

MARIANA MAYUMI TADOKORO

**PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM CERVICITE, LESÕES
CERVICAIS OU CARCINOMA CERVICAL**

CAMPO GRANDE

2021

MARIANA MAYUMI TADOKORO

**PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM CERVICITE, LESÕES
CERVICAIS OU CARCINOMA CERVICAL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular, do programa multicêntrico de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Inês Aparecida Tozetti.

CAMPO GRANDE

2021

RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é um agente infeccioso que tem a capacidade de induzir infecções crônicas sem repercussão sistêmica, e isso ocorre por vários motivos, como: ser exclusivamente intraepitelial, não promover inflamação ou lise celular, causar pouca ou nenhuma viremia, de certa forma, não ativando precocemente os mecanismos de alerta do sistema imune inato. É sabido que devido aos mecanismos pelos quais as células infectadas pelo HPV escapam da vigilância imunológica, incluindo a diminuição e ou alteração do perfil de citocinas, a persistência da infecção viral poderá ocorrer e assim culminar em alterações celulares tais como Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e Carcinoma cervical (CC). O estudo sobre perfis de citocinas é de extrema relevância para melhor entendimento sobre a infecção por HPV e a resposta imune do hospedeiro fornecendo assim uma compreensão mais elucidativa sobre citocinas como biomarcadores, possibilitando a busca por novos fármacos, estratégias de diagnósticos e tratamentos. O objetivo deste estudo foi detectar o perfil de citocinas em pacientes com cervicite, lesões cervicais ou carcinoma cervical. Foi realizada para tanto, uma pesquisa descritiva, observacional de corte transversal envolvendo pacientes atendidas no Hospital de Amor, unidade de Campo Grande – MS no durante o ano de 2019 e 2020, onde selecionou-se pacientes submetidas à citologia cervical, biopsia do colo uterino e pesquisa de HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV) pelo método Cobas® HPV *Test*. Foram incluídas no estudo 66 pacientes do com idade entre 25 a 65 anos (média de 42,29 anos). A análise de citocinas em pacientes com cervicite, lesões cervicais ou carcinoma cervical demonstrou que a IL-6 está em maior concentração em pacientes positivas para HPV16 que em relação a pacientes que positivaram para outros tipos de HR-HPV ($p < 0,05$). A IL-17 esteve presente em maior concentração em pacientes com cervicite, HSIL e carcinoma, também em pacientes HPV negativos, embora estes resultados não tenham sido significativos.

Palavras chaves: Papilomavírus humano; resposta imune; Interleucina-6

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is an infectious agent that induce to chronic infections without systemic repercussions, and this occurs for several reasons, such as: being exclusively intraepithelial, not promoting inflammation or cell lysis, causing little or no viremia, of course way, not activating the early warning mechanisms of the innate immune system. It is known that due to the mechanisms by which HPV-infected cells escape immunological surveillance, including the decrease and/or alteration of the cytokine profile, the persistence of viral infection may occur and thus culminate in cellular changes such as high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and Cervical Carcinoma (CC). The study of cytokine profiles is extremely relevant for a better understanding of HPV infection and the host's immune response, thus providing a more enlightening understanding of cytokines as biomarkers, enabling the search for new drugs, diagnostic and treatments. The aim of this study was to detect the cytokine profile in patients with cervicitis, cervical lesions or cervical carcinoma. For this purpose, a descriptive, observational, cross-sectional research was carried out involving patients treated at the Hospital de Amor, Campo Grande - MS unit in 2019 and 2020, where patients undergoing cervical cytology, cervical biopsy were selected, and screening for high oncogenic risk HPV (HR-HPV) by the Cobas® HPV Test method. Sixty-six patients aged between 25 and 65 years (mean 42.29 years) were included in the study. Cytokine analysis in patients with cervicitis, cervical lesions or cervical carcinoma have showed that IL-6 is in higher concentration in patients positive for HPV16 than in patients who positive for other HR-HPV ($p < 0.05$). IL-17 was present in higher concentration in patients with cervicitis, HSIL and carcinoma also HPV negative patients, although these results were not significant.

Keywords: Human Papillomavirus; immune response; Interleukin-6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Relação evolutiva entre os diferentes tipos de Papilomavírus humano.....	11
Figura 2 -	Estrutura genômica do HPV 16 e proteínas virais.....	12
Figura 3 -	Prevalência bruta de HPV específica por idade (%) em mulheres com citologia cervical normal no mundo e em suas regiões. HPV: Papilomavírus humano.....	14
Figura 4 -	O ciclo infeccioso do HPV.....	17
Figura 5 -	Ciclo infeccioso do HPV de alto risco.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados socioepidemiológicos de mulheres atendidas no Hospital do amor da unidade de Campo Grande, MS – 2019.....	27
Tabela 2 -	Mediana da concentração de citocinas em pacientes HR-HPV positivos e HR- HPV negativos.	28
Tabela 3 -	Mediana da concentração de citocinas de acordo com os grupos de paciente negativos para DNA de HR-HPV, pacientes positivos para HPV16 e pacientes positivos para outros HR-HPV.	29
Tabela 4 -	Mediana da concentração de citocinas em pacientes classificados em acordo com o as alterações histopatológicas.	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CTL = Células T citotóxicas

DNA= Ácido desoxirribonucleico

E = Região genômica precoce (*Early*) do HPV

HIV/AIDS = Vírus da Imunodeficiência Humana/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HPV = Papilomavírus humano

HPV-HR = Papilomavirus humano de alto risco oncogênico

HSIL = Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

IARC = Agência Internacional para pesquisa em cancer (*International agency for research on cancer*)

IFN = Interferon

IL = Interleucina

JAK = transdutor do Quinase-Sinal de Janus

L = Região genômica tardia (*Late*) do HPV

LCR = Longa Região de Controle (*Long Control Region*) do genoma do HPV

LSIL = Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

RNA = Ácido ribonucleico

RRPs = Receptores de reconhecimento padrão

STAT= Transdutor de sinal e ativadores da transcrição (*signal transducers and activators of transcription*)

Th = Linfócito T *helper*

TNF = Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	10
2.1. O Papilomavírus humano	10
2.2. Epidemiologia da infecção por HPV	12
2.3. Diagnóstico da infecção por HPV	15
2.4. Resposta Imune na infecção pelo HPV	16
2.5. Papel Das Citocinas na infecção por HPV	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. METODOLOGIA	22
4.1. Seleção das pacientes e coleta da amostra.....	22
4.2. Detecção de anti-HIV 1 e 2, anti- <i>Treponema pallidum</i> e HBsAg.....	23
4.3. Dosagem de citocinas.....	23
4.4. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS	24
5.2. Citocinas.....	28
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS.....	33
APÊNDICE A	42
ANEXO A	43

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus que possui fita dupla de DNA não envelopado sendo transmitido por contato pele - pele, pele - mucosa ou mucosa-mucosa (BOSCH et al., 2008). As doenças que podem ser induzidas pelo HPV variam de verrugas benignas, neoplasias de baixo e alto grau à neoplasia maligna, dependendo dos tipos de HPV e locais anatômicos da infecção (SMOLA et al., 2017). Mais de 200 genótipos foram caracterizados até o momento e classificados de acordo com o sítio da infecção (cutâneo e mucosos) e pelo potencial de causar câncer. Segundo o grau de oncogenicidade, podemos classificar o HPV em tipos de baixo risco oncogênico e ou risco indeterminado – HPV 6, 11, 42, 43 e 44, e alto risco oncogênico – HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 (MUÑOZ et al., 2003; BZHALAVA et al., 2014; BURD et al., 2003; DE VILLIERS, 2013).

O HPV tem a capacidade de induzir infecções crônicas sem repercussão sistêmica, e tal fato ocorre por vários motivos, como: ser exclusivamente intraepitelial, não promover inflamação ou lise celular, causar pouca ou nenhuma viremia, e desta forma não ativa mecanismos de alerta do sistema imune inato. (DOORBAR, 2005; STANLEY et al., 2009; KUPPER et al., 2004). Com o passar do tempo, durante o processo infeccioso, podemos ter o desenvolvimento de lesões malignas, a alteração ou destruição tecidual, a neovascularização e a invasão estromal, eventos que podem induzir a sinalização inicial para uma resposta imune. Porém, muitas vezes esse fato ocorre em estágio no qual o paciente já não é capaz de eliminar as células infectadas e ou tumorais (DUNN et al., 2002.). Sabe-se que os mecanismos pelos quais as células infectadas pelo HPV escapam da vigilância imunológica envolvem mudanças e/ou diminuição na produção local de interleucinas, comprometimento da detecção de antígenos virais pelas APCs, metilação do DNA ou modificação de histonas, supressão da transdução de sinal induzido pelos RRs, inibição da resposta de IFN em queratinócitos e também manipulação do maquinário de processamento de antígeno para dificultar o reconhecimento pelas células T durante o câncer cervical. (NICOL et al., 2005; JEE et al., 2021).

Estudos que envolvem a caracterização de perfis sistêmicos e locais de citocinas em mulheres com infecção por HPV cervical persistente são observados (BAKER et al., 2011; KOSHIOL et al., 2012), pois as citocinas estão intimamente ligadas com a

progressão da lesão, e sua falha ou elevação da concentração são situações que podem modular a resposta imune local (SCHMITT et al., 2014; WILSON et al., 2007; ASADZADEH et al., 2017).

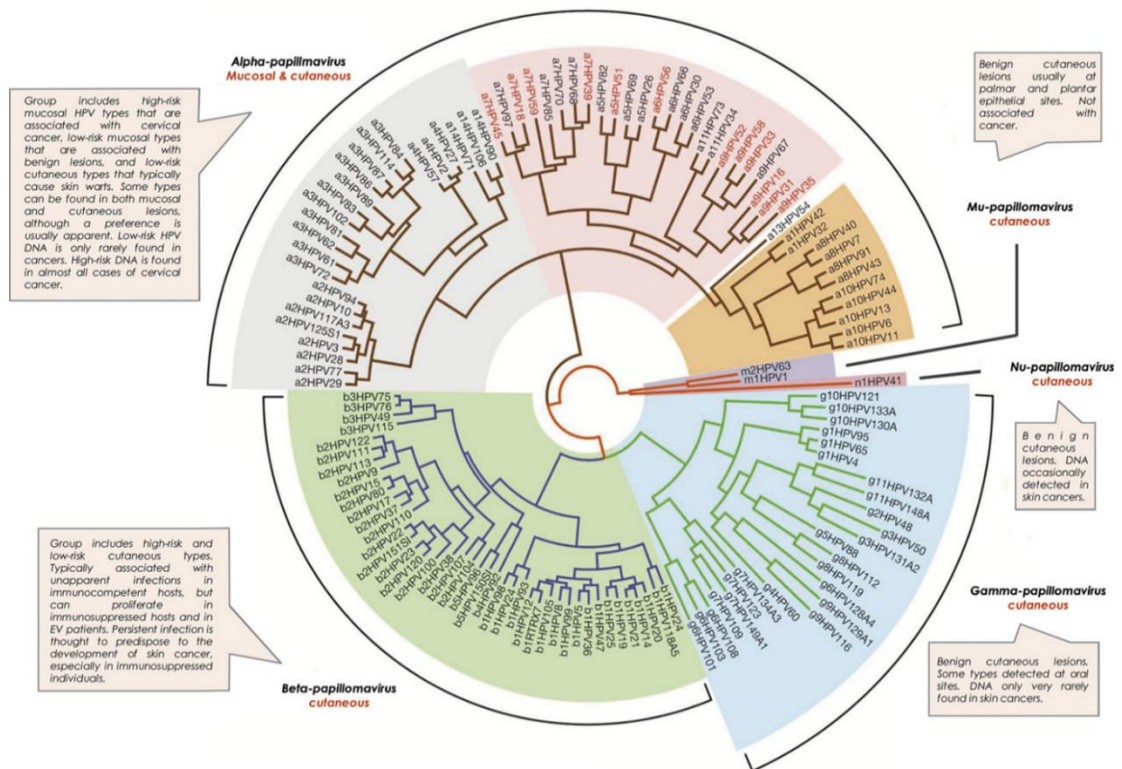
Portanto, o estudo sobre perfis de citocinas observado em cervicites, lesões cervicais e carcinoma é de extrema relevância para melhor compreensão sobre o comportamento e o funcionamento da resposta imune sistêmica durante a infecção por HPV, e assim elucidar sobre a participação destes elementos da resposta como biomarcadores da progressão da alteração celular. Tais estudos podem possibilitar o conhecimento de caminhos e comportamentos da resposta imune que contribuam para o estabelecimento de novas estratégias de diagnóstico indireto e acompanhamento dessa infecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. O Papilomavírus humano

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus não envelopado, que possui DNA de fita dupla e dividido em cinco gêneros principais os Alfa Papilomavírus, Beta Papilomavírus, Gama Papilomavírus, Mu Papilomavírus e Nu Papilomavírus; com diferente tropismo em relação ao epitélio, tendo em consideração a análise da sequência de DNA, características de ciclo de vida e associações com doenças distintas (figura 1), (BERNARD et al., 2010; DOORBAR et al., 2012).

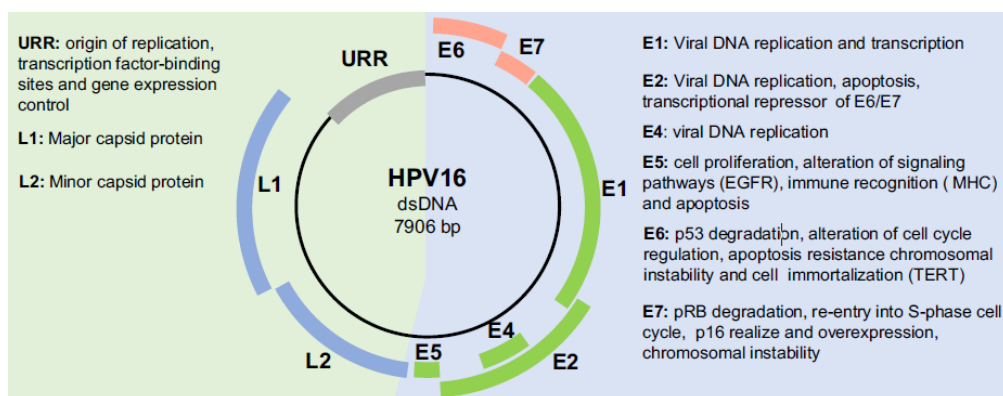
Figura 1 - Relação evolutiva entre os diferentes tipos de Papilomavírus humano.



Fonte: Doorbar et. al., 2012.

Mais de 200 tipos de HPV foram sequenciados e de acordo com a semelhança genética foram classificados baseados na homologia de seu genoma. Apesar da família Papilomavírus representar um grupo notavelmente heterogêneo de vírus, eles compartilham a mesma estrutura e organização do genoma (Bravo et al., 2015), ou seja, um genoma circular de DNA de dupla-cadeia de aproximadamente 8 kb e estruturado em três regiões principais: (figura 2): a região precoce (E) codifica genes necessários para o ciclo viral e com um papel importante na transformação celular (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e a região tardia (L) codifica as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral. Também se observa a Região Regulatória Upstream (LCR), que é uma região de não codificação que contém a origem de replicação e os locais de vinculação de fatores de transcrição que contribuem para regular a replicação do DNA, controlando a transcrição dos genes virais. Os genes E6 e E7 principalmente, juntamente com E1, E2, E4 e E5, têm expressão essencial para a replicação e síntese de proteínas virais, mas também desempenham um papel fundamental na transformação celular (DOORBAR *et al.*, 2012).

Figura 2 - Estrutura genômica do HPV 16 e proteínas virais.



Fonte: de Sanjosé et al., 2018.

O HPV é transmitido pelo contato pele a pele, pele e mucosa e mucosa-mucosa, sendo pequenos traumas cutâneos ou mucosos a porta de entrada do vírus (HANDLER et al., 2015). Assim, infectando as células epiteliais através da interação com os receptores de superfície celular, como a integrina $\alpha 6$, que é abundante nas células basais e nas células tronco epiteliais que o HPV tem acesso ao hospedeiro (COX et al., 2016). Com as recorrentes pesquisa, descobriu-se que alguns tipos de HPV, principalmente os do gênero Beta e Gama, provocam com maior frequência infecções assintomáticas e em menor grau sintomáticas, sendo que com maior incidência em pacientes imunocompetentes.

Em torno de 40 tipos virais são considerados mucosotrópicos e infectam a região anogenital. De acordo com o grau de oncogenicidade esses tipos virais são agrupados em baixo risco oncogênico ou risco indeterminado – HPV 4, 6, 11 – e alto risco oncogênico– HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 58, 68 . Na mucosa genital feminina os tipos de alto risco oncogênico são geralmente associados ao câncer de colo do útero, enquanto os de baixo risco são normalmente encontrados nas verrugas genitais (BURD et al., 2003; LORINCZ et al., 1992; MUÑOZ et al., 2003;).

2.2. Epidemiologia da infecção por HPV

A maior parte das infecções por HPV não causam sintomas e são de resolução natural, porém uma pequena parte das infecções pode tornar-se persistente e quando causada por vírus dos tipos de alto risco oncogênico, conduz a transformação celular ocasionando lesões pré-cancerosas e câncer cervical. Os tipos de alto risco oncogênico são responsáveis por praticamente todos os casos de câncer do colo do útero e estão

eventualmente associados com uma parte variável de outros cânceres anogenitais e de cabeça e pescoço s ridic.).

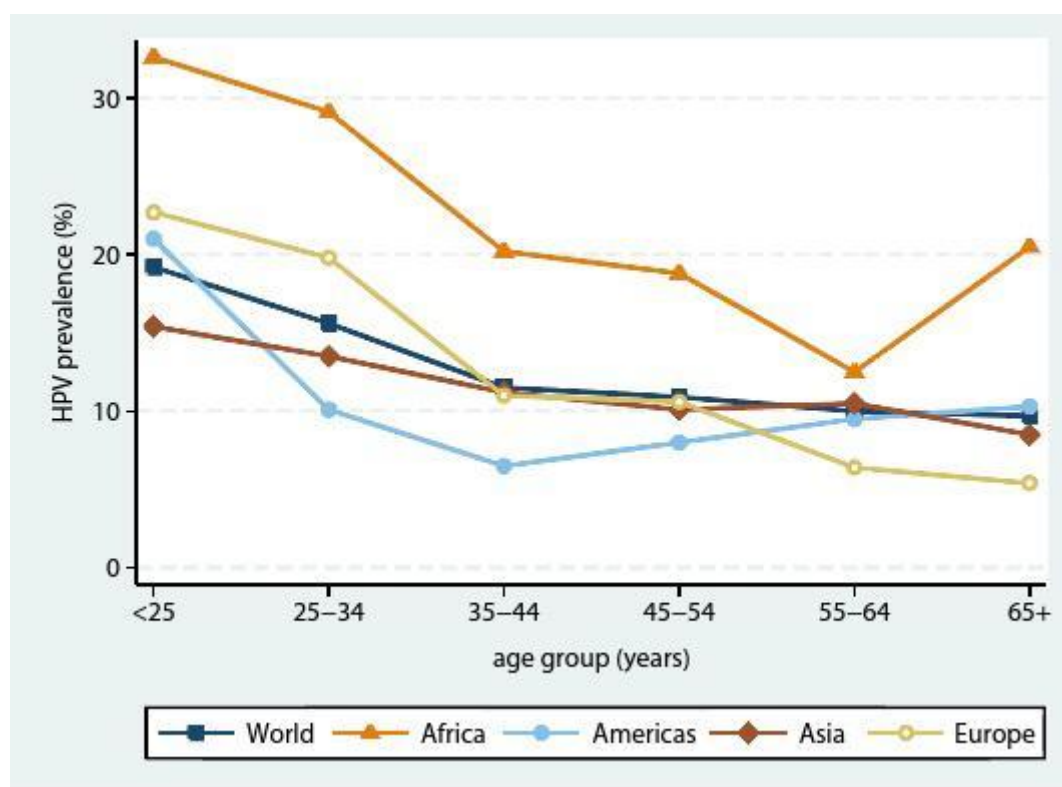
Embora historicamente conhecido como causa de verrugas comuns e anogenitais, estudos desde 1980, exploram o papel da HPV no desenvolvimento do câncer cervical e em outros tumores (PALEFSKY, 2016; REID et al., 1980). A relação causal entre a infecção pelo HPV e o câncer do colo do útero, que abriga o HPV em até 99,7% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999), foi destacada por Harald zur Hausen, que recebeu o Prêmio Nobel em 2008. Além do câncer do colo do útero, um número significativo de cânceres orofaríngeos, peniano, anal, vaginal e vulvar são induzidos pelos HPV mucosotrópicos (CHATURVEDI et al., 2011; BALDUR-FELSKOV et al., 2012; BUTTMANN-SCHWEIGER et al., 2015).

Em 2011 a Agência Internacional em Pesquisa do Câncer da OMS – definiu 12 tipos de HPV como carcinogênicos para humanos, e entre eles o que se destaca são o HPV 16 e o 18 por possuírem maior capacidade carcinogênica (IARC 2011). Mundialmente, o HPV16 é o tipo oncogênico mais frequente, detectado em 3,2% das mulheres com citologia normal, seguido pelo HPV 18 (1,4%), 52 (0,9%), 31 (0,8%) e 58 (0,7%), embora diferenças regionais no ranking do HPV sejam notadas (Bruni et al., 2010; BRUNI et al., 2017). A prevalência global de infecção pelo HPV é estimada em 11,7% (intervalo de confiança de 95%: 11,6 e 11,7), embora existam diferenças regionais relevantes e inúmeras variações de estudo para estudo em função de métodos de detecção utilizados e de populações estudadas. Prevalência especialmente alta de infecção por HPV é vista na África e Oceania, no entanto, a maior parte das infecções por HPV (70 a 90%) é assintomática e transitória - desaparece espontaneamente em 1 a 2 anos. A maior prevalência de HPV é observada em indivíduos jovens, em todas as regiões do mundo, atingindo o valor máximo em mulheres com menos de 25 anos (24,0%; 23,5 a 24,5), diminuindo à medida que a paciente avança em idade. Na Europa e Américas, observa-se um claro declínio com o avanço da idade, porém tal fato não é observado na África e na Ásia. Além disso, em algumas regiões como a África Ocidental e América Central e do Sul, existe um segundo pico de detecção em mulheres com idade mais avançada (BRUNI et al., 2017) (Fig. 3).

Guan et al., em 2012 publicaram que o HPV foi detectado em 52,5% das lesões ASCUS (atipia escamosa celular de significado indeterminado), 74,8% de lesões

cervicais de baixo grau – englobando lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau e neoplasias intraepiteliais cervicais de grau 1 (NIC1) – e 88,9% de lesões cervicais de alto grau em todo o mundo. Sendo que o HPV 16 foi o genótipo mais frequente detectado em todas as fases da doença.

Figura 3 - Prevalência de HPV específica por idade (%) em mulheres com citologia cervical normal no mundo e em suas regiões. HPV: Papilomavírus humano



Fonte: Bruni et al., J Infect Dis 2010.

Colpani et. al., 2020, demonstraram em revisão sistemática que a população brasileira possui uma alta prevalência de infecção por HPV em comparação com mulheres com citologia positiva em diferentes partes do mundo, como América Central, Norte da África, Europa Ocidental e sul da Ásia, demonstrando também que há uma variação na prevalência do HPV entre as diferentes áreas geográficas do Brasil, com aumento da prevalência no Nordeste e dados escassos das regiões geográficas Norte e Centro-Oeste.

Tozetti et al., 2006, avaliando pacientes encaminhadas para análise citológica, demonstraram que na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, dentro de 87 amostras cervicais analisadas 22% eram infectadas como HPV6/11, 22% com HPV66,

15,9 % com HPV 45, 9,8% com HPV18 e 8,5% com HPV 16, e que houve uma alta frequência de infecção por múltiplos tipos de HPV na população. Bonin et al., 2019 considerando como população de estudo (n=410), pacientes que foram encaminhadas para citologia oncótica em 2016 no Hospital de Barretos unidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, obtiveram como resultado que 26 pacientes foram positivas para DNA de HPV e os genótipos de alto risco oncogênico identificados foram HPV 59 (38,5%, 10/26), HPV 45 (19,2%, 5/26), HPV 18 (15,4%, 4/26), HPV 16 (11,5%, 3/26) , HPV 52 (11,5%, 3/26), HPV 66 (11,5%, 3/26), HPV 33 (3,8%, 1/26), HPV 31 (3,8%, 1/26), HPV 26 (3,8% , 1/26), HPV 30 (3,8%, 1/26), HPV 53 (3,8%, 1/26), HPV 69 (3,8%, 1/26) e HPV 82/85 (3,8%, 1 / 26). Enquanto que genótipos de baixo risco oncogênico foram os HPV6 / 11 (42,3%, 11/26) e HPV32 (3,8%, 1/26).

2.3. Diagnóstico da infecção por HPV

O diagnóstico precoce da infecção por HPV é um ponto de extrema importância na patogênese e consequente prevenção das lesões cervicais. O diagnóstico do HPV pode ser realizado por métodos diretos (ensaios moleculares) e indiretos de detecção viral, sendo que esses últimos têm ênfase na detecção de lesões cervicais, sendo o exame citológico cervical (Papanicolau ou exame preventivo do câncer de colo de útero) a abordagem de avaliação citológica mais utilizada, porém com baixa sensibilidade (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

O reconhecimento do forte vínculo etiológico entre infecção persistente por tipos de HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV) e câncer de colo uterino levou ao desenvolvimento de testes moleculares para detecção do HPV e com isso a triagem da infecção viral e prevenção do câncer de colo uterino. As evidências sobre a aplicação clínica dos testes para detecção do HPV são amplas, principalmente quando aplicadas na triagem para a citologia cervical e no acompanhamento após o tratamento das lesões precursoras do câncer do colo do útero (ARBYN et al., 2012). Estudos randomizados demonstraram que a triagem baseada no HPV é mais eficaz que a triagem citológica na redução da incidência de carcinoma escamoso invasivo e adenocarcinoma do colo do útero (RONCO et al., 2014). A compreensão dos padrões de expressão do gene do vírus durante a evolução da doença ajuda no desenvolvimento de testes diagnósticos mais precisos (SCHMITT et al., 2010).

Os ensaios moleculares de primeira geração que detectaram tipos virais de alto risco oncogênicos utilizaram coquetéis de sondas de DNA ou RNA e relatavam um resultado de presença/ausência com ou sem sinal quantitativo do vírus na amostra. No entanto, posteriormente os ensaios passaram a permitir resultados mais detalhados, embora com genotipagem limitada, por exemplo o Cobas *test*TM, que informa a presença dos tipos HPV16 ou HPV18 separadamente e os de alto risco oncogênicos restantes como um resultado em massa, ou ainda, ensaios mais completos de genotipagem, permitindo a notificação individual dos tipos virais (POLJAK et al., 2012).

O aprimoramento do diagnóstico pode levar à identificação de biomarcadores, que estão presentes em lesões cervicais de baixo grau e biomarcadores específicos de lesões de alto grau, ocasionando maior especificidade nos resultados e, também, produzindo eficiência maior no tratamento e ou acompanhamento da infecção (SCHMITT et al., 2010).

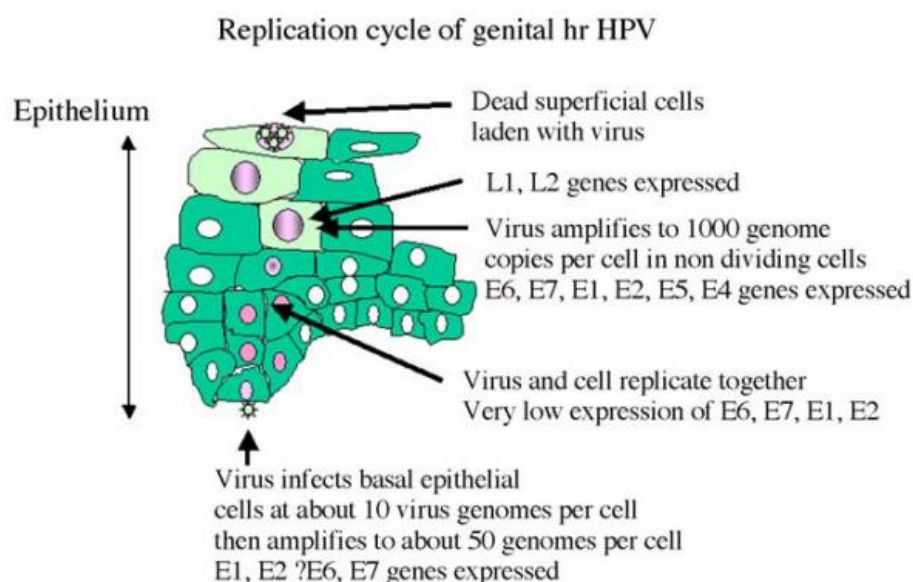
2.4. Resposta Imune na infecção pelo HPV

O ciclo infeccioso do HPV é direcionado a replicação nas camadas superiores do epitélio. As diferentes fases do crescimento viral acompanham o amadurecimento das células epiteliais à medida que avançam até o epitélio superficial (Fig. 4). Dessa forma o HPV evade o sistema imune, pois, o ciclo infeccioso e o crescimento viral estão intimamente ligados ao programa de diferenciação dos queratinócitos, que são células destinadas a morte e descamação e a liberação de partículas virais ocorre em locais de pouca vigilância imunológica. As proteínas virais retardam a condensação nuclear nos queratinócitos e formam os coilócitos, permitindo a replicação do vírus e, assim, o queratinócito repleto de vírus morre por exaustão (STERLING et al., 1993; STANLEY et al., 1994; MIDDLETON et al., 2003; STANLEY, 2006).

O período entre a infecção do epitélio basal e a liberação do vírus na superfície epitelial é cerca de 3 semanas e esse tempo é essencial para que o queratinócito basal se locomova através do epitélio, para assim se diferenciar por completo e descamar. Porém, o período entre a infecção e o surgimento de alterações no arcabouço epitelial varia de semanas a meses, o que sugere que o vírus tem uma grande efetividade em evitar as defesas do hospedeiro. Também, não existe a presença de citólise e nem de morte celular por conta da replicação e montagem do vírus, portanto não há presença de inflamação durante o período de duração do ciclo infeccioso do HPV, e há

possibilidades de haver pouca ou nenhuma liberação de citocinas pró-inflamatórias, que são essenciais para ativação de células apresentadoras de antígeno, o que pode levar a uma infecção crônica persistente, pois o hospedeiro pode não perceber o patógeno por longos períodos (fig 5.) (STANLEY, 2006)

Figura 4 - O ciclo infeccioso do HPV. O vírus infecta um queratinócito basal primitivo (provavelmente uma célula-tronco) através de microabrasão do epitélio da mucosa. Especula-se que os eventos iniciais imediatos de crescimento do vírus envolvem uma amplificação do número de cópia do vírus de 1-10 a 50-100 episomos/células do vírus. Na próxima fase do crescimento do vírus as células se replicam em conjunto e não há amplificação do número de cópia do vírus. Isso ocorre no compartimento proliferativo do epitélio. O queratinócito infectado então, entra no compartimento diferenciador do epitélio, saindo do ciclo celular. A expressão genética do vírus é extremamente regulada com amplificação viral de DNA gerando milhares de genomas virais. As proteínas virais tardias L1, L2 e E4 são expressas, e a montagem do vírus ocorre na superfície do epitélio.

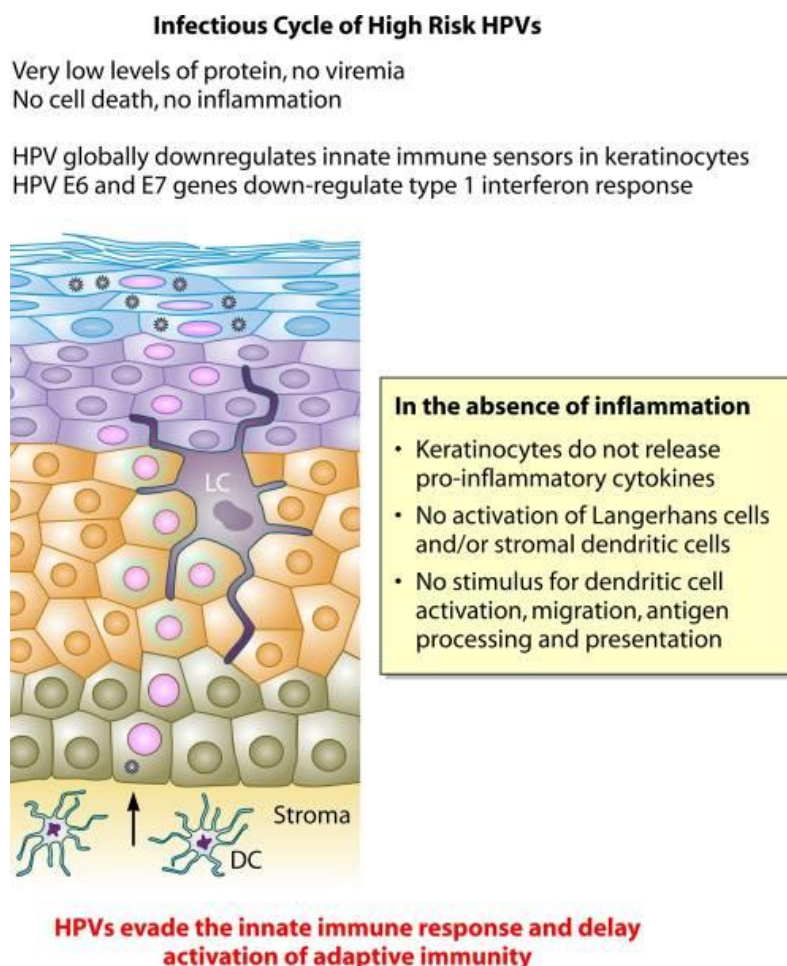


Fonte: Stanley et al., 2006.

Contudo, se a resposta imune não conseguir eliminar ou controlar replicação viral, então uma infecção persistente, muitas vezes com níveis pontuais de alta replicação de DNA do HPV, é estabelecida. Indivíduos infectados persistentemente por tipos de alto risco oncogênicos têm uma probabilidade elevada de progressão para

neoplasia intraepitelial cervical de alto grau e carcinoma invasivo (HO et al.,1998; BROWN et al.,2005; REMMINK et al.,1995; LONDESBOROUGH et al.,1996; LIAW et al.,1999; SCHLECHT et al.,2001). Os HPV de alto risco oncogênico regulam negativamente a expressão de Interferon-gama (CHANG et al., 2000; NEES et al., 2001), e as oncoproteínas HPV16 E6 e E7 interagem diretamente com componentes das vias de sinalização dos interferons inibindo essas vias (BARNARD et al., 1999; RONCO et al., 1998),. Em síntese, o HPV evita com competência a resposta imune inata e retarda a resposta imune adaptativa.

Figura 5 - Ciclo infeccioso do HPV de alto risco.



Fonte: Stanley et al., 2012.

A importância do sistema imunológico na eliminação de infecções por HPV fica clara em pacientes com sistema imunológico suprimido. A displasia e o carcinoma

induzidos pelo HPV ocorrem com maior frequência em receptores de transplante com imunossupressão iatrogênica ou em pacientes que vivem com HIV/AIDS (SILLMAN et al., 1997). Nesses pacientes linfócitos TCD4 intactos desempenham um papel importante na resolução de infecções por HPV. Além disso, o número de linfócitos T infiltrados nos papilomas com regressão espontânea é significativamente maior do que nas infecções persistentes (COLEMAN et al., 1994)

Os anticorpos específicos para o capsídeo do HPV são detectáveis em média 6 a 12 meses após a infecção, mas cerca da metade dos infectados permanece soronegativa. Os títulos de anticorpos são geralmente muito baixos. A soro conversão é frequentemente associada a um curso persistente de infecção (CARTER et al., 2000). Em estudo com mais de 7.000 mulheres, não foi observada proteção, contra a reinfecção com o mesmo tipo de HPV ao comparar mulheres soropositivas com mulheres soronegativas (VISCIDI et al., 2004).

Aparentemente, a soropositividade natural em humanos não é protetora, pois as infecções por HPV são eliminadas principalmente por pessoas imunocompetentes, através da resposta imune celular. Células de memória CD4 específicas direcionadas contra as proteínas E2 e E6 do HPV16 foram detectadas no sangue de pessoas saudáveis de forma mais frequente do que naquelas com doença (JONG et al., 2004). As respostas das células T à proteína E6 estão correlacionadas com a proteção contra persistência viral (WELTERS et al., 2003). Por outro lado, células de memória CD4 específicas para E7 ou L1 são encontradas em pessoas saudáveis e doentes (POELGEEST et al., 2006). Os linfócitos CD8 citotóxicos específicos para o HPV16 também são detectados no sangue de pacientes com câncer cervical. Porém, é difícil realizar prognósticos em relação ao curso da doença avaliando respostas das células T ou B (VALDESPINO et al., 2005).

2.5. Papel Das Citocinas na infecção por HPV

As células TCD4+, leucócitos (macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e entre outros leucócitos), células Natural Killer e outras, são exemplos de células que secretam proteínas que modulam o comportamento celular e agem em receptores específicos nas células alvos, e essas proteínas são chamadas de citocinas; elas atuam na própria célula que a produz, alterando as células vizinhas e podem atuar em células à distância (JANEWAY et al., 2007).

A principal produção de citocinas é feita pelas células TCD4+, que são comumente divididas principalmente cinco subconjuntos – Th1, Th2, Th17, Tfh e Treg – e essa divisão depende do tipo de citocinas produzida e da presença de determinados fatores de transcrição. A linhagem Th1 está ligada a imunidade celular e secreta principalmente as citocinas IL-2, IL-3, IL-12, linfotóxina, TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e INF; enquanto as células da linhagem Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 que atuam em associação com a resposta humoral e eventos alérgicos (KANODIA et al., 2007, FANG et al., 2017). As células Tfh são importantes para ajudar as células B a produzirem respostas aos anticorpos, promovendo a formação do centro germinativo, maturação de afinidade e, possivelmente, recombinação de troca de classe de imunoglobulina (CROTTY., 2019). As células Treg são críticas para a preservação da tolerância imunológica e envolvidas na prevenção de doenças autoimunes (DOMINGUEZ & HALFLER., 2018).

O subconjunto Th1 é o mais recorrente das células T efectoras de memória; e sua progressão está relacionado a sinais enviados pelas células apresentadoras de antígenos e citocinas liberadas contra patógenos bacterianos e virais intracelulares, como INF, IL-12 e IL-18, além de produzirem IL-2 e TNF- α , que tem por consequência a produção por células B de anticorpos IgG com capacidade de opsonização e fixação de complemento, ativação de macrófagos para citotoxicidade celular produzindo uma inflamação dependente de fagócito e a ativação de imunidade mediada por células, por exemplo a ativação de células T citotóxicas (CTL) que são excelentes na resposta imune a vírus.(VIEIRA et al., 2004; MA et al., 2017) .

A linhagem Th2 por outro lado produz citocinas que tem como função aumentar a imunidade humoral para combater infecções por parasitas, como helmintos, por meio da ativação de micrófagos do tipo 2 (M2), bem como do recrutamento de eosinófilos, basófilos e mastócitos para os locais de infecções. A linhagem Th2 favorece uma forte resposta humoral, porém inibe várias funções de células fagocíticas, a resposta inflamatória e a ativação de CTL (ROMAGNANI et al., 2000; GURRAM et al., 2019.).

O subtipo Th17 produz e secreta altos níveis de IL-17, e, citocinas inflamatórias como IL-21 e IL-22, e está relacionado a progressão tumoral gerando angiogênese e atividades imunossupressoras. Contudo, células Th17 possuem uma função ambígua sobre tumores; atuam na mediação de respostas imunológicas antitumorais, o que

promove o recrutamento de células do sistema imune ao local do tumor, ativando células TCD8⁺ contra os tumores ou, até mesmo, revertendo ao fenótipo Th1, produzindo IFN- γ que promove a ativação exacerbada de células TCD8⁺. (SCHMITT et al., 2014; WILSON et al., 2007; ASADZADEH et al., 2017).

Quando há progressão de lesão causada pelo Papilomavírus humano, é visto que, com a persistência do vírus, ocorre alterações na resposta imune, que por sua vez, é um fator determinante para o desenvolvimento do câncer cervical (KOSHIOL et al., 2008). Quando o câncer já está estabelecido, a resposta imune do hospedeiro tem grandes possibilidades de favorecer a progressão da lesão neoplásica (WILLIAMS et al., 2009). Tentativas para caracterizar que pacientes com HPV cervical persistente possuem perfis sistêmicos e / ou locais distintos de citocinas em comparação com aquelas que são livres de HPV ou sem infecção foram realizadas por alguns autores (BAKER et al., 2011; KOSHIOL et al., 2012).

SHUKLA et al., 2013 demonstraram que um fator que pode alterar os níveis de citocina em algumas condições patológicas e que também afeta a resposta imune é o desequilíbrio de Th1/Th2. Também sabe-se que alterações em certas citocinas, por exemplo IL-6 e IL-2, que são causadas por uma infecção viral persistente, induzem hiperplasia do epitélio vascular local ativando via da janus kinase (JAK) e os ativadores da transcrição da família STAT) que causam proliferação de células epiteliais e evolução da doença. Níveis circulantes ou locais mais altos de interleucina IL -6, IL -8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) têm sido associados à redução da depuração cervical do HPV, sugerindo que as citocinas secretadas podem ser precursoras da progressão e evolução da doença, embora os resultados tenham sido dúbios (BAKER et al., 2011; SCOTT et al., 2013; HONG et al., 2010; MBULAITEYE et al., 2013).

As citocinas promovem e orientam a geração de padrões de imunidade para estimular a resposta necessária a eliminação do patógeno, o que pode levar a lesões teciduais se a ativação for exacerbada como ocorre em algumas formas de inflamação (HOLDSWORTH; GAN, 2015). Por isso, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreender as citocinas como biomarcadores na infecção viral e na progressão ou regressão dos processos neoplásicos, para assim compreender o funcionamento do sistema imune perante esses eventos, e com isso, promover a busca novas estratégias de diagnóstico e tratamento para a infecção por HPV relacionado ao câncer cervical.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Detectar o perfil de citocinas em pacientes com cervicite, lesões cervicais ou carcinoma cervical.

3.2. Objetivos específicos

- Mensurar citocinas relacionadas aos perfis Th1 / Th2 / Th17 em amostras de soro de pacientes com cervicite, lesões cervicais ou carcinoma cervical;
- Relacionar o padrão de citocinas com as alterações citológicas e histopatológicas.
- Relacionar o padrão de citocinas obtidas com a presença de Papilomavírus de alto risco oncogênico.
- Relacionar o padrão de citocinas obtidas com os tipos virais encontrados.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção das pacientes e coleta da amostra

A partir de uma pesquisa descritiva, observacional de corte transversal envolvendo pacientes atendidas no Hospital de Amor, unidade de Campo Grande – MS no durante o ano de 2019 e 2020 e participantes do estudo “Avaliação fenotípica de células linfoides da imunidade inata e citocinas em pacientes positivas para DNA de Papilomavírus humano com lesão intraepitelial escamosa de baixo, alto grau e ou carcinoma invasivo” Chamada FUNDECT N° 06/2017 – UNIVERSAL-MS

Foram incluídas no estudo pacientes maiores de 25 anos que após à citologia oncológica foram encaminhadas para detecção de DNA de HPV pelo método Cobas® HPV Test, e para o exame de biopsia de cérvix uterina obtendo resultado histopatológico de Cervicite Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL), Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) ou Carcinoma Cervical.

Foram excluídas do estudo aquelas pacientes com idade menor que 25 anos, gestantes, mulheres que faziam uso de medicamentos imunossupressores ou que se declararam portadoras do vírus da imunodeficiência humana, infectadas pelos vírus das hepatites, com Sífilis e/ou Tuberculose e ter sido vacinada para o HPV.

As participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam ao questionário socioepidemiológico (Apêndice A) contendo perguntas mistas, referente a idade, escolaridade, fatores predisponentes a infecção por HPV, presença ou utilização de cofatores associados à progressão para neoplasia, utilização de métodos preventivos da infecção e realização do exame citológico. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e ao comitê de ética da Fundação Pío XII – Barretos (SP) e aprovado sob parecer nº 2.685.400 de 30/05/2018 (Anexo A)

De cada paciente foi coletada amostra de sangue periférico, processada dentro de 2-4 horas após a coleta para obtenção de plasma e armazenada a -80°C para dosagens de citocinas. Os dados secundários, tais como resultados dos exames histopatológicos e de detecção do DNA do HPV, foram obtidos por análise de prontuário no Hospital de Amor – Unidade de Campo Grande (MS).

4.2. Detecção de anti-HIV 1 e 2, anti-*Treponema pallidum* e HBsAg

Com o objetivo de excluir outras infecções que pudessem alterar o perfil de citocinas entre as pacientes, as amostras obtidas foram utilizadas para a determinação das infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B (HBV) e pelo *Treponema pallidum*, agente causador da Sífilis. Foram utilizados os seguintes testes rápidos: HIV Test Bioeasy (Standard Diagnostics, Inc., Coréia do Sul), Vikia® HBsAg (Biomerieux, França) e TR DPP Sífilis DUO Bio Manguinhos (Fundação Oswaldo Cruz, Brasil), respectivamente. Todos os três testes são qualitativos, baseados em métodos imunocromatográficos e aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pela regulamentação, controle e supervisão de produtos e serviços que envolvem riscos à saúde pública no Brasil.

4.3. Dosagem de citocinas

A partir do soro armazenado de 70 pacientes triadas para as infecções acima citadas, foi realizada a mensuração das citocinas IL2, IFN γ , IL4, IL6, IL10, TNF e IL17A com a utilização do Citokine Bead Array (CBA) humano Th1/Th2/Th17 (BD

Biosciences, San Jose, CA, EUA). A preparação dos padrões, beads, amostras e protocolos para configuração do citômetro de fluxo e aquisição de dados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas utilizando um citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e analisadas com o software FCAP Array V. 3.0 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os resultados foram baseados em curvas de concentração padrão e expressos em pg / mL.

4.4. Análise estatística

Para a análise estatística as pacientes foram divididas em: grupos etários (25 - 35 anos; 36 - 50 anos e acima de 50 anos); de acordo com a positividade do teste HPV Cobas; em relação aos tipos virais e de acordo com as alterações celulares observadas. Tais grupos formados foram analisados com relação a concentração das citocinas dosadas (IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; TNF; IFN- γ e IL-17A).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS 17.0 e BioEstat versão 5.0. As variáveis foram comparadas ($p \leq 0,05$) utilizando o teste Kruskal Wallis para comparação dos grupos com 95% de intervalo de confiança e quando as diferenças entre os grupos foram observadas utilizou-se o teste de Mann Withney.

5. RESULTADOS

Os resultados foram obtidos por um estudo observacional de corte transversal com amostra não probabilística, onde o grupo amostral foi composto até o momento, por 70 pacientes do sexo feminino atendidas no Hospital de Amor, unidade de Campo Grande – MS, durante o ano de 2019 e 2020. Foram excluídas: uma paciente que possuía atrofia cervical (n=1), pois essa condição diminui a espessura do epitélio e portanto, não oferecendo o ambiente para a infecção por HPV; uma paciente que possuía lesão vaginal de baixo grau (n=1), devido a infecção da região vaginal não ser alvo desse estudo; além de, mais duas por não possuírem resultados do Cobas *test*; o que justifica o n = 66 para as análises. Essas pacientes são participantes do estudo “Avaliação fenotípica de células linfoides da imunidade inata e citocinas em pacientes positivas para DNA de Papilomavírus humano com Lesão Intraepitelial Escamosa de

Baixo, Alto Grau e ou Carcinoma Invasivo” Chamada FUNDECT N° 06/2017 – UNIVERSAL-MS.

A faixa etária participante do projeto compreendeu mulheres de 25 a 65 anos. A média de idade das pacientes foi de 42,29 anos, sendo que as 66 participantes responderam ao questionário. Dentre estas, 34,85% (23/66) tinham de 25 anos a 35 anos, 39,40% (26/66) de 36 a 50 anos e 25,76% (17/66) mais de 50 anos. Com relação ao grau de escolaridade, 4,54% (3/66) das pacientes não concluíram o ensino fundamental, 37,87% (25/66) concluíram o ensino fundamental, 43,93% (29/66) concluíram o ensino médio e 13,63% (9/66) concluíram o ensino superior (Tabela 1).

A média de idade relatada para a primeira relação sexual foi de 16,77 anos. O início da vida sexual antes ou até os 16 anos de idade foi relatado por 33,33% (22/66) das pacientes e após 16 anos por 66,66% (44/66) mulheres. Quanto ao uso de preservativos uma paciente não respondeu essa variável, então 67,70% (44/65) das pacientes afirmaram não utilizar preservativos (Tabela 1).

Em relação ao uso de terapia hormonal 62,12% (41/66) das pacientes afirmaram não utilizar terapia hormonal, enquanto 83,33% (55/66) das pacientes não relataram episódios de IST (infecção sexualmente transmissível). Para as variáveis relacionadas ao tabaco e ao álcool, 89,39% (59/66) das pacientes relataram não fazer uso de tabaco e 59,09% (39/66) relataram não ingerir álcool (Tabela 1).

Quanto a realização do exame citológico de colo de útero (preventivo – Papanicolau), 62,12% (41/66) das pacientes realizam o exame uma vez ou mais ao ano (Tabela 1).

As alterações celulares presente nas pacientes, assim como o genótipo do HPV, pode ser observados nas Figuras 1 e 2.

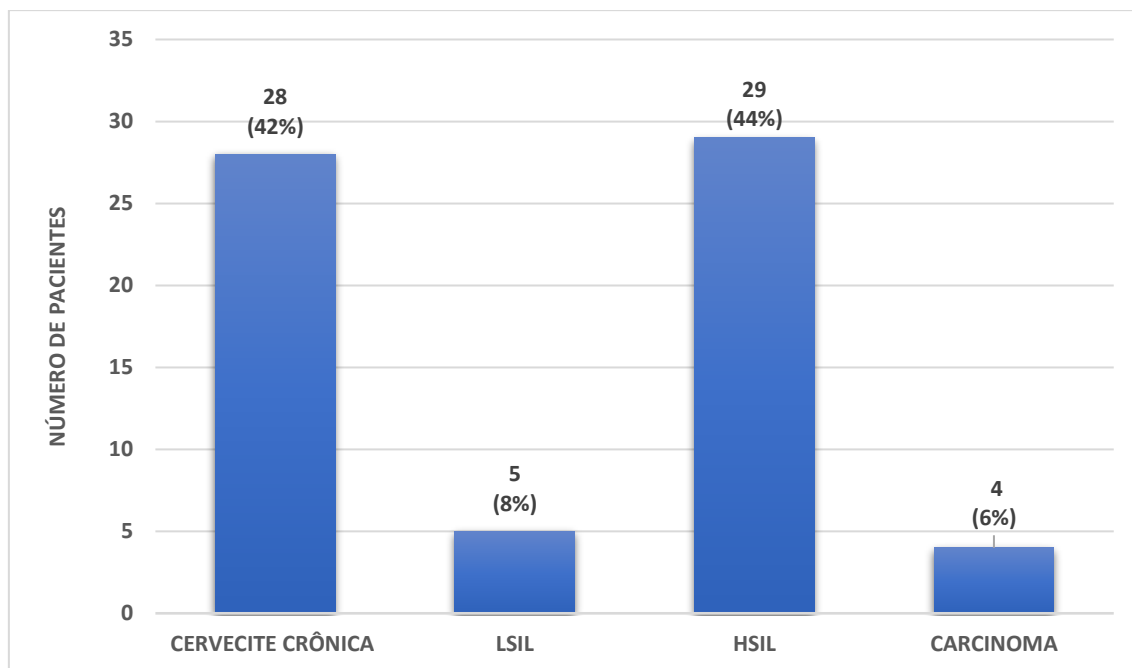


Figura 1 - Alterações celulares histopatológicas observadas nas pacientes atendidas no Hospital de Amor – unidade de Campo Grande, 2019 – MS (n= 66). HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau. LSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau.

Tabela 1 – Dados socioepidemiológicos de mulheres atendidas no Hospital do amor da unidade de Campo Grande, MS – 2019 (n=66).

VARIÁVEIS		N°.	%
Idade	25 anos à 35 anos	23	34,85
	36 anos à 50 anos	26	39,40
	Acima de 50 anos	17	25,76
Escolaridade	Sem estudo	3	4,54
	Fundamental	25	37,87
	Médio	29	43,93
	Superior	9	13,63
Primeira relação sexual	< 16 anos	22	33,33
	≥ 16 anos	44	66,66
*Preservativo	Sim	21	32,30
	Não	44	67,70
Terapia hormonal	Sim	25	37,87
	Não	41	62,12
Relato de IST	Sim	11	16,66
	Não	55	83,33
Tabaco	Sim	7	10,60
	Não	59	89,39
Álcool	Sim	27	40,90
	Não	39	59,09
Preventivo	≤ 1x ao ano	25	37,87
	> 1x ao ano	41	62,12

IST: Infecção sexualmente transmissível; N°: Número de pacientes; %: Porcentagem; *para essa variável o n=65.

Na figura 2 podemos observar os genótipos identificados através da utilização do método Cobas HPV test™ em 68,2% (45/66) das pacientes positivas para HPV-HR, sendo que 31,81% (21/66) das pacientes apresentaram resultado negativo para a pesquisa de DNA de HR-HPV.

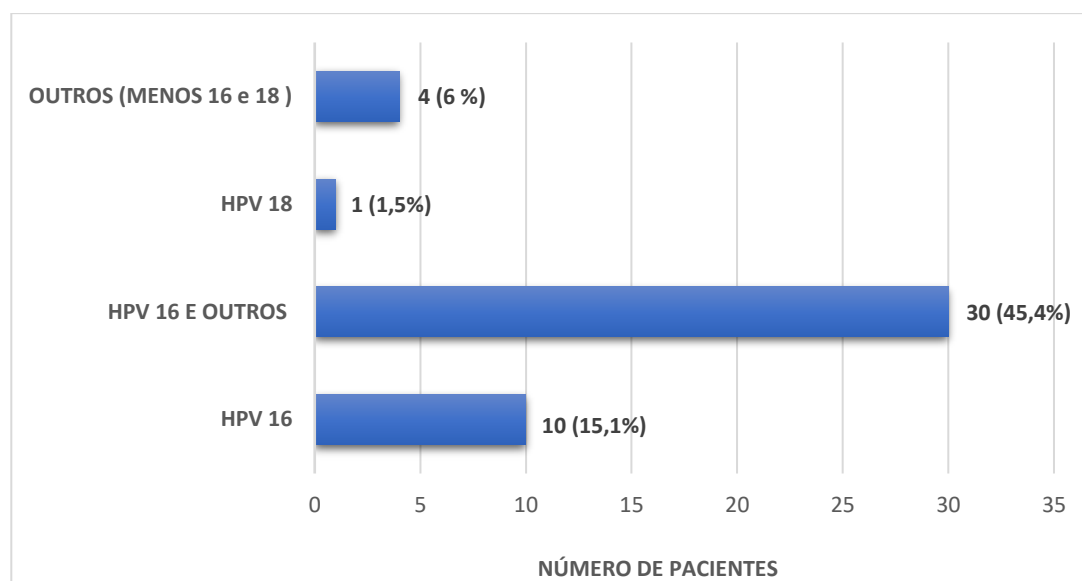


Figura 2 - Frequência dos genótipos do Papilomavírus humano, identificados pelo método Cobas® test, em pacientes positivas para DNA de HR-HPV, atendidas no Hospital de Amor – unidade de Campo Grande, 2019 – MS (n= 45).

5.2. Citocinas

Em relação a avaliação da diferença de concentração de citocinas quanto a positividade para DNA de HR-HPV (Tabela 2) entre as pacientes analisadas, foi demonstrado que pacientes HR-HPV negativas obtiveram uma concentração maior de IL-17A em relação a pacientes HR-HPV positivas e, também, a concentração de IL-17A se mostrou maior em relação as outras citocinas em paciente HPV positivas, porém estes resultados não obtiveram significância quando submetidos a análise estatística ($p>0,05$).

Tabela 2. Mediana da concentração de citocinas em pacientes HR-HPV positivos e HR- HPV negativos.

Citocinas	Pacientes	
	HR-HPV positivos	HR-HPV negativos
	N=45 Mediana (25%-75%)	N=21 Mediana (25%-75%)
IL-17A	6,86 (0,0-11,94)	7,84 (1,92-11,02)
INF-	0,00 (0,00-0,03)	0,00 (0,00-0,39)
TNF	0,21 (0,00-0,69)	0,21 (0,00-0,69)
IL-10	1,21 (0,76-1,53)	1,10 (0,82-1,70)
IL-6	1,57 (1,16-2,38)	1,92 (0,99-2,83)
IL-4	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
IL-2	0,45 (0,24-0,87)	0,50 (0,29-0,82)

O teste de Kruskal Wallis foi realizado e $p \geq 0,05$. A concentração foi obtida em pg/ml.

Em relação aos genótipos virais encontrados quando comparados aos níveis de concentração de citocinas, identifica-se maior concentração da citocina IL-6 em pacientes positivas para HR-HPV16 em relação a pacientes que positivaram para outros tipos de HR-HPV (Tabela 3).

Tabela 3. Mediana da concentração de citocinas de acordo com os grupos de paciente negativos para DNA de HR-HPV, pacientes positivos para HPV16 e pacientes positivos para outros HR-HPV.

Citocinas	negativos	HPV16	outros HR-HPV
	N=21 Mediana (25%-75%)	N=10 Mediana (25%-75%)	N=30 Mediana (25%-75%)
IL-17A	7,84 (1,92-11,01)	6,02 (0,00-9,12)	5,19 (0,00-8,75)
INF- γ	0,00 (0,00-0,39)	0,26 (0,00-1,40)	0,00 (0,00-0,03)
TNF	0,21 (0,00-0,69)	0,07 (0,00-1,55)	0,45 (0,00-0,69)
IL-10	1,10 (0,82-1,70)	1,21 (0,53-1,64)	1,29 (0,87-1,50)
IL-6	1,92 (0,99-2,83)	2,26 (1,80-3,58) *	1,40 (0,80-2,12) *
IL-4	0,00 (0,00-0,00)	#	0,00 (0,00-0,30)
IL-2	0,50 (0,29-0,82)	0,74 (0,66-0,92)	0,40 (0,18-0,82)

*Para a citocina IL-6 o teste de Kruskal Wallis obteve $p \leq 0,05$, por tanto o teste de Mann Withney foi realizado e p foi $\leq 0,05$ para os grupos HPV16 *versus* outros HR-HPV. Para os demais grupos e citocinas o teste de Kruskal Wallis foi $p \geq 0,05$. A concentração foi obtida em pg/ml. HR-HPV: HPV de alto risco-oncogênico. Outros HR-HPV: HPV31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, e -68. #valor encontrado é inferior ao limite de detecção do teste. (IL-2/2,6 pg/ml; IL-4/4,9 pg/ml; IL-6/2,4 pg/ml; IL-10/4,5 pg/ml; TNF/3,8 pg/ml; INF γ /3,7 pg/ml; IL-17A /18,9 pg/ml.). O grupo de pacientes HPV 16 e outros HR-HPV foi excluído dessa análise para minimizar a interferência. O tipo viral HPV 18 foi retirado dessa análise por ter apenas 01 paciente.

Em relação as alterações celulares (Tabela 4) quando comparadas com os níveis de citocinas demonstraram que a citocinas IL-17A apresentou elevada frequência de concentração em pacientes com cervicite, HSIL e carcinoma; e reduzida frequência em pacientes com LSIL. Entretanto, tais dados não obtiveram valores de significativo ($p > 0,05$) após serem submetidos a análise estatística.

Tabela 4. Mediana da concentração de citocinas em pacientes classificados em acordo com o as alterações histopatológicas.

Citocinas	Alterações Celulares			
	Cervicite N=28 Mediana (25%-75%)	LSIL N=5 Mediana (25%-75%)	HSIL N=29 Mediana (25%-75%)	Carcinoma N=4 Mediana (25%-75%)
IL-17A	7,83 (0,54-13,62)	2,32 (0,59-3,44)	7,84 (3,44-13,47)	7,51 (3,59-8,32)
INF- γ	0,00 (0,00-0,33)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,28)	0,01 (0,00-0,71)
TNF	0,21 (0,01-0,69)	0,00 (0,00-0,02)	0,40 (0,00-0,78)	0,15 (0,00-1,02)
IL-10	1,12 (0,82-1,45)	1,48 (0,93-1,53)	1,21 (0,76-1,64)	0,78 (0,25-1,72)
IL-6	1,80 (1,07-2,63)	1,86 (1,46-2,38)	1,57 (0,99-2,20)	3,43 (2,54-9,51)
IL-4	0,00 (0,00-0,17)	#	0,00 (0,00-0,00)	#
IL-2	0,50 (0,18-0,84)	0,24 (0,00-0,40)	0,50 (0,24-1,07)	0,82 (0,38-0,89)

O teste de Kruskal Wallis foi realizado e $p \geq 0,05$. A concentração foi obtida em pg/ml. LSIL: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau; HSIL: Lesão Intraepitelial de Alto Grau. #valor encontrado é inferior ao limite de detecção do teste. (IL-2/2,6 pg/ml; IL-4/4,9 pg/ml; IL-6/2,4 pg/ml; IL-10/4,5 pg/ml; TNF/3,8 pg/ml; INF γ /3,7 pg/ml; IL-17A /18,9 pg/ml.)

6. DISCUSSÃO

Como é de conhecimento geral, a maioria das infecções por HPV são transitórias, sendo que o sistema imunológico desempenha funções importantes durante este evento. A maior parte das infecções por HPV (75% - 90%) são eliminadas naturalmente, contudo, se houver persistência de infecção por HR-HPV ocorre interferência nos mecanismos de controle celular, a partir dos genes virais, que pode originar alterações neoplásicas, podendo evoluir para carcinoma (RODRÍGUEZ et al., 2008; JIT et al., 2010; INSINGA et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2010.)

Estudos demonstram que até 80% das mulheres sexualmente ativas são infectadas por HPV ao menos uma vez na vida, sendo que, geralmente, mulheres se infectam com HPV no período do final da adolescência e posteriormente ao início dos 30 anos, e esta informação corrobora com o pico da infecção que é em torno do início da atividade sexual em meninas e mulheres jovens (FRANCESCHI et al., 2006; MAYRAND et al., 2007; DAS et al., 1989). Tal dado está em concordância com a escolha da faixa etária do estudo, onde tem-se mulheres entre 25 e acima de 50 anos, sendo que a maioria das nossas pacientes iniciaram a vida sexual com 16 anos ou mais.

O processo de indução do câncer cervical pode ser acelerado pelas associações de inflamações, incidências de co-infecções e pela infecção por HPV, sendo tais fatores precursores de circunstâncias inflamatórias, desencadeando assim uma resposta importante, culminando para tal evento (SUBBARAMAIAH et al., 2007). O estudo de LIAO et al, 2019 e estudos anteriores (WANG et al., 2018; LI et al., 2018; ZHONG et al., 2017) que envolvem pacientes encaminhadas para análise citológica, demonstram que a prevalência geral de infecção por HPV foi de 74% entre a população estudada, sendo que em nosso estudo, considerando a semelhança da população, obtivemos 68,2% das pacientes positivas para o HR-HPV, corroborando assim com a literatura.

Iwata et al., 2015 demonstraram que 98,5% da sua população de estudo possuía HSIL; enquanto. Liao et al, 2019 demonstraram 75,6% de pacientes com HSIL. Castle et al., 2001 e outros estudos (FIGUEIREDO et al., 2008; SALES; KATZ, 2012) demonstraram que há associação entre cervicite e HSIL, e está intimamente associada ao diagnóstico citológico de pacientes HPV positivo. Sobre as alterações celulares do nosso estudo, obtivemos um número maior de pacientes que possuíam lesão

intraepitelial de alto grau 44% (29/66) e cervicite crônica 42% (28/66), sendo que pacientes com carcinoma foram 6% (4/66). Mesmo que a literatura tenha demonstrado que há uma relação entre HR-HPV, HSIL, cervicite crônica e câncer cervical, não podemos afirmar que essas alterações do nosso estudo estejam relacionadas com a infecção persistente do HR-HPV.

Em relação aos genótipos do Papilomavírus humano encontrados em nosso estudo, obtivemos uma maior frequência de pacientes que positivaram (45,4%) para HPV16 e outros HR-HPV, sendo que apenas 10 pacientes foram positivas somente para HPV16. Liao et al, 2019, obtiveram que mulheres positivas para HR-HPV com HSIL e câncer cervical, em sua maioria, possuíam o genótipo HPV16 e outros genótipos de alto grau, além disso outro estudo demonstrou que o HPV16 foi o tipo mais comum em casos de HSIL (HANG et al., 2017). Tal fato corrobora com os resultados observado em nossa população amostral.

Nossos resultados entram em concordância com o estudo de Bonin et al., 2021 que não obteve diferenças significativas nas concentrações de citocinas no soro quanto a positividade para DNA de HPV.

Os genótipos mais comumente relacionados ao câncer cervical são o HPV 16 e o HPV 18, porém alguns estudos correlacionaram o câncer e suas lesões precursoras a outros genótipos de HR-HPV (SCHIFFMAN et al., 2007; LI et al., 2011). O estudo de Bonin et al, 2021 obteve níveis elevados de IL-6 no esfoliado de cérvix uterina de pacientes positivas para HR-HPV, o que sugere que essa citocina é produzida principalmente no local da infecção e que a resposta imune no mesmo paciente pode ser diferente quando avaliamos sistemicamente. Estudos demonstraram que a IL-6 induz mecanismos de expressão de fator de crescimento endotelial vascular via STAT3, gerando angiogênese tumoral e tendo efeito anti-apoptótico, podendo assim, promover o desenvolvimento do câncer cervical. Há conhecimento que a via IL-6/STAT3 também está intimamente ligada a lesões cervicais e carcinogênese causada por HR-HPV, onde a IL-6 e receptores ativam a via JAK/STAT, que gera uma alta expressão das proteínas E6/E7 (HONG; LAIMINS, 2013; FAN; SHEN, 2018).

Nosso demonstrou que a citocina IL-6 está em maior concentração em pacientes positivas para HPV16 que em relação a pacientes que positivaram para outros tipos de HR-HPV. Porém, em nosso estudo utilizamos soro das pacientes, ou seja, avaliamos a

presença sistêmica e não local desta citocina. A presença desta citocina de forma sistêmica pode estar relacionada a persistência da infecção, ou então devido a extensão do comprometimento do epitélio. Denotando uma ativação da resposta imune de forma sistêmica e não localizada ao epitélio.

Estudos demonstram que a falha na imunidade celular, aparentemente, facilita o desenvolvimento de lesões associadas ao HPV, reforçando que a imunossupressão possui um importante papel na persistência da infecção pelo HPV e na hiperplasia epitelial associada ao vírus (FRISCH et al., 2000; TINDLE, FRAZER., 1994; BHAT et al., 2011). A IL-17, é uma das principais citocinas pro-inflamatória e que está intimamente associada com a resposta inflamatória desregulada e desencadeada pela infecção pelo HPV (ALVES et al., 2018). Xue et al., 2018, observaram que os níveis de IL-17 no sobrenadante do homogenato de tecido cervical, aumentaram exponencialmente em relação ao grau da lesão cervical. Bonin et. al. 2019, observou que os níveis de IL-17 foram maiores no soro de pacientes HR-HPV positivas, demonstrado que há uma maior estimulação da produção dessa citocina em nível sistêmico, porém não houve valores significativos da concentração de IL-17 em relação a pacientes que possuíam HSIL.

Em nossos resultados, em relação as alterações celulares, a frequência de IL-17A em pacientes com cervicite, HSIL e carcinoma foi elevada comparada com outras citocinas e alterações, porém esses dados não foram significativos. Bonin et al., 2019 que também não obteve valores significativos sobre a concentração de IL-17 e HSIL. Os resultados não significantes obtidos em nosso estudo podem refletir a população estudada e a detecção da citocina no soro. Como limitações do estudo observamos o pequeno número de pacientes com diagnóstico de carcinoma.

7. CONCLUSÃO

A análise de citocinas em pacientes com cervicite, lesões cervicais ou carcinoma cervical demonstrou que a IL-6 está em maior concentração em pacientes positivas para HPV16 que em relação a pacientes que positivaram para outros tipos de HR-HPV ($p < 0,05$). A IL-17 esteve presente em maior concentração em pacientes com cervicite, HSIL e carcinoma, também em pacientes HPV negativos, embora estes resultados não tenham sido significativos.

8. REFERÊNCIAS

- ARBYN, M. et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. **Vaccine**, v. 30, p. F88-F99, 2012.
- ALVES, Jayra Juliana Paiva et al. Th17 response in patients with cervical cancer. **Oncology letters**, v. 16, n. 5, p. 6215-6227, 2018.
- ASADZADEH, Z. et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. **Cellular immunology**, v. 322, p. 15-25, 2017.
- BAKER, R. et al. Increased plasma levels of adipokines and inflammatory markers in older women with persistent HPV infection. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 282-285, 2011.
- BALDUR-FELSKOV, B. et al. Increased incidence of penile cancer and high-grade penile intraepithelial neoplasia in Denmark 1978–2008: a nationwide population-based study. **Cancer Causes & Control**, v. 23, n. 2, p. 273-280, 2012.
- BARNARD, P; MCMILLAN, N. A. J. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α . **Virology**, v. 259, n. 2, p. 305-313, 1999.
- BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, medicine, and public health**, v. 2015, n. 1, p. 32-51, 2015.
- BROWN, D. R. et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 2, p. 182-192, 2005.
- BERNARD, H. -U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.
- BONIN-JACOB, C. M. et al. Interleukin-17 expression in the serum and exfoliated cervical cells of patients infected with high-risk oncogenic human papillomavirus. **Cytokine**, v. 120, p. 92-98, 2019.
- BONIN-JACOB, C. M. et al. IL-6 and IL-10 in the serum and exfoliated cervical cells of patients infected with high-risk human papillomavirus. **PloS one**, v. 16, n. 3, p. e0248639–e0248639, 22 mar. 2021.
- BOSCH, F. X. et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v. 26, p. K1-K16, 2008.
- BRUNI, L. et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. **Summary Report** 27 July 2017. 2017.

- BRUNI, L. et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789-1799, 2010.
- BUTTMANN-SCHWEIGER, N. et al. Incidence patterns and temporal trends of invasive nonmelanotic vulvar tumors in Germany 1999-2011. A population-based cancer registry analysis. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128073, 2015.
- BURD, Eileen M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.
- BZHALAVA, D. Human papillomavirus reference clones. **International Human Papillomavirus Reference Center**. Available at: URL: <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>, consulté en septembre, 2014.
- CASTLE, P. E. et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 10, n. 10, p. 1021-1027, 2001.
- CASTRILLI, G. et al. Interleukin 1 α and interleukin 6 promote the in vitro growth of both normal and neoplastic human cervical epithelial cells. **British journal of cancer**, v. 75, n. 6, p. 855-859, 1997.
- CARTER, J. J. et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 6, p. 1911-1919, 2000.
- CHANG, Y. E.; LAIMINS, L. A. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. **Journal of virology**, v. 74, n. 9, p. 4174-4182, 2000.
- CHATURVEDI, A. K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 32, p. 4294, 2011.
- COLEMAN, N. et al. Immunological events in regressing genital warts. **American journal of clinical pathology**, v. 102, n. 6, p. 768-774, 1994.
- COLPANI, V. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 15, n. 2, p. e0229154, 2020.
- COX, A. J. T.; PALEFSKY, J. M. **Vacinação contra papilomavírus humano**. p. 1-34, 2021.
- CROTTY, Shane. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1132-1148, 2019.

- DAS, B. C. et al. Human papillomavirus and cervical cancer in Indian women. *Lancet* (British edition), v. 2, n. 8674, 1989.
- DE JONG, A. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4⁺ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5449-5455, 2004.
- DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 16, p. 3450-3461, 2013.
- DOMINGUEZ-VILLAR, Margarita; HAFLER, David A. Regulatory T cells in autoimmune disease. **Nature immunology**, v. 19, n. 7, p. 665-673, 2018.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of clinical virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.
- DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55-F70, 2012.
- DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 991-998, 2002.
- FAN, Yibing; SHEN, Zongji. The clinical value of HPV E6/E7 and STAT3 mRNA detection in cervical cancer screening. **Pathology-Research and Practice**, v. 214, n. 5, p. 767-775, 2018.
- FANG, Difeng; ZHU, Jinfang. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 7, p. 1861-1876, 2017.
- FRANCESCHI, S. et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **International journal of cancer**, v. 119, n. 11, p. 2677-2684, 2006.
- GUAN, P. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. **International journal of cancer**, v. 131, n. 10, p. 2349-2359, 2012.
- HANDLER, M. Z. et al. Human papillomavirus vaccine trials and tribulations: clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 5, p. 743-756, 2015.
- HANG, D. et al. Independent prognostic role of human papillomavirus genotype in cervical cancer. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2017.

- HO, G. Y. F et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 423-428, 1998.
- HOLDSWORTH, S. R.; GAN, P.-Y. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, v. 10, n. 12, p. 2243–2254, 7 dez. 2015.
- HONG, J. H. et al. Association between serum cytokine profiles and clearance or persistence of high-risk human papillomavirus infection: a prospective study. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 20, n. 6, 2010.
- HONG, Shiyuan; LAIMINS, Laimonis A. The JAK-STAT transcriptional regulator, STAT-5, activates the ATM DNA damage pathway to induce HPV 31 genome amplification upon epithelial differentiation. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 4, p. e1003295, 2013.
- IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS et al. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **A Review of Human Carcinogens**. Vol 100. Part B: Biological Agents. 2011.
- INSINGA, R. P. et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 20, n. 2, p. 287-296, 2011.
- IWATA, T. et al. Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International journal of clinical oncology**, v. 20, n. 1, p. 126-133, 2015.
- JANEWAY J. R, Charles A. et al. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. In: *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 2007. p. 824-824.
- JEE, Babban et al. Immunology of HPV-mediated cervical cancer: current understanding. **International Reviews of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 359-378, 2021.
- JIT, M. et al. Estimating progression rates for human papillomavirus infection from epidemiological data. *Medical Decision Making*, v. 30, n. 1, p. 84-98, 2010.
- KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current cancer drug targets**, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.
- KEMP, T. J. et al. Elevated systemic levels of inflammatory cytokines in older women with persistent cervical human papillomavirus infection. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 19, n. 8, p. 1954-1959, 2010.
- KOSHIOL, J.; KOVACIC, M. B. Cytokines and markers of immune response to HPV infection. 2013.

- KOSHIOL, J. et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **American journal of epidemiology**, v. 168, n. 2, p. 123-137, 2008.
- KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 211-222, 2004.
- LIAW, K.; -L. et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 11, p. 954-960, 1999.
- LONDESBOROUGH, P. et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **International Journal of Cancer**, v. 69, n. 5, p. 364-368, 1996.
- LORINCZ, A. T. et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstetrics and gynecology**, v. 79, n. 3, p. 328-337, 1992.
- LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **International journal of cancer**, v. 128, n. 4, p. 927-935, 2011.
- LIAO, L. et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes among women with high-grade squamous intraepithelial lesion and invasive cervical cancer in Ganzhou, China. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 33, n. 3, p. e22708, 2019.
- MAYRAND, M. -H. et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 16, p. 1579-1588, 2007.
- MBULAITEYE, S. M. et al. Plasma cytokine levels and human papillomavirus infection at the cervix in rural Nigerian women. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 146-151, 2013.
- MIDDLETON, K. et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10186, 2003.
- MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.
- NEES, M. et al. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. **Journal of virology**, v. 75, n. 9, p. 4283-4296, 2001.

- NICOL, A. F.; FERNANDES, A. T. G.; BONECINI-ALMEIDA, M. G. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection-review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2005.
- PALEFSKY, J. M.; HIRSCH, M. S.; BLOOM, A. Human papillomavirus infections: Epidemiology and disease associations. **Waltham: UpToDate**, 2018.
- POLJAK, M. et al. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F100-F106, 2012.
- REID, R. et al. Noncondylomatous cervical wart virus infection. **Obstetrics and Gynecology**, v. 55, n. 4, p. 476-483, 1980.
- REMMINK, A. J. et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. **International Journal of Cancer**, v. 61, n. 3, p. 306-311, 1995.
- RODRIGUEZ, A. C. et al. Burk 582 R, Proyecto Epidemiológico Guanacaste G. Rapid clearance of human papillomavirus and 583 implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*, v. 100, p. 513-517. 2008.
- RODRÍGUEZ, A. C. et al. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 5, p. 315-324, 2010.
- ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 85, n. 1, p. 9-18, 2000.
- RONCO, G. et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. **The lancet**, v. 383, n. 9916, p. 524-532, 2014.
- RONCO, L. V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & development**, v. 12, n. 13, p. 2061-2072, 1998.
- SALES, K. J.; KATZ, A. A. Inflammatory pathways in cervical cancer - the UCT contribution. **S Afr Med J. África do Sul**, v. 102, n. 06, p. 493-496, Mar. 2012.
- SILLMAN, F. H.; SENTOVICH, S.; SHAFFER, D. Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. **Annals of transplantation**, v. 2, n. 4, p. 59-66, 1997.
- SCHLECHT, N. F. et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **Jama**, v. 286, n. 24, p. 3106-3114, 2001.

- SCHMITT, E.; KLEIN, M.; BOPP, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. **Trends in immunology**, v. 35, n. 2, p. 61-68, 2014.
- SCHMITT, M. et al. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 249–256, 2010.
- SCOTT, M. E. et al. Cervical cytokines and clearance of incident human papillomavirus infection: Hawaii HPV cohort study. **International journal of cancer**, v. 133, n. 5, p. 1187-1196, 2013.
- SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007.
- SCHMITT, M. et al. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 249–256, 2010.
- SHUKLA, Shirish et al. Functional regulatory role of STAT3 in HPV16-mediated cervical carcinogenesis. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67849, 2013.
- SMOLA, S. Immunopathogenesis of HPV-associated cancers and prospects for immunotherapy. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 254, 2017.
- SOUTHERN, S. A.; HERRINGTON, C. S. Molecular events in uterine cervical cancer. **Sexually transmitted infections**, v. 74, n. 2, p. 101-109, 1998.
- STANLEY, M. A. Replication of human papillomaviruses in cell culture. **Antiviral research**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1994.
- STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. S16, 2006.
- STANLEY, M. A. et al. Immune responses to human papilloma viruses. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n. 3, p. 266, 2009.
- STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.
- STERLING, J. C.; SKEPPER, Jeremy N.; STANLEY, Margaret A. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. **Journal of investigative dermatology**, v. 100, n. 2, p. 154-158, 1993
- SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. **Cancer research**, v. 67, n. 8, p. 3976-3985, 2007.

PARADKAR, P. H. et al. Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 9, p. 3851-3864, 2014.

TOZETTI, I. A. et al. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 309-310, 2006.

VALDESPINO, V. et al. HPV16-specific cytotoxic T lymphocyte responses are detected in all HPV16-positive cervical cancer patients. **Gynecologic oncology**, v. 96, n. 1, p. 92-102, 2005

VAN POELGEEST, M. I. E. et al. Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. **International journal of cancer**, v. 118, n. 3, p. 675-683, 2006.

VIEIRA, P. L. et al. IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 5986 LP – 5993, 15 maio 2004.

VISCIDI, R. P. et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 13, n. 2, p. 324-327, 2004.

WANG, Z. et al. Prevalence and distribution of HPV genotypes in 1387 women with cervical intraepithelial neoplasia 2/3 in Shanxi Province, China. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 16, p. 2802, 2018.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of pathology**, v. 189, n. 1, p. 12-19, 1999.

WEI, L. H. et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. **Oncogene**, v. 22, n. 10, p. 1517-1527, 2003.

WELTERS, M. J. P. et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. **Cancer research**, v. 63, n. 3, p. 636-641, 2003.

WILSON, N. J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 950-957, 2007.

WILLIAMS, R. et al. Preclinical models of HPV+ and HPV– HNSCC in mice: an immune clearance of HPV+ HNSCC. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, v. 31, n. 7, p. 911-918, 2009.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

ZHONG, T. Y. et al. Prevalence of human papillomavirus infection among 71,435 women in Jiangxi Province, China. *Journal of infection and public health*, v. 10, n. 6, p. 783-788, 2017.

APÊNDICE A

Questionário Socio-epidemiológico

Iniciais da paciente _____ Data ____/____/____.

- 1) Idade: _____
- 2) Escolaridade
☐ Ensino fundamental ☐ Ensino Médio ☐ Ensino Superior
- 3) Estado civil
☐ Solteira ☐ Casada ☐ Divorciada ☐ Viúva
- 4) Idade da primeira relação sexual: _____
- 5) Número aproximado de parceiros sexuais nos últimos dois anos: _____
- 6) Tem filhos
☐ Sim ☐ Não Quantos se possuir ☐
- 7) Faz uso de preservativo
☐ Sim ☐ Não
- 8) Faz uso de alguma terapia hormonal (anticoncepcional, DIU entre outros)
☐ Sim ☐ Não Qual _____
- 9) Relata alguma DST
☐ Sim ☐ Não Qual _____
- 10) Faz utilização do tabaco
☐ Sim ☐ Não
- 11) Faz uso de alguma bebida alcoólica (cerveja, destilados em geral)
☐ Sim ☐ Não
- 12) Faz uso de algum medicamento imunossupressor?
☐ Sim ☐ Não Qual _____
- 13) Já realizou o exame preventivo para o câncer de colo de útero?
☐ Sim ☐ Não
- 14) Caso já tenha realizado, qual é a frequência do mesmo?
☐ menos que 1 X ao ano ☐ 1X ao ano ☐ mais que 1X ao ano
- 15) Na última vez em que fez o exame preventivo foi encontrado alguma alteração? Onde fez o exame?
☐ Sim ☐ Não Onde _____
- 16) Relata o uso de algum medicamento de uso contínuo (hipertensão, diabetes entre outros)
☐ Sim ☐ Não Qual _____
- 17) Relata o uso de algum outro medicamento? (antibiótico, antifúngico, etc.)
☐ Sim ☐ Não Qual _____
- 18) Já precisou fazer algum procedimento ginecológico cirúrgico? (Por exemplo cauterização)
☐ Sim ☐ Não

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação fenotípica de células linfoides da imunidade inata e citocinas em pacientes positivas para DNA de Papilomavírus humano com lesão intraepitelial escamosa de baixo, alto grau e ou carcinoma invasivo

Pesquisador: Inês Aparecida Tozetti

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87377118.3.0000.0021

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.685.400

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo descritivo, observacional de corte transversal, onde serão convidadas cerca de 50 mulheres atendidas no Hospital de Câncer de Barretos (unidade de Campo Grande – MS), positivas para DNA de HPV e que já foram submetidas à citologia oncológica, colposcopia, análise histopatológica e cobas® HPV teste. Vinte pacientes com resultado histopatológico de Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), vinte participantes com resultado de Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e dez com resultado de carcinoma invasivo, no período de julho de 2018 a novembro de 2019.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Detectar ILCs e citocinas em pacientes positivas para DNA de Papilomavírus humano, com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, lesão intraepitelial escamosa de alto grau e ou carcinoma invasivo.

Objetivos específicos: - Identificar a expressão CD127, CD117 e CD294 em células ILCs presente no sangue periférico;- Mensurar citocinas IFN, IL4, IL5, IL13, IL17 e IL22 no sangue periférico;- Detectar a expressão das citocinas IL-6 e TNF, bem como, do marcador P16, em células presentes em cortes histológicos de cérvix uterina;- Analisar a frequência de intensidade de expressão dos marcadores identificados e correlacionar com os achados histopatológicos em cérvix uterina e a

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110

UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 2.685.400

detecção de HR-HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme o pesquisador:

Riscos: As informações citadas no questionário sócio-epidemiológico serão estritamente confidenciais e não haverá identificação nominal, sendo apenas utilizadas como resultado geral, ou seja, contando todas as participantes do estudo e não individualmente. A coleta de sangue será executada totalmente livre de contaminantes, por Bioquímicos experientes neste procedimento e participantes do projeto. Será realizada a punção venosa do antebraço, por procedimento padrão em tubo de coleta a vácuo e com material estéril e descartável. Normalmente não há risco algum envolvendo este procedimento. Os possíveis desconfortos, se ocorrerem, são relacionados à retirada do sangue, como extravasamento de sangue e/ou dor no local da picada da agulha. O participante poderá notar uma mancha arroxeadada no local da punção que regride após 3 a 5 dias.

Benefícios: Caso seja do interesse da participante poderá receber os resultados da análise, no entanto, é possível que este estudo não traga benefícios diretos à participante. Mas ao final desta pesquisa, as informações que ela gerar, poderá trazer benefícios a outras pessoas envolvendo um melhor diagnóstico e acompanhamento das futuras pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com relevância científica e social, abordando questão sensível à realidade da população feminina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentação dos seguintes documentos obrigatórios:

- 1) declaração de infra-estrutura e autorização para uso do laboratório;
- 2) autorização do Hospital do Câncer;
- 3) declaração do pesquisador (membro da equipe) do hospital do Câncer;
- 4) questionário para coleta de dados;
- 5) cronograma e orçamento;
- 6) TCLE.

Recomendações:

Corrigir contato do CEP no TCLE. O correto é telefone 3345-7187 e e-mail cepconep.propp@ufms.

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549

CEP: 79.070-110

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 2.685.400

br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise e deliberação, o Colegiado manifesta-se pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1107936.pdf	10/04/2018 14:53:44		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_infra.pdf	10/04/2018 14:51:13	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Outros	Autorizacao_HCB.pdf	10/04/2018 14:50:08	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	10/04/2018 14:49:12	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Outros	Coletanea_docs_coparticipante.pdf	09/04/2018 14:58:42	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	09/04/2018 14:55:14	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Outros	Questionario.doc	09/04/2018 14:54:43	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	09/04/2018 09:43:22	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Orçamento	Orcamento.doc	09/04/2018 09:42:36	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	09/04/2018 09:41:41	Marco Antonio Moreira Puga	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 2.685.400

CAMPO GRANDE, 30 de Maio de 2018

Assinado por:
Edilson José Zafalon
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110

UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br

