm sido estudados para determinar o resultado clínico, principalmente de mulheres com LIEBG e infectadas por genótipos virais de alto risco oncogênico¹⁹.

Dentre estes marcadores, a resposta imune tem um papel importante na história natural da infecção pelo HPV na cérvix uterina, tanto na persistência viral como no desenvolvimento do câncer cervical^{20,21}. As citocinas, que atuam como mediadores das células do sistema imune são importantes reguladores da transcrição do HPV²². As citocinas são proteínas secretadas pelos leucócitos e outras células do organismo em resposta a diferentes estímulos. Interleucinas (IL) como IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (INF- γ) encontram-se entre as citocinas produzidas por células Th1, sendo esta associada à resposta mediada por células, particularmente em resistência à patógenos intracelulares, enquanto IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 são citocinas perfil Th2, que estão envolvidas na resposta humoral e produção de imunoglobulina E²³⁻²⁵.

Muitos estudos sugerem que o padrão Th1 contribui para o desenvolvimento da imunidade celular contra a associação a neoplasia e infecção pelo HPV, e está relacionado com *clearance* dessa infecção. Sugerem também que o padrão Th2 está associado com a persistência viral da infecção e com o desenvolvimento de neoplasias²⁶⁻²⁸. Assumem ainda que o sistema imune do hospedeiro e em particular, a resposta imune local do trato genital inferior, é importante para a sobrevivência do HPV, relacionando-o à neoplasia cervical.

Sharma et al.²⁵ relataram que, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, o nível de IL-2 esteve significativamente reduzido de acordo com a severidade da lesão cervical e em mulheres com carcinoma invasor, enquanto que os níveis de IFN- γ esteve reduzido somente em pacientes com câncer cervical. Ainda nesse estudo, níveis elevados de IL-4 e IL-10 foram detectados em todas as pacientes com câncer cervical e com lesão intraepitelial escamosa de alto grau, quando comparados com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau e com pacientes controles, sugerindo que o padrão Th1 e Th2 de citocinas estiveram significativamente correlacionados com o *status* do HPV. Nessa mesma linha, Tsukui et al.²⁹ demonstraram que o padrão de citocinas Th1, especialmente a produção de IL-2, em resposta ao HPV16 está diminuída em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de alto grau e câncer cervical comparada com mulheres com citologia normal. Estes achados são consistentes com a hipótese de que a produção de citocinas protetoras da imunidade mediada por células é deficiente em mulheres com infecção por HPV e que a progressão para lesões precursoras do câncer cervical pode estar associada com a alteração do padrão Th1 para Th2, com a produção de citocinas imuno-regulatórias. Por

outro lado, Nguyen et al.³⁰ descreveram que citocinas de padrão Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α) e do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) não foram induzidas significativamente no conteúdo vaginal de pacientes com câncer cervical em relação à ausência dessa condição.

Bais et al.³¹ investigando o efeito da infecção pelo HPV sobre a capacidade de produção de citocinas em cultura de células mononucleares do sangue periférico durante a carcinogênese do carcinoma cervical, observaram que as relações Th1/Th2 diminuíram com a progressão das lesões intra-epiteliais cervicais (NIC II para NIC III) e aumentaram de NIC III para carcinoma invasor. Segundo esses autores, significantes mudanças na cinética de produção de citocinas da resposta imune tipo Th2 no soro de mulheres com displasia cervical ocorrem progressivamente do estágio de NIC II para NIC III.

Tijong et al.³² estudando os níveis de citocinas no lavado cervico-vaginal de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical e com câncer cervical, relataram que os níveis de IL-12 p40, IL-10, TGF- β , TNF- α e IL-1 β estavam significativamente elevados em pacientes com câncer cervical em relação às lesões precursoras, demonstrando alterações no ambiente imune cervical local em pacientes com câncer cervical.

Em estudo recente, Song et al.²⁰ utilizando a técnica de PCR em tempo real para quantificar IFN- γ , IL-10, IL-6 e TNF- α em cortes histológicos com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, sugeriram que o IFN- γ intralesional pode ser considerado um marcador para *clearance* de HPV de alto risco após 12 meses de *follow-up*. Ainda segundo esses autores, outros fatores como idade, níveis de IL-10, IL-6 e TNF- α , hábito tabagista e uso de anticoncepcional oral não estiveram associados significativamente

com HPV de alto risco positivo ou negativo, após 12 meses de *follow-up* em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau não tratadas.

Considerando que o melhor entendimento do papel das citocinas no desenvolvimento das neoplasias cervicais teria importantes implicações nas terapias imunes e estratégias de vacinação, o estudo do padrão de citocinas no soro se justifica. A associação do padrão de citocinas expresso em diferentes compartimentos poderá incrementar o conhecimento da Imunologia da infecção relacionada ao HPV.

3. Objetivo

O objetivo do presente estudo é avaliar concentração de citocinas séricas de mulheres portadoras de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma cervical invasor

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α no soro de pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma cervical invasor;
- Associar a concentração de citocinas no soro e o padrão de citocinas expresso de acordo com a lesão de pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma cervical invasor.

Pacientes e métodos

4. Pacientes e Métodos

4.1. Pacientes

Foram incluídas no estudo 39 mulheres com diagnóstico clínico e histopatológico de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (n=12), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (n=15) e carcinoma cervical invasor (n=12), diagnosticadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e Ambulatório de Ginecologia Preventiva do Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP. Como grupo controle, foram incluídas no estudo 15 mulheres com suspeita de doença HPV induzida, mas sem alterações histopatológicas na biópsia do colo do útero e com idade média pareada com as mulheres dos grupos estudos.

Foram excluídas do estudo mulheres portadoras de doenças crônicas como diabetes e hipertensão, doenças auto-imunes, em estado de imunossupressão, com infecções agudas no momento da inclusão no estudo e gestantes.

As pacientes incluídas no estudo responderam a questionário com perguntas para obtenção de dados sócio-demográficos. Todas as pacientes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), tendo sido o projeto encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Anexo 2).

4.2. Coleta de material

O sangue periférico das mulheres incluídas no estudo foi colhido por punção venosa, em volume de 10 ml e colocado em tubo de ensaio estéril Vacuntainer (Beckton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). O tubo foi centrifugado a 1600g por 15 minutos à temperatura ambiente. O soro obtido foi armazenado em alíquotas a -80 °C. A seguir os padrões de citocinas séricas foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA).

4.3. Análise histopatológica das lesões cervicais e detecção do HPV

Secções das lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzidas foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes com cerca de 5µm de espessura que foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de hematoxilina e eosina (HE) com posterior diagnóstico de LIEBG, LIEAG, CCI.

A pesquisa do HPV foi realizada em fragmentos de biópsias cervicais obtidos através do exame colposcópico, empregando-se a técnica de PCR, de acordo com Marcolino et al³³.

4.4. Determinação de citocinas no soro por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A reação de Elisa empregada no presente estudo foi padronizada de acordo com as condições laboratoriais e amostrais. Após padronização, placas de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano de alta afinidade (MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc. Maryland,

USA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo de captura: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , R&D Systems, DuoSet, (Minneapolis, MN) diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 7,2. Após incubação, foram realizadas três lavagens da placa com solução de PBS pH 7,2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). Esse procedimento foi repetido em todas as etapas de lavagem até a fase anterior à adição do substrato. O bloqueio dos sítios livres da placa foi realizado com solução de PBS-T contendo leite desnatado (Molico-Nestlé) na concentração de 5% (PBST-M) durante três horas à temperatura ambiente. Após a lavagem da placa, foram adicionados na primeira coluna 50 μ L das citocinas recombinantes humanas: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , em concentrações indicadas pelo fabricante para obtenção da curva padrão. Nos demais orifícios foram distribuídos 50 μ L de soro com posterior incubação por três horas à temperatura ambiente. Após esse período e lavagem, foram adicionados 50 μ L de anticorpo de detecção: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α e as placas foram mantidas por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida à lavagem, foram adicionados 25 μ L de estreptoavidina (Lote AEM 4907032) na diluição 1:200 em cada orifício da placa e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o procedimento de lavagem, foi adicionados 50 μ L do substrato constituído de 6,25mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0, 5 mg de ortofenilenodiamina (Sigma, Chemical Co, USA) e 5 μ l de água oxigenada 30V e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida por adição de 25 μ L de solução de ácido sulfúrico 2N e as densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan), em comprimento de onda de 492 nm. As concentrações das citocinas séricas foram calculadas sobre a

curva padrão obtida com diferentes concentrações das citocinas recombinantes humanas de interesse, utilizando-se o software Instat 3.

4.5. Análise Estatística

As variáveis idade, etnia, estado civil, escolaridade, fumante, número de parceiros, frequência de relações anteriores, presença de doença sexualmente transmissível (DST) anterior e uso de anticoncepcional oral foram submetidos ao teste de comparação de proporção (Teste z).

As concentrações das citocinas séricas entre os grupos estudados foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre quatro grupos, após análise da normalidade dos dados pelo Kolmogorov – Smirnov test (with Lilliefors's correction). A análise estatística foi realizada utilizando-se software SigmaStat 3.1. (Jandel Corporation) e o nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%.

Resultados

5. Resultados

5.1 Variáveis sócio-demográficas

As variáveis sócio-demográficas das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1. Todas as variáveis não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos estudados ($p > 0,05$).

Tabela 1. Variáveis sócio-demográficas das pacientes incluídas no estudo.

Variáveis	Controle (N=15)	LIEBG (N=12)	LIEAG (N=15)	CCI (N=12)
Idade*	38 (21-69) ^b	32,5(17-51) ^b	39(23-65) ^b	51,5(29-72) ^{a,b}
Etnia				
Branca	13 (87%)	11 (92%)	9(60%)	8(67%)
Estado Civil				
União-estável	12(80%)	5(42%)	10(60%)	10(83%)
Escolaridade				
2° grau completo	6(40%)	6(50%)	5(33%)	0
Fumante	6 (40%)	4(33%)	7(47%)	6(50%)
Número de Parceiros (≥3)	6(40%)	6(50%)	4(27%)	4(33%)
Relações sexuais/semana*	1(0-4)	2(0-5)	2(0-5)	0(0-2)
DST	1(7%)	2(17%)	1(7%)	1(8%)
Uso de anticoncepcional oral	7(47%)	6(50%)	5(33%)	1(8%)

*Variáveis apresentadas em mediana (valores mínimos e máximo)

^{a,b} Valores que apresentaram diferença estatisticamente significativa

5. 2. Análise histopatológica

As análises histopatológicas referentes ao epitélio normal do colo do útero, bem como às lesões LIEBG, LIEAG, CCI estão representadas nas Figuras 1-4.

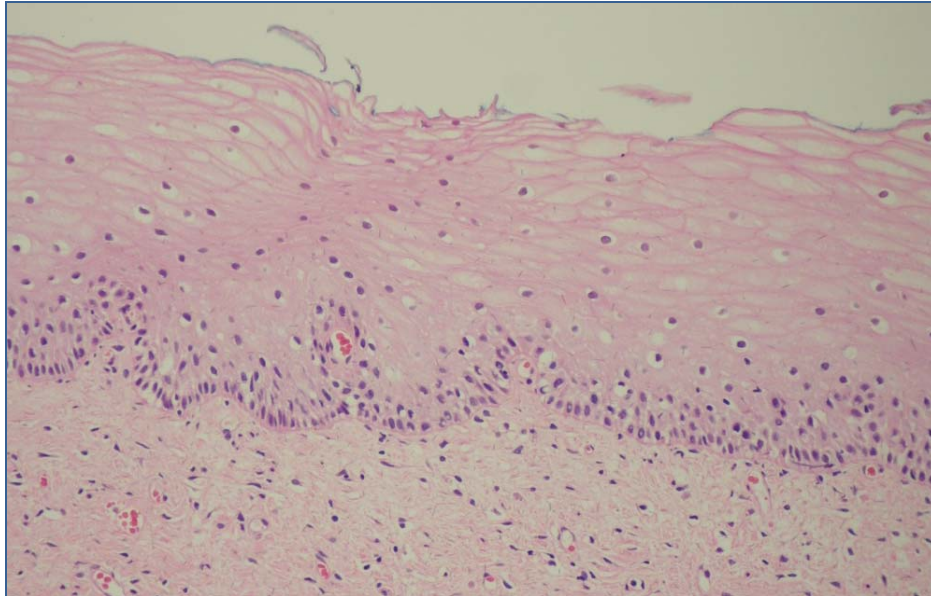


Figura 1. Fotomicrografia do colo do útero representando epitélio normal. HE. 200X.

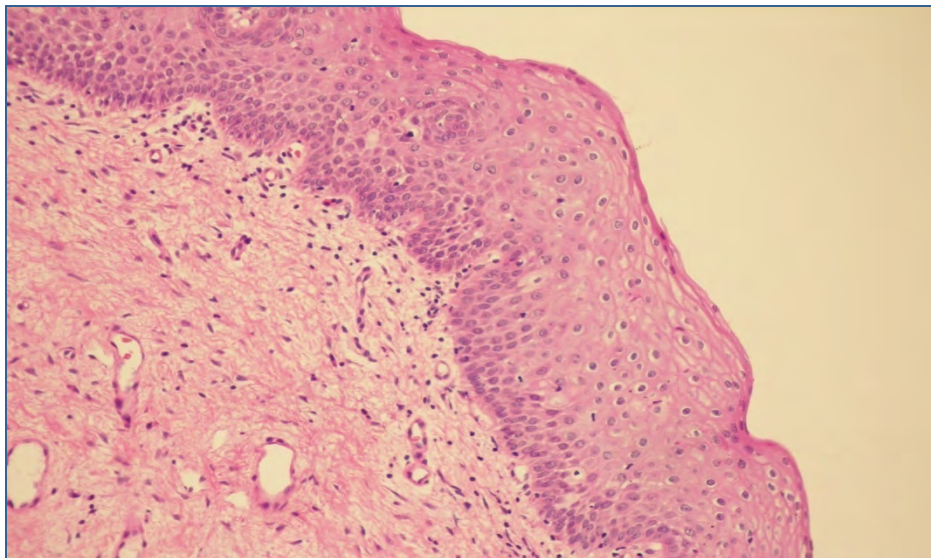


Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico do colo do útero representando LIEBG. HE. 200X

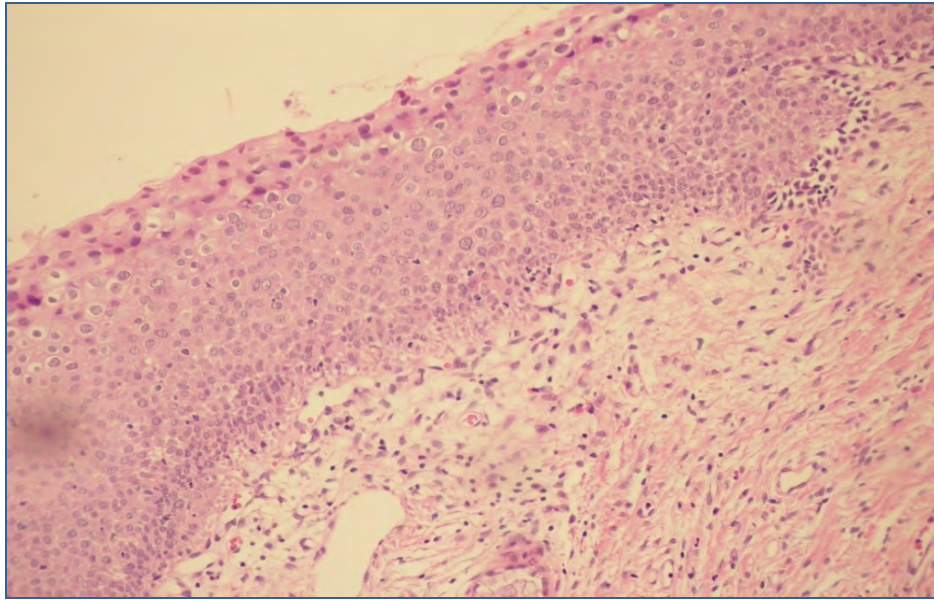


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico do colo do útero representando de LIEAG. HE. 200X

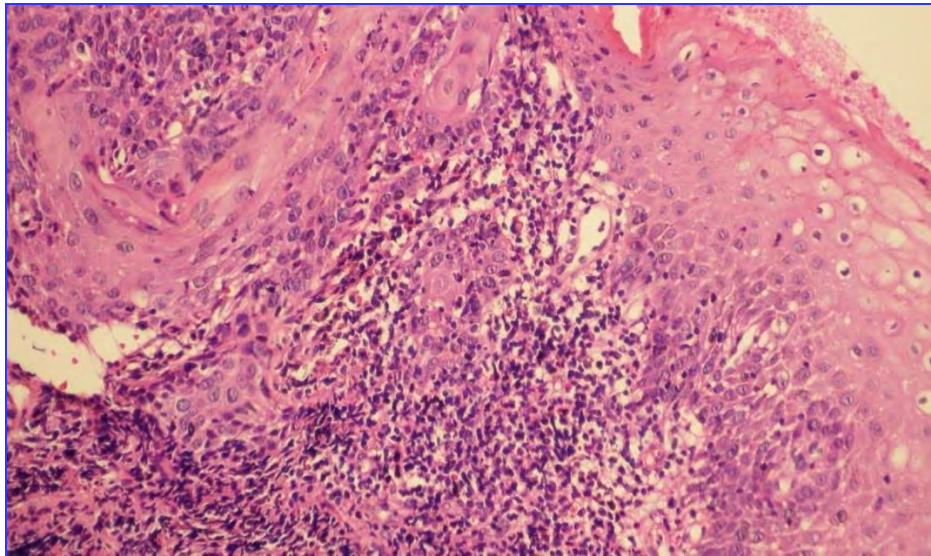


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico do colo útero representando CCI. HE. 200X.

5.3. Análise da concentração de citocinas entre os grupos

As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α estão representadas na tabela 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

Tabela 2. Medianas das concentrações de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (μ g/mL) e valores mínimos e máximos no soro de pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) e carcinoma cervical invasor (CCI).

Citocinas	Controle	LIEBG	LIEAG	CCI	p*
IL-1 β	0	0	0	0	1,000
IL-4	0	0 (0-69,05)	0 (0-3,67)	0 (0-38,59)	0,821
IL-6	0	0 (0-9,07)	0	0 (0-6)	0,602
IL-8	0	0	0	0	1,000
IL-10	0 (0-105,7)	0 (0-26,1)	0(0-7,97)	0(0-24,9)	0,807
TNF- α	0	0 (0-124,22)	0 (0-70,1)	0 (0-165,07)	0,549

*Teste de Kruskal-Wallis

Discussão

6. Discussão

A importância deste trabalho está fundamentada em um estudo multicêntrico realizado com 2000 casos (câncer cervical) e 2000 controles realizado em 1995 pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), que mostrou forte associação do câncer cervical e a presença de qualquer tipo de HPV (*Odds ratio* = 60). No entanto, a presença do HPV em conjunto com outras variáveis torna mais clara o entendimento do aparecimento e progressão das lesões HPV induzidas³⁴.

A aquisição da infecção cervical pelo HPV é o principal precursor de uma série de eventos que leva ao câncer cervical e tem sido exaustivamente documentado por estudos epidemiológicos e experimentais durante os últimos 15 anos. Apenas a infecção pelo HPV não é capaz de 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^{35, 36}. Estudos epidemiológicos indicam consistentemente que o risco da aquisição é fortemente influenciado por número de parceiros sexuais, idade em que ocorre a primeira relação sexual e comportamento sexual dos parceiros masculinos³⁷. Em outro estudo vários co-fatores têm sido associados com o desenvolvimento do câncer cervical invasivo como paridade, uso de contraceptivos orais, tabagismo, imunossupressão, particularmente relatado em paciente com HIV, infecções com outras doenças sexualmente transmissíveis e deficiências nutricionais. Porém, seus verdadeiros papéis no desenvolvimento do câncer permanecem obscuros³⁸.

Ao analisarmos as variáveis sócio-demográficas das pacientes incluídas no presente estudo apresentadas na Tabela 1, não verificamos nenhuma diferença

estatisticamente significativa nos grupos estudados ($p > 0,05$), com exceção da variável idade. Semelhantes resultados foram obtidos em um estudo realizado no Rio de Janeiro, que verificaram uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo com lesão de baixo grau (LIEBG) com média de idade de 31,5 e o grupo com carcinoma cervical cuja média de idade era de 46,9 ($P < 0,001$)³⁹. Em outro estudo também realizado no Rio de Janeiro, Oliveira e colaboradores mostraram concordância com nossos resultados. Neste trabalho, nota-se diferença significativa na mediana da variável idade entre um grupo com lesão de baixo grau (LIEBG) e o grupo com carcinoma cervical, respectivamente 35,3 e 50,9⁴⁰.

Apesar da concordância anteriormente citada na variável idade nossos resultados diferem de um estudo realizado em uma coorte da cidade de Campinas - SP - Brasil, onde Gontijo e colaboradores verificaram um risco elevado para infecção pelo HPV associado com diversas variáveis, tais como: ser solteira, idade da primeira relação, número de parceiros ao longo da vida e parceiros com doenças sexualmente transmissíveis. Já idade, paridade e métodos contraceptivos, que geralmente tem sido associados à infecção pelo HPV^{41,42}, não se apresentaram como fatores importantes no estudo citado.

Embora a resposta imune à infecção cervical pelo HPV não esteja totalmente elucidada, é conhecido que a vigilância imune local e sistêmica pode explicar a latência dessa infecção. Muitos estudos têm mostrado que a polarização para o perfil Th2 de citocinas pode explicar a deficiência na resposta imune celular contra o HPV e neoplasias, facilitando a progressão tumoral⁴³. As citocinas são importantes mediadores inflamatórios que participam desse processo, que atuam através de receptores específicos, as quais podem ser expressas em células infectadas pelo HPV ou podem

ser liberadas intracelularmente ou para a microcirculação. 1⁴⁴. Já está bem documentado na literatura que a secreção cervical de pacientes com infecção pelo HPV apresenta aumento de citocinas de perfil Th2^{31,32}, e que esse perfil também pode estar alterado no sangue periférico, como sugerido por de Sharma et al²⁵ após verificarem aumento de IL-4 e IL-10 e diminuição de IL-2 em cultura de células mononucleares de sangue periférico. No entanto, no presente estudo, a análise das concentrações das citocinas séricas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Nesse sentido, Bais et al⁴⁵, estudando grupos e número amostral semelhantes ao nosso estudo, não encontraram diferença significativa nas concentrações de IL-12, IL-2, IL-4, and TNF α no plasma das pacientes avaliadas. Por outro lado, esses mesmos autores encontraram aumento de IL-10 nas amostras de pacientes com LIEAG e CCI. Embora alguns autores sugiram que a resposta à infecção pelo HPV seja local⁴⁶, ou seja, com altas concentrações de citocinas na secreção cervical, poucos estudos avaliaram a concentração de citocinas séricas nos diferentes graus de lesões HPV-induzidas. Além disso, os métodos de dosagens de citocinas podem diferir dependendo do tipo de amostra analisada (plasma, soro, secreção cervical) e dos diferentes sistemas de anticorpos empregados na técnica de ELISA, de diferentes fabricantes, que implicam na divergência de sensibilidade e resultados encontrados nos estudos.

Esclarecemos que as citocinas IL-2, IL-5, IL-12 e interferon não foram testadas em virtude de demora da chegada dos reagentes para efetuar os testes. Assim, considerando o tamanho amostral estudado e a metodologia empregada, a concentração de citocinas séricas não difere entre as pacientes com LIEBG, LIEAG ou CCI.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas*

1. Tabora 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;73:50-3.
2. Gajewska M, Marianowski L, Wielgos M, Malejczyk M, Majewski S. The occurrence of genital types of human papillomavirus in normal pregnancy and in pregnant women with pregestational insulin dependent diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett* 2005;26:766-70.
3. Shin HR, Franceschi S, Vaccarella S, Roh JW, Ju YH, Oh J, et al. Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis* 2004;190:468-76.
4. Okesola AO, Fawole OI. Prevalence of human papilloma virus genital infections in sexually transmitted diseases clinic attendees in Ibadan. *West Afr J Med* 2000;19:195-9.
5. Strand A, Rylander E, Evander M, Wadell G. Genital human papillomavirus infection among patients attending an STD clinic. *Genitourin Med* 1993;69:446-9.
6. Barrasso R, Debrux J, Groissant O, Orth G. High prevalence of pappilomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 1987;317:916-23.
7. Boon ME, Schneider A, Hogewoning CJA, Kwast T, Bolhuis P, Kok LP. Penile studies and heterosexual partners: peniscopy, cytology, histology and immunocytochemistry. *Cancer* 1988;61:1652-9.
8. Malek RS, Goellner JR, Smith TF, Espy MJ, Cupp MR. Human papillomavirus infection and intraepithelial, in situ, and invasive carcinoma of penis. *Urology* 1993;42:159-70.
9. Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1995;180:1415-23.
10. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
11. Knipe DM, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields*

- Virology (serial online), 2001,66: History. Available from: <http://pco.ovid.com/lrppco/index.html>.
12. Perez M, Gil AO, Wroclawski ER, Guidi HGC, Schiavini JL, Carvalho JJM. HPV no homem In: I Consenso Brasileiro de HPV. 1ª Ed., São Paulo: Editora BG e Produções Culturais Ltda; 2000.p.7-16.
 13. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007;125: 176-82.
 14. Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjanen KJ, Gyllensten UB, Johansson SN, et al. Type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infections in the New Independent States of the former Soviet Union Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:17-22.
 15. Castle PE, Sadorra M, Garcia F, Holladay EB, Kornegay J. Pilot study of a commercialized human papillomavirus (HPV) genotyping assay: comparison of HPV risk group to cytology and histology. *J Clin Microbiol* 2006;44:3915-7.
 16. Sun AH, Xu Y, Fenq Y, Yan J. Study on the frequency of human papillomavirus type 6 and type 11 infection and L1 gene expression of the virus in biopsy samples of pointed condyloma patients. *Zhonghura Liu Xinh Bing Xue Za Zhi* 2006;27:150-3.
 17. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
 18. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:121-7.
 19. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol* 2007;106:549-57.

20. 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;108:543-8.
21. Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 2004;35:1376-84.
22. Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa O, et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 1994;200:130-9.
23. Jarnicki AG, Fallon PG. T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Cur Opin Pharmacology*. 2003;3:449-55.
24. Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001;32:76-102.
25. 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;17:879-85.
26. Wu TC, Kurman RJ. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:185-7.
27. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:209-20.
28. 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. *BJOG* 2006;113:961-4.
29. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J 3rd, Contois D, Lawler P, et al. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 1996;56:3967-74.
30. Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, Vu HL, Andrasi J, et al. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96:452-61.
31. Bais AG, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJ, Meijer CJ, Snijders PJ, et al.

- Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators Inflamm* 2007;2007:1-8.
32. Tjiong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MP, ten Kate FW, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 2001;14:357-60.
33. Marcolino LD, Poletini J, Tristão AR, Marques MEA, Candeias JMG, Vela RAR, et al. Coinfecção de *Chlamydia trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado. *J bras Doenças Sex Transm* 2008; 20: 87-92.

* Referências elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47.

Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos a senhora para participar da pesquisa intitulada "**Avaliação da concentração de citocinas no soro de pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma cervical invasor**" que tem por objetivo avaliar o papel de algumas proteínas participantes da resposta imunológica no soro das pacientes que possuem lesões que podem originar câncer do colo do útero ou nas lesões malignas. Esta pesquisa é de responsabilidade da Graduanda Danielle Ferreira e Silva do Curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica, que será realizada sob orientação do Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências e co-orientação da Prof^a Dr^a. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e participação da Mestranda Larissa Doddi Marcolino e da Doutoranda Jossimara Poletini ambas do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, do Prof. Adjunto Paulo Traiman do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, da Profa. Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, da Dra. Lenira Maria Queiroz Mauad, da Dra. Ana Lúcia Dalla Déa Trombini e das Enfermeiras Ana Marta B .A. Prado Auler e Célia Regina Chies Gilli do Serviço de Prevenção ao Câncer Ginecológico do Hospital Amaral Carvalho. No momento do exame, dentro da rotina estabelecida no Ambulatório, será retirado, um fragmento da lesão que será utilizado para realização do exame microscópico. Este exame faz parte da rotina normal de atendimento dessas pacientes. A pesquisa das proteínas participantes da imunidade será realizada no sangue periférico que será coletado através da punção da veia com seringa estéril no momento do exame.

Pelo presente instrumento, eu _____
devidamente esclarecida, ciente da autorização a mim solicitada, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, e ciente de que o risco do procedimento de coleta de sangue é mínimo, restrito ao desconforto da punção venosa e também, de que as informações serão utilizadas exclusivamente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste serviço**, firmo meu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta. Estou esclarecida ainda, que não receberei nenhuma gratificação financeira para participar desse estudo. Este documento será feito em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

Botucatu, _____ de _____ de 2009.

Assinatura da paciente

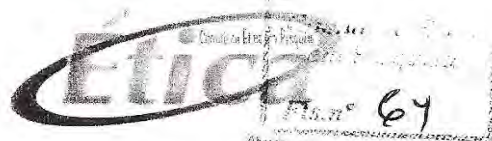
Danielle Ferreira e Silva
Rua Aurélio Ferrari, 357
Vl. Nova Botucatu, Botucatu, 18608-250
Fone: (14) 38826518
e-mail: danyferreira_silva@hotmail.com

Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias
Rua Dr. Luiz Ayres, 485
18607-020 Vila Sonia, Botucatu, SP
Fone: (14) 3813-7254
e-mail: candeias@ibb.unesp.br



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de abril de 2009.

Of. 117/09-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias
Departamento de Micro e Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezado Prof. Candeias,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3155-2009) "Avaliação da concentração de citocinas no soro de pacientes portadoras de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e carcinoma cervical invasor", a ser conduzido por Danielle Ferreira e Silva, orientada por Vossa Senhoria, com a participação dos Profs. Drs. Márcia Guimarães Silva, Mariângela Esther Alencar Marques, Paulo Traiman, da Doutoranda Jossimara Polettini e da Mestranda Larissa Doddi Marcolino, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06/04/2009.

Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.