

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POLIMORFISMO NO GENE DA INTERLEUCINA 10
(IL10) EM MULHERES INFECTADAS PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

GABRIELA TONINI

Orientador: Prof. Dr. MARY CLARISSE BOZZETTI

Porto Alegre, Dezembro de 2009

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POLIMORFISMO NO GENE DA INTERLEUCINA 10
(IL10) EM MULHERES INFECTADAS PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

GABRIELA TONINI

Orientador: Profa. Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2009

BANCA EXAMINADORA

DEFESA PRELIMINAR – 26/11/2009

1. Cristine Nascente Igansi - Doutora em Epidemiologia pela UFRGS. Programa de Treinamento em Epidemiologia aplicado aos Serviços do Sistema Único de Saúde (EPISUS), Serviço de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde.
2. Jair Ferreira – Professor da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós Graduação em Epidemiologia da UFRGS.
3. Daniela Riva Knauth – Professora da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós Graduação em Epidemiologia da UFRGS.

DEFESA PÚBLICA – 10/12/2009

1. Cristine Nascente Igansi - Doutora em Epidemiologia pela UFRGS. Programa de Treinamento em Epidemiologia aplicado aos Serviços do Sistema Único de Saúde (EPISUS), Serviço de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde.
2. Jair Ferreira – Professor da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós Graduação em Epidemiologia da UFRGS.
3. Daniela Riva Knauth – Professora da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós Graduação em Epidemiologia da UFRGS.

Dedico esta dissertação àquelas pessoas que ao longo da minha vida me educaram e me incentivaram: a minha família, que são torcedores e incentivadores desde sempre, incansavelmente orgulhosos de mim.

E a Deus, pela Vida e por todas as oportunidades e conquistas.

AGRADECIMENTOS

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

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

À Querida Professora Doutora Mary Clarisse Bozzetti por ter acreditado neste trabalho, pelo indispensável apoio e ensinamento, pela orientação nesta caminhada, pela dedicação, carinho e amizade.

À querida amiga Cristine Nascente Igansi, pela amizade, compreensão e apoio nos momentos de frustração, alegria e companheirismo.

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

Ao CDCT/FEPPS, em especial à Doutora Maria Lúcia Rossetti, por ter me acolhido no Laboratório.

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. APRESENTAÇÃO.....	15
2. INTRODUÇÃO.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	20
3.2. EPIDEMIOLOGIA.....	20
3.3. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV.....	22
3.3.1. Formas de Transmissão do vírus HPV.....	25
3.3.2. Diagnóstico Clínico e Laboratorial.....	26
3.3.3. Prevenção e Tratamento.....	27
3.3.4. Vacina.....	29
3.4. Co-Fatores Virais na Oncogênese Cervical.....	31
3.4.1. Sistema Imunológico e HPV.....	32
3.4.2. Interleucina-10 (IL10).....	33
3.4.3. Proteína e Estrutura Gênica.....	33
3.4.4. Função Biológica da citocina IL10.....	34
3.4.5. Polimorfismo e níveis de expressão do gene da IL10.....	35
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo Geral.....	38
4.2. Objetivos Específicos.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

6. ARTIGO.....	50
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
8. ANEXOS.....	78
Anexo I - Projeto de Pesquisa.....	79
Anexo II - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	114
Anexo III - Termo de Consentimento Informado.....	115
Anexo IV - Ficha de Coleta de Dados.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
AGUS	Atipia Glandular de Significado Indeterminado
ARMS-PCR	<i>Amplification Refractory Mutation System</i> (Sistema de Amplificação Refratária de Mutações)
ASCUS	Atipia Escamosa de Significado Indeterminado
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cp	Citopatológico
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
DSI	Doença Sexualmente Infecciosa
E1-E7	Regiões Precoces do Genoma Viral
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GHC	Grupo Hospitalar Conceição
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HSIL	<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)
HLA	<i>Human Leucocitary Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HPV	Papilomavírus Humano
IFN-γ	Interferon-Gama
IL2-IL-10-IL13	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1/L2	Proteínas Tardias que compõem o Capsídeo Viral
LACEN	Laboratório Central do Estado
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região regulatória)
LSIL	<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)
M	Molar
mAmp	Miliampere
mg	miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Maior de Histocompatibilidade)

min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
NIC I-II-III	Neoplasia Intraepitelial Cervical (Graus I, II e III)
OR	<i>ODDS RATIO</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de Leitura Aberta)
p53	Gene constitutivo do genoma humano protetor à indução do câncer
pb	pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pmol	picomol
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RC	Razão de Chances
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Intraepitelial Escamosa)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TEB	Tris borato-EDTA
Th1-Th2	<i>T-helper cells</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral-alfa)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta
VLP	<i>Virus like particles</i>

RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é um fator associado com o desenvolvimento do câncer de colo de útero. A frequência de mulheres com infecção genital pelo HPV é consideravelmente mais elevada que o número de mulheres com câncer cervical. Este fato torna relevante a busca de um entendimento maior deste processo, como por exemplo, a predisposição imunológica do hospedeiro.

Este estudo tem como objetivo avaliar a frequência do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL10 e sua associação com a infecção genital pelo HPV.

Trata-se de um estudo de casos e controles, sendo os casos, 84 mulheres com infecção genital por HPV e resultado anatomopatológico alterado. Os controles corresponderam a 211 mulheres HPV-DNA negativas e com exame citopatológico sem alterações. Ambos, casos e controles, são oriundos da população participante de um estudo coorte conduzido previamente. A técnica de amplificação refratária de mutações (ARMS-PCR) foi utilizada para a identificação do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL10. O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências genóticas observadas estão de acordo com as esperadas na população em estudo. O método de Regressão logística múltipla foi utilizado para verificar a associação das variáveis estudadas com o desfecho (infecção genital pelo HPV).

A frequência genotípica observada em mulheres com a infecção foi de 12,0% (AA), 29,0% (AG) e 59,0% (GG). No grupo controle, foi de 22,8% (AA), 48,8% (AG) e 28,4% (GG). Houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p < 0,001$). Entre as mulheres com infecção, as lesões de baixo grau (LSIL), predominantes nessa amostra (73,8%), a

freqüência do genótipo GG foi 62,9 %. Nos casos com lesões de alto grau (HSIL) (26,2%), o genótipo AG foi observado em 36,4%. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos em lesões de alto e baixo grau ($p=0,59$). Além disso, foi observada diferença de significância limítrofe entre a distribuição da freqüência dos genótipos comparando mulheres com HPV oncogênicos em relação a mulheres HPV negativas ($p=0,05$). Observou-se que o grupo etário (RC=5,00; IC95%:2,33 – 10,75), e o genótipo GG (RC=4,41; IC95%:1,87 – 10,42) apresentaram-se independentemente associados ao desfecho (infecção genital pelo HPV). As variáveis, escolaridade (RC=3,28; 1,00 – 11,18) e co-infecção por HIV (RC=10,64; 1,00-111,11) apresentaram significância limítrofe.

Com estes resultados, é possível sugerir que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL10 (GG) parece estar associada à infecção genital pelo HPV, mostrando a importância da resposta imunológica do hospedeiro no processo de infecção e na progressão das lesões cervicais pelo HPV.

Palavras-Chave: Papilomavírus Humano, polimorfismo, IL-10, câncer cervical.

ABSTRAT

Infection with Human Papillomavirus (HPV) is a necessary cause of cervical cancer. The frequency of women infected by HPV is much more elevated than the number of women who develop cervical cancer. Regarding this observation, the search for a better understanding of this process, such as the host immune predisposition, may contribute to its enlightenment.

This study aims to evaluate the frequency of the polymorphism in the promoter region (-1082) of the IL10 gene and its association with HPV genital infection.

This is a case-control study. A total of 84 cases and 211 controls were enrolled. Cases corresponded to women with HPV genital infection and abnormal histopathological results, and controls were HPV-DNA negatives and with normal cytologic results. The technique of amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) was used to identify the polymorphism present at the promoter region (-1082) of the IL10 gen. The Hardy-Weinberg equilibrium was used to verify whether genotypic frequencies were in agreement with the ones expected in the studied population. Multiple logistic regression was used to verify the association between the study factors and the outcome (genital infection by HPV).

The genotypic frequency distribution among cases and controls was 12.0% (AA), 29.0% (AG), 59.0% (GG), and 22.0% (AA), 49.0% (AG), 29.0% (GG), respectively. There was a significant difference between the groups ($p < 0.001$). Among the HPV infected women, the low grade lesions (LSIL), predominant in this sample (73.8%) the GG genotype frequency was (62.9%) In those with high grade lesions (HSIL), the AG genotype was observed in (36.4%). No significant association was observed between the genotypes when comparing low and high grade lesions (26.2%). In addition, a borderline significance was observed

between the genotype frequency when comparing women infected by a high risk HPV with those HPV-DNA negatives. Age group (OR=5.00; 95%CI: 2.33 – 10.75), and the GG genotype (4.41; 1.87 – 10.42) were independently associated to the outcome (HPV genital infection). The variables schooling (3.28; 1.00 – 11.18) and HIV co-infection (10.64; 1.00-11.11) presented a borderline significance.

The results suggest that a genetic predisposition to produce high levels of IL10 (GG) may be associated to the HPV genital infection, and they indicate the relevance of the host immune response in the development and progression of HPV-related cervical lesions.

Key words: Human Papillomavirus, polymorphism, IL-10, cervical cancer.

1. APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na dissertação de mestrado intitulada “Polimorfismo no Gene da Interleucina 10 (IL10) em mulheres infectadas pelo Papilomavírus Humano (HPV)”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 10 de dezembro de 2009. O trabalho é apresentado em três partes, na ordem que segue:

1. Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos
2. Artigo(s)
3. Conclusões e Considerações Finais.

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

2. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de DNA da família *Papillomaviridae* que foi descrito pela primeira vez em 1954. É o principal agente etiológico de lesões urogenitais tais como verrugas genitais, lesões planas e alterações estruturais no colo do útero, vagina e vulva, sendo considerado o principal fator envolvido no desenvolvimento da neoplasia cervical ou câncer do colo uterino (Bibbo & Silva Filho, 1998; Hoory, et al, 2008).

A infecção pelo HPV é a doença sexualmente Infecciosa (DSI) mais freqüente, atingindo cerca de 10,0 a 12,0% das mulheres com vida sexualmente ativa (Carvalho, 2000; Collins, *et al*, 2002). Em relação às mulheres jovens, entre 20 e 29 anos, sua prevalência é ainda maior, de 20,0 a 40,0% (Ferreira Santos, 2003).

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

O câncer cervical é um problema de saúde pública muito importante em países em desenvolvimento, ocorrendo em torno de 80,0% dos casos diagnosticados. Além disso, são registrados mais de 300.000 casos incidentes por ano em todo o mundo (Hernandez-Girón *et al*, 2005; Hoory *et al*, 2008; Sinal & Woods, 2005).

Este câncer é um dos tumores malignos mais frequentes na população feminina brasileira, superado apenas pelos cânceres de mama e de pele não-melanoma. Dados absolutos sobre incidência e mortalidade por câncer cervical do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimaram para 2008, 18.680 casos novos, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008).

Em todo o mundo, estima-se que, a cada ano, ocorram 510.000 novos casos de câncer cervical e 288.000 mortes; destes 70,0% são causados pelos tipos oncogênicos de HPV 16 e 18. Além do câncer cervical, o HPV pode causar outros tipos de câncer (vagina, vulva, pênis e ânus). Alguns outros tipos que apresentam baixo potencial oncogênico, como o 6 e 11, são responsáveis por mais de 90,0% das verrugas genitais que acometem até 10,0% dos homens e mulheres com vida sexual ativa (Saslow *et al*, 2007).

A implicação do HPV em praticamente todos os cânceres cervicais nos leva à investigação de outros fatores associados, pois o número de infecções é extremamente maior do que o número de casos de câncer cervical. Certamente, outros fatores associados também contribuem para a formação e progressão das lesões pré-malignas e do câncer cervical, uma vez que nem todas as mulheres infectadas pelo HPV de alto risco fatalmente desenvolverão câncer (Odunsi *et al*, 1995; Pinto *et al*, 2002).

A exposição ao fumo, mesmo sendo passiva, tem sido sugerida como fator relacionado a um aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical (Brinton *et al*, 1986; Pinto *et al*, 2002). A presença de substâncias carcinogênicas provenientes no cigarro na mucosa cervical tem sido descrita como possível explicação para essa associação epidemiológica.

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

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

Na genética médica, os marcadores têm uma ampla utilidade na avaliação da predisposição para diversos distúrbios, entre eles, o câncer cervical. Os polimorfismos têm como principal valor o seu uso como “marcadores” genéticos para distinguir diferentes formas hereditárias de um gene (Nussbaum, Mcinnes, Willard, 2002).

Nesse estudo será avaliada a influência genética do polimorfismo (-1082) localizado no gene da IL10 no desenvolvimento de lesões cervicais relacionadas ao HPV, visto que, esta citocina é uma molécula importante na resposta imune contra infecções virais. As citocinas são geneticamente determinadas, podem apresentar predomínio para padrão associado com a eliminação do HPV, ou associação com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais (Araújo Souza & Villa, 2003; Kirkpatrick *et al*, 2004; Farzaneh *et al*, 2006; Fernandes *et al*, 2008).

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

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

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

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

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

Os tipos virais mucosos são classificados em baixo e alto risco, conforme a sua associação com o câncer cervical (Scheurer *et al*, 2005; Dunne & Markowitz, 2006; Hoory *et al*, 2008). O HPV de baixo risco está relacionado, na maioria dos casos, com tumores benignos, lesões cutâneas leves e lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LSIL),

também chamadas de neoplasias intraepiteliais cervicais de grau I (NIC I) e *condiloma acuminatum*. São representados, principalmente, pelos HPV's 6, 11, mas outros tipos como HPV 26, 42, 43, 44, 54, 70 e 73 também são descritos na literatura como sendo de baixo risco. (Okada *et al*, 2000; Muñoz, 2000; Scheurer *et al*, 2005; Dunne & Markowitz, 2006).

Os tipos de alto risco estão relacionados com neoplasia intraepitelial cervical de grau II e III (NIC II e III) que podem progredir para carcinomas de colo uterino (Campion *et al*, 1996; Sinal & Woods, 2005; Scheurer *et al*, 2005; Schiffman *et al*, 2007). Os principais tipos são representados pelo HPV 16 e 18, seguidos pelos HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (Scheurer *et al*, 2005, Schiffman *et al*, 2007, Hoory *et al*, 2008).

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

3.2. EPIDEMIOLOGIA

Em todo o mundo, estima-se que, a cada ano, ocorram 510.000 novos casos de câncer cervical e 288.000 mortes; destes 70,0% são causados pelos tipos oncogênicos de HPV 16 e 18. Além do câncer cervical, o HPV pode causar outros tipos de câncer (vagina, vulva, pênis e ânus). Alguns outros tipos que apresentam baixo potencial oncogênico, como o 6 e 11, são

responsáveis por mais de 90,0% das verrugas genitais que acometem até 10,0% dos homens e mulheres com vida sexual ativa (Saslow *et al*, 2007).

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

Os tipos virais 16 e 18 estão presentes em cerca de 93,0% dos tumores malignos cervicais investigados em diferentes locais do mundo, demonstrando o importante papel desses tipos oncogênicos no desenvolvimento de neoplasias cervicais (Lorenzato *et al*, 2002; Scheurer *et al*, 2005; Dunne & Markowitz, 2006; Schiffman *et al*, 2007).

O HPV 16 é um dos tipos de alto risco mais freqüente entre as mulheres, e também o mais comum entre os casos de câncer cervical, com taxas de 23,4% nas mulheres, sendo ainda maior em jovens com idade entre 16-20 anos (Ho *et al*, 1998; Liaw *et al*, 1999; Rabelo Santos *et al*, 2003).

Em um estudo realizado pela Universidade de Washington, o HPV 18 apresentou uma prevalência de 7,3% em mulheres com idade em torno dos 16 anos e 7,2% em mulheres com idade ao redor de 25 anos (Baseman & Koutsk, 2005).

A prevalência dos tipos de HPV, em especial dos mais associados ao câncer do colo uterino apresenta variações geográficas. De acordo com o International Biological Study on Cervical Cancer, que incluiu 22 países em cinco continentes, o HPV 16 foi o mais prevalente em 20 países estudados, com exceção da Indonésia e Argélia, onde o tipo 18 foi o mais

encontrado (Yamada, *et al*, 1997). As maiores prevalências de HPV oncogênicos, são observadas na África e América Latina. Na América Central e América do Sul, os cinco tipos de HPV mais prevalentes são o HPV 16, 18, 45, 31 e 33 (Bosch, *et al*, 1995).

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

No Brasil, o HPV 16 é o mais prevalente em todas as regiões, todavia, há variações em relação aos outros tipos. O tipo 18 é o segundo mais prevalente nas regiões Norte, Sudeste e Sul, enquanto que o 31 e 33 são o segundo mais prevalente na região Nordeste e Central (Rabelo, *et al*, 2003).

3.3. BIOLOGIA MOLECULAR DO HPV

O genoma viral do HPV é constituído por uma molécula de DNA fita dupla, circular de 8.000 pares de bases (pb). São identificados por três regiões séricas: região precoce (*early*, E) que possuem oito regiões conhecidas como ORFS (*Open Reading Frames*) um complexo de proteínas funcionais codificadas pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e que estão envolvidas no controle da replicação e transcrição viral durante o estado epissomal (Münger *et al*, 2004) (Figura 1).

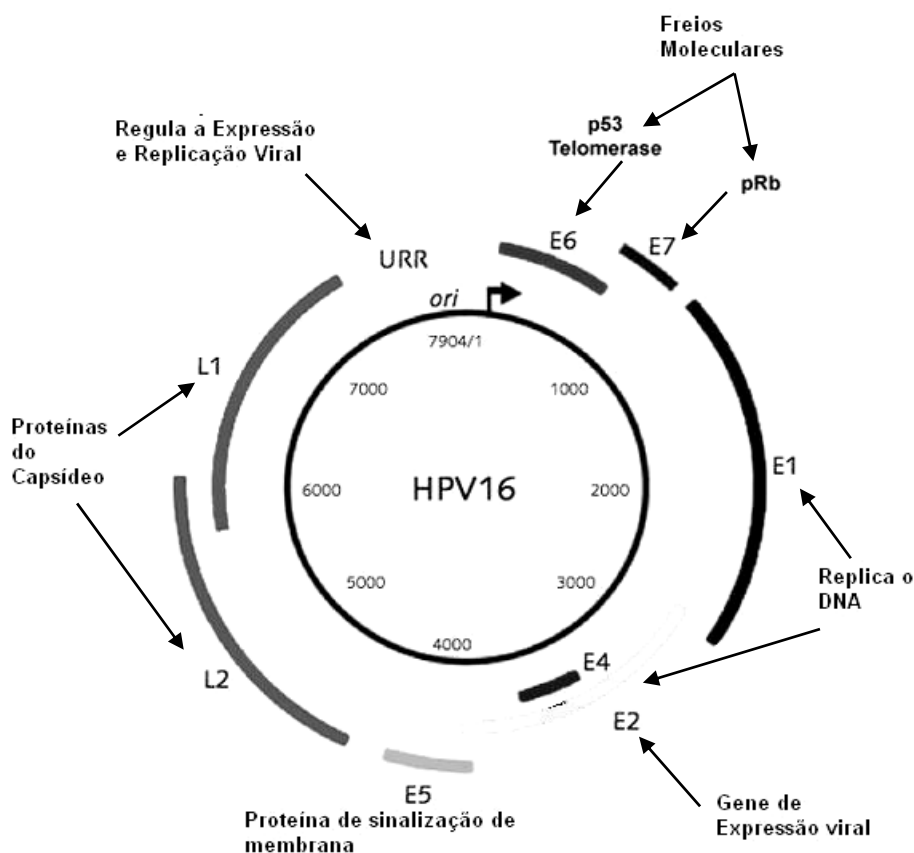


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR) (Fonte: www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html)

As proteínas dos genes E1 e E2 desempenham importantes funções na replicação viral; a proteína E4 age desestabilizando os filamentos intermediários das camadas superiores das células do epitélio escamoso e da pele, facilitando assim, a liberação do vírus; já a proteína E5 modula os processos de divisão celular a partir da membrana celular (Münger *et al*, 2004). As

proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 exercem funções na formação de tumores (Janicek *et al*, 2001; Münger *et al*, 2004).

A região de expressão tardia (*late*, L) que compõem o capsídeo viral são codificadas por L1 e L2 (Münger *et al*, 2004). A região reguladora, denominada de *upstream regulatory region* (URL), situa-se entre L1 e E6 e detêm a origem da replicação, representando cerca de 10,0 % do genoma viral total (Chan *et al*, 1995).

A característica mais específica do HPV de baixo risco é que na maioria dos tumores benignos o genoma viral é preservado como DNA episomal (que não se integra ao genoma do hospedeiro) (Thorland *et al*, 2003; Ziegert *et al*, 2003).

A integração ocorre freqüentemente próxima a locais frágeis do genoma humano, porém, não existem evidências de locais específicos para essa integração (Thorland *et al*, 2003; Ziegert *et al*, 2003).

Em lesões malignas associadas aos HPV 16 e 18, contudo, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros. Para integrar-se ao DNA nuclear, é necessário que haja uma quebra no genoma viral. Esta separação não ocorre de forma aleatória, pois a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus, resultando na perda de função desses dois genes, acompanhada pela integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, que passa a expressar os oncogenes virais E6 e E7 (Kaufman *et al*, 2000; Burd, 2003).

As proteínas codificadas pelo genoma do HPV, principalmente as produzidas pela expressão dos genes E6 e E7 estão relacionadas com a carcinogênese mediada pelo HPV, pois são capazes de inativar as proteínas p53 e pRb, responsáveis pelo controle do crescimento celular. Em especial, foi demonstrado que a proteína E6 interage com a proteína p53 e a proteína E7 com a proteína pRb, causando desequilíbrio no ciclo celular (Kelley *et al*, 2005).

Essas duas proteínas são produtos genes supressores de tumor que regulam o crescimento da célula, e previnem os acontecimentos que levam a transformação maligna das células, interrompendo sua divisão e proliferação (Beutner & Tying, 1997; Pinto *et al*, 2002).

A eliminação desse controle de ciclo celular do DNA celular (p53 e pRb) pode provocar um acúmulo de mutações nas células que expressam tais oncoproteínas, resultando em um fenótipo alterado, além disso, a integração na célula hospedeira pode gerar mutações que induzem a formação tumoral. Acredita-se que o potencial oncogênico desses vírus seja, em parte, devido as suas integrações sendo processos moleculares relacionados ao surgimento do câncer pelo HPV, especialmente se comparado aos tipos de baixo risco que não integram o seu genoma ao do hospedeiro (Rapp & Chen, 1998).

3.3.1. Formas de Transmissão do vírus HPV

A principal via de transmissão do HPV é através do contato sexual. A transmissão pode ocorrer após uma única relação sexual com um parceiro infectado. Os mecanismos de infecção viral pelo ato sexual não apresentam diferenças entre os tipos de HPV e, também ainda não estão completamente elucidados, apesar de ser considerada uma via de elevado poder de transmissibilidade (Burchell *et al*, 2006).

Gestantes infectadas pelo HPV podem transmitir o vírus para o feto durante a gestação ou no momento do parto. Material obtido da cavidade oral demonstrou que o HPV é positivo em crianças menores do que dois anos e adolescentes com 13 anos ou mais (Summersgill *et al*, 2001).

A prevalência da infecção pelo HPV na população masculina é significativa, entretanto, a maior parte dos homens infectados não apresenta sintomas clínicos. Quando presentes, as lesões provocadas pelo HPV podem apresentar diferentes aspectos e localizam-

se principalmente no pênis. Estima-se que mais de 70,0% dos parceiros de mulheres com infecção cervical por HPV e/ou neoplasia intraepitelial são portadores desse vírus (Nicolau *et al*, 2001).

3.3.2. Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico do HPV pode ser realizado através de exames citológico e histológico, bem como pela colposcopia. São exames que detectam com sensibilidade razoável (80,0%) a infecção pelo HPV, tornando-se possível evidenciar lesões ou neoplasias intraepiteliais ou carcinomas do trato genital (Shyu *et al*, 2001). Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico pode-se citar:

Inspeção com ácido acético a 5%

A avaliação do colo uterino com esta solução auxilia na identificação de lesões precursoras do câncer cervical, aumentando a sensibilidade da citologia cérvico-vaginal (Papanicolaou). Pode, ainda, ser de grande auxílio na triagem dos casos para a colposcopia e biópsia, mesmo em locais em que não haja condições adequadas para a realização da citologia (Galvane *et al*, 2002).

Exame Papanicolaou (citopatológico)

É o exame preventivo mais comum. Ele não detecta o vírus, mas sim as alterações que ele pode causar nas células. Indicado na rotina de rastreamento para o câncer cervical ou na presença, nos genitais, de lesão HPV induzida no sentido de diagnóstico de neoplasia intraepitelial ou câncer invasor associado (Ayre *et al*, 1949; Meisels *et al*, 1976).

Teste de hibridização molecular

É, sem dúvida, a técnica mais sensível de detecção da infecção pelo Papilomavírus Humano. O uso desta tecnologia no reconhecimento da presença do HPV oncogênico pode reduzir consideravelmente o número de citologias falso-negativas (Walboomers *et al*, 1995).

Captura híbrida

Detecta com alta sensibilidade e especificidade o DNA/HPV em amostra de escovado ou biópsia do trato genital inferior, grupo (de baixo ou alto risco) e a carga viral (Shyu *et al*, 2001).

Reação em cadeia de polimerase (PCR)

É um teste de alta sensibilidade e consiste em amplificação do alvo, ou seja, do DNA viral, e posterior hibridização. Tem sido utilizado principalmente em pesquisas, especialmente como um padrão ouro para comprovar ou não a existência do DNA do HPV. Estudos, utilizando este método, descrevem prevalências de 13,0% (Nonnenmacher *et al*, 2002) e 24,0% (Rosa *et al*, 2008) de DNA do HPV, estudando mulheres assintomáticas no sul do Brasil.

A sensibilidade e a capacidade de identificar o vírus pelos métodos de captura híbrida e de PCR são semelhantes (Riethmuller *et al*, 1999).

3.3.3. Prevenção e Tratamento

Medidas de prevenção geralmente permitem a intervenção em diferentes aspectos na história natural da infecção viral: (i) antes que a infecção ocorra; (ii) após instalada a infecção e antes da ocorrência da doença clínica e, (iii) após o desenvolvimento de lesões clínicas.

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

Programas educacionais que promovem o uso consciente do preservativo podem auxiliar na redução do risco de incidência de câncer cervical (Schiffman *et al*, 2005; Scheurer *et al*, 2005).

A contaminação só pode ser efetivamente evitada com abstinência sexual completa para todas as práticas sexuais, porque os preservativos não garantem proteção total e o HPV pode ser transmitido mesmo por atividades sexuais sem penetração. É relatado que os métodos atuais de prevenção, o uso de preservativos e os métodos de rastreamento, vêm diminuindo a incidência do câncer genital e que mais de 90% das lesões detectadas no colo uterino são removidas ao longo de dois anos (Nadal *et al*, 2008).

A prevenção secundária é importante para minimizar o desenvolvimento de lesões clínicas, mesmo que a infecção já esteja instalada. O rastreamento pelo método Papanicolaou (CP) e por testes moleculares (Reação em Cadeia da Polimerase e Captura Híbrida) objetivam a identificação de indivíduos assintomáticos que podem ser considerados potenciais reservatórios virais e contribuir para a disseminação (Goldie *et al*, 2005; Franco *et al*, 2006).

A prevenção terciária tem como objetivos: limitar a progressão da doença, evitar ou diminuir as conseqüências ou complicações da doença tais como, as insuficiências, incapacidades, seqüelas, sofrimento ou ansiedade. Também promove a adaptação do doente às conseqüências inevitáveis (situações incuráveis), e previne recorrências da doença, ou seja, controlá-la e estabilizá-la (Goldie *et al*, 2005; Franco *et al*, 2006).

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

Também são utilizados métodos antivirais e/ou imunomoduladores, como interferon- β e $-\gamma$, imiquimod, cidofovir, quimioterapia com bleomicina, 5-fluorouracil, podofilina, podofilotoxina (Fusté *et al*, 2008; Huh & Roden, 2008). Para evitar a re-infecção viral, recomendam-se métodos contraceptivos de barreira, como preservativos masculinos e femininos, sendo importante manter abstinência sexual durante o tratamento (Janicek *et al*, 2001).

3.3.4. Vacina

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

Nos países desenvolvidos, a implantação dos programas de rastreamento do câncer cervical com os testes de Papanicolaou e colposcopia reduziu em mais de 75,0% as taxas de incidência e a mortalidade por câncer cervical nos últimos 50 anos, pois a progressão das NIC para câncer invasivo, em geral, é lenta (média, 20 anos). Entretanto, nos países em desenvolvimento, existem diversas dificuldades técnicas, econômicas e operacionais para implantar os programas de prevenção do câncer de útero, que requerem alto investimento e repetição periódica dos testes; por esses motivos, o câncer cervical está entre as causas mais

frequêntes de morte em mulheres, tornando essencial a busca de novas estratégias na prevenção dessa grave doença (Saslow *et al*, 2007).

A tecnologia de recombinação genética permitiu o desenvolvimento de vacinas profiláticas para o vírus, formuladas a partir de proteínas do capsídeo viral (L1), que são altamente imunogênicas e capazes de se rearranjar espontaneamente, formando partículas semelhantes ao vírus, destituídas de seu DNA (virus like particles – VLP). Ensaios clínicos de fases 1, 2 e 3 sugerem que a injeção intramuscular das VLP dos HPV 6, 11, 16 e 18 é capaz de estimular resposta de anticorpos muitas vezes superior à encontrada após a infecção natural, e que o uso de vacinas formuladas com essas VLP mostrou-se seguro em animais e humanos (Ault, 2006).

Dessa forma, foram desenvolvidas duas vacinas profiláticas para o HPV: uma vacina bivalente (HPV16, 18), produzida pelo laboratório Glaxo Smith Kline (GSK) e uma vacina quadrivalente (HPV 6, 11, 16,18), produzida pelo laboratório Merck Sharp & Dohme (MSD) (Ault, 2006; Franco & Harper, 2005; Harper *et al*, 2004; Weaver, 2006).

A implementação das vacinas inclui educar o público geral sobre HPV, diminuir o estigma da infecção e ganhar confiabilidade para vacinar adolescentes, antes da sua iniciação sexual. Do ponto de vista ético, a vacinação universal estaria recomendada, mas não poderia ser obrigatória, e deveria incluir meninas de 10-13 anos durante seus programas de vacinação global. Entretanto, preocupações sobre potenciais danos devem ser consideradas com atenção, lembrando que nem todas as pessoas estão em risco, pois nem todas praticam sexo ou estão expostas ao vírus em suas relações sexuais. Os efeitos da vacinação sobre o comportamento sexual dos jovens devem ser avaliados. Uma vez vacinados, acreditando que estão protegidas do HPV e do câncer cervical, podem assumir um comportamento sexual de alto risco com conseqüente aumento de outras DSI e até eventual diminuição do comparecimento aos

programas de rastreamento. Temendo estas eventuais conseqüências, os planejadores em saúde deverão ser muito diligentes em informar a população de que a vacinação para HPV não resultará em proteção para outras DSI e que o HPV é responsável por apenas uma parte das conseqüências de relações sexuais sem proteção. (Ault, 2006; Soper, 2006; Gonik, 2006).

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

3.4. CO-FATORES DO HPV NA ONCOGÊNESE CERVICAL

Entre os fatores de risco para o surgimento do câncer cervical uterino e de lesões precursoras, a infecção pelo HPV tem sido estabelecida dentro dos critérios de causalidade. O desenvolvimento do câncer cervical é quase improvável na ausência da infecção pelo HPV e de fatores coexistentes que fornecem a persistência da infecção (Silva *et al*, 2006).

Diversos fatores sócio-comportamentais podem estar relacionados ao desenvolvimento de uma lesão precursora do câncer cervical associada ao HPV. Entre esses se destacam o comportamento sexual, a idade precoce de início da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros, a multiparidade, o tabagismo, a situação sócio-econômica, o uso prolongado de contraceptivos orais, hábitos de higiene pessoal precários, história de doenças sexualmente transmissíveis e fatores imunológicos (Villa, 1997; Perez, 2001). Dentre estes co-fatores citados, o elevado número de parceiros sexuais representa o mais evidente para a infecção pelo HPV (Burk *et al*, 1996).

Em relação ao tabagismo, tanto a exposição ao fumo, considerando a idade de início, o período e a freqüência de consumo de cigarros parecem influenciar na incidência do câncer

cervical (Haverkos *et al*, 2000; Kjellberg *et al*, 2000). Os dois mecanismos principais pelo qual o hábito de fumar parece contribuir para a oncogênese cervical incluem a exposição direta do DNA de células epiteliais cervicais a nicotina e a cotidina, bem como a outros produtos metabólicos e componentes da fumaça do cigarro (Pinto *et al*, 2002).

Entretanto, quanto ao uso de contraceptivos orais, é difícil avaliar sua relação com a infecção pelo HPV. Tem sido sugerido que o uso de contraceptivos orais estaria associado com os subtipos de HPV de alto risco 16, 18 e 31. Além disso, hormônios esteróides na forma de contraceptivos comumente administrados durante a fase reprodutiva parecem aumentar a atividade transformadora dos oncogenes do HPV, bem como interferir na resolução eficiente de lesões causadas pelo vírus na cérvix de mulheres jovens (Wang *et al*, 2003).

A resposta imune do hospedeiro também é um fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. A frequência da infecção genital pelo HPV bem como a progressão para lesões displásicas ou mesmo o câncer é mais comumente observada em mulheres imunodeficientes, quando comparadas a mulheres imunocompetentes (Anschau *et al*, 2002).

A participação exata de cada um dos fatores abordados acima e quais os elementos essenciais para o desencadeamento do processo carcinogênico, ainda são aspectos que necessitam de mais estudos.

3.4.1. Sistema Imunológico e HPV

Vários estudos na literatura sugerem uma forte associação entre a oncogênese e a progressão neoplásica relacionada ao HPV com o sistema imunológico. Entretanto, os mecanismos exatos responsáveis por essa resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV ainda não são totalmente conhecidos. Estes podem estar relacionados à ativação do

sistema imunológico ou à composição genética do hospedeiro (Pinto *et al*, 2002; Moore *et al*, 2001; Fernandes *et al*, 2004).

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

3.4.2. Interleucina 10

Em 1989, Fiorentino *et al*. descreveram uma substância que estava presente no sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos Th2, que era capaz de inibir a produção de citocinas produzidas por células Th1 em cultivos celulares. Tal substância foi denominada Fator Inibidor da Síntese de Citocinas.

Posteriormente, após análises imunoquímicas e bioquímicas indicaram que o Fator Inibidor da Síntese de Citocinas era uma nova citocina que passou a ser chamada “Interleucina 10” (Moore *et al*, 2001).

3.4.3. Proteína e estrutura Gênica

A IL10 é uma estrutura homodimérica, sem a presença de carboidratos, constituída por uma cadeia polipeptídica que se estrutura em quatro α - hélices (Moore *et al*, 2001).

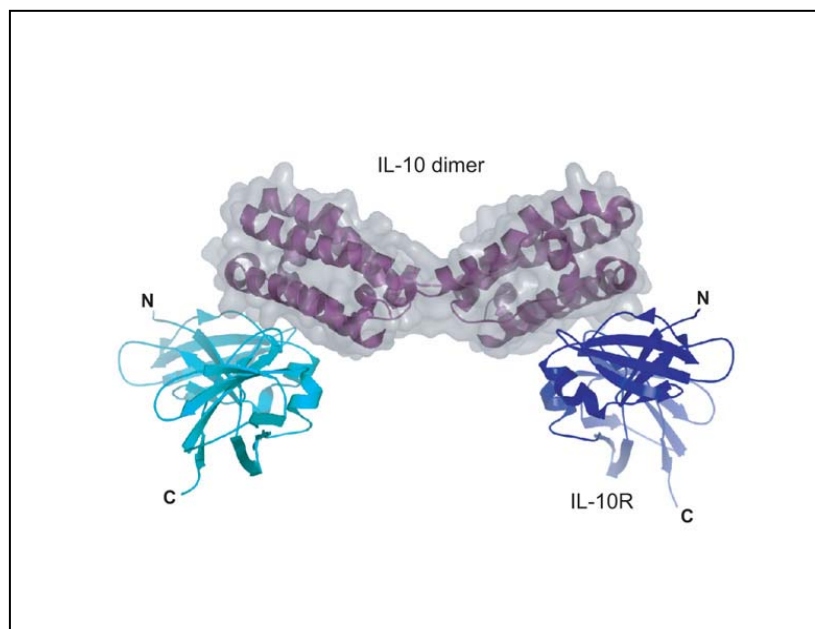


Figura 2. Estrutura tridimensional da IL10 e do IL10R.

Fonte: <http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>

3.4.4. Função Biológica da citocina IL10

A IL10 também pode ser produzida por linfócitos Th2, linfócitos Th0, células B, queratinócitos e células dendríticas (Blackburn e Wherry, 2007). A IL10 é uma citocina antiinflamatória que inibe a síntese de vários mediadores inflamatórios normalmente secretados por monócitos/macrófagos ativados, tais como: IL1 α , IL1 β , IL6, IL8, IL12, IL18 e GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Monócitos), G-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos), TNF- α , LIF (Fator Inibidor da Leucemia), PAF (Fator Ativador de Plaquetas),

TFA (Fator de Atividade Tissular), quimiocidas, PGE2 (Prostaglandina - E2) (Fiorentino *et al*, 1991).

Os monócitos/macrófagos parecem ser os alvos principais da IL10 que inibe a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD54, CD80 e CD86 em monócitos mesmo após a indução dessas moléculas por IL4 ou IFN- γ , reduzindo a proliferação de linfócitos T (Mocellin *et al*, 2003). Ao contrário, a IL10 estimula a expressão de receptores das Imunoglobulinas G em monócitos/macrófagos humanos, fato relacionado com o aumento da sua capacidade fagocítica (Spittler *et al*, 1995).

Células dendríticas humanas se caracterizam pela sua capacidade de ativar células T em repouso e iniciar uma resposta imune. Em geral, os efeitos da IL10 sobre as células dendríticas são consistentes com a inibição da resposta inflamatória Th1 (Mocellin *et al*, 2003, Moore *et al*, 2001).

A inibição das células Th1 pela IL10 parece ser mediada via inibição da síntese de IL12, um co-estimulador que é necessário para a produção de citocinas Th1 por células T e macrófagos. A IL10 inibe fortemente a produção de IL12, a qual pode induzir a síntese de IL10 por células T, sugerindo que o sistema imune é equipado por um mecanismo de *feedback* negativo relacionado à atuação das células T (Mocellin *et al*, 2003).

O efeito inibidor da IL10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias (Moore *et al*, 2001).

3.4.5. Polimorfismo e níveis de expressão do gene da IL10

Estudos familiares sugerem que aproximadamente 75,0% da variação na produção da IL10 é geneticamente determinada. Vários polimorfismos dentro da região promotora do gene da IL10 foram descritos como funcionais, incluindo duas repetições dinucleotídicas de

citossina e adenina e três bialélicos na região promotora (-1082, -819 e -592), designados a partir do sítio de início de transcrição (+ 1) (Stanczuk *et al*, 2001).

A presença do nucleotídeo A na posição -1082 está correlacionada com baixa produção da IL10. Os polimorfismos do gene da IL10 da região promotora parecem ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL10. A capacidade de secretar diferentes níveis de citocinas, herdadas geneticamente, parece ser relevante na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais. No entanto, são raros os estudos avaliando polimorfismos de citocinas nas lesões cervicais (Bidwell *et al*, 1999; Haukim *et al*, 2002).

Em um estudo avaliando o polimorfismo -1082 foi observado que mulheres com câncer cervical portadoras do alelo G parecem estar imunogeneticamente predispostas a produzir altos níveis da IL10. Além disso, foi descrito que a frequência do alelo associado à baixa produção de IL10 (-1082 A) foi menor no grupo de mulheres com câncer cervical quando comparado com o grupo controle. Estes resultados sugerem que a habilidade, geneticamente determinada, de produzir altos níveis da IL10 pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer cervical (Stanczuk *et al*, 2001).

Segundo Gianini *et al*, (2002) níveis aumentados de IL10 em mulheres com lesões cervicais infectadas pelo HPV, em relação às mulheres saudáveis apresentando colos uterinos normais, indicam a ocorrência de imunossupressão local, visto que a IL10 estaria inibindo a apresentação de antígenos, a função das células T citotóxicas, a proliferação das células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas inibições contribuem para a instalação e o desenvolvimento de lesões cervicais após infecção pelo HPV.

Acredita-se que a presença da infecção pelo HPV-16, tipo viral predominantemente encontrado em estudos brasileiros, parece influenciar na produção da IL10, aumentando sua

produção em mulheres que geneticamente estariam predispostas a produzir níveis reduzidos dessa citocina, deixando-as mais susceptíveis a instalação e progressão de lesões cervicais, precursoras do câncer do colo uterino (Fernandes *et al*, 2004).

A partir destas considerações pode-se sugerir que um melhor entendimento do papel das citocinas neste contexto poderá ser útil, não só na utilização de vacinas preventivas e terapêuticas para a infecção pelo HPV, como também para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas de neoplasias intraepiteliais cervicais graus I e II.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Verificar a frequência do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL10 e sua associação com a infecção genital pelo HPV.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos alelos encontrados no polimorfismo -1082A/G do gene da IL10 nas amostras investigadas.

- Verificar a possível associação do polimorfismo 1082A/G do gene da IL10 com a infecção genital pelo HPV (presença ou ausência do vírus, e presença de HPV de alto risco 16, 18 e 31).

- Verificar a possível associação do polimorfismo 1082A/G do gene da IL10 com o grau de lesões cervicais em mulheres infectadas pelo HPV.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anschau F, Schmitt VM, Gonçalves MAG. O papilomavírus humano nas lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina: aspectos imunológicos e moleculares. *Revista de Medicina da PUCRS* 2002; vol. 12 nº.2: 148-154.
2. Araújo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutation Research*. 2003; 544 (2-3):375-83.
3. Ault Ka. Vaccines for the prevention of human papillomavirus and associated gynecologic diseases: a review. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2006; 61:26-31.
4. Ayre JE. The vaginal smear: "precancer" cell studies using a modified technique. *Am J Obstet Gynecol* 1949; 58:1205-19.
5. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005; (32):16-24.
6. Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *American Journal of the Medical Sciences* 1997; 102: 9-15.
7. Bibbo M & Silva Filho AM. *Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 1998.
8. Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, LAUNDY GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement. *European Journal of Immunogenetics* 1999; 26: 135-223.
9. Blackburn SD, Wherry EJ. IL10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol*. 2007;15(4):143-6.
10. Bosch FX, Castellsagué X, de Sanjosé S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *Br J Cancer*. 2008; 98(1):15-21.

11. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:796-902, 1995.
12. Brinton LA, Shairer C, Haenszel W, Stalley P et al. Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *Journal of the American Medical Association* 1986; 255(23): 3265-3269.
13. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:S52-61.
14. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16: 1-17.
15. Burger MP, Hollema H, Gouw AS, Pieterswj. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *British Medical Journal* 1993; 306(6880): 749-752.
16. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M et al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *Journal of Infectious Diseases* 1996; 174(4): 679-689.
17. Campion MJ, Greenberg MD, Kazamel TIG. Manifestações clínicas e história natural das infecções pelo papilomavírus humano. In: Lorincz AT, Reid R (ed.) *Papilomavírus Humano II*. Clin Obstet Ginecol Am Norte. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996; P. 759-86.
18. Carvalho, Julio José M.; Oyakawa, Nadir. *I Conselho Brasileiro de HPV-Papilomavírus humano 2000* São Paulo: Editora BG cultural.
19. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *The Journal of Virology* 1995; 69(5): 3074-3083.
20. Collins, S. *et al.* High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG* 109, 96–98 (2002).

21. Cox JT. Management of cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*. 1999; 353(9156):857-59.
22. Dunne EF, Markowitz LE. Emerging Infections: Genital Human Papillomavirus Infection. *Clin Infect Dis*. 2006; 43(5):624-9.
23. Farzaneh F, Roberts S, Mandal D, Ollier B, Winters U, Kitchener HC, et al. The IL10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *Int J Obst Gynaecol*. 2006; 113(8):961-4.
24. Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 140(2):241-4.
25. Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Quintana SM, Duarte G, Donadi EA. Influence of the HPV-16 on IL10 intralesional production in immunogenetically responsive women carrying HIV-1 infection. *DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 2004; 16(3): 67-72
26. Santos ALF et al. Desempenho do exame citopatológico com revisão por diferentes observadores e da captura híbrida II no diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical graus 2 e 3. *Caderno de Saúde Pública* 2003; 19 (4): 1029-1037.
27. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 2003; 77(8):4818-26.
28. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M. IL -10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991; 147 (11): 3815-22.
29. Franco EL, Cuzick J, Hildesheim A, de Sanjosé S. Chapter 20: Issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:171-7.
30. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine* 2005; 23:2388-2394.

31. Fusté P, Santamaría X, Carreras R. New therapeutic strategies for human papillomavirus related anogenital lesions in HIV patients: highly active antiretroviral therapy and HPV vaccines. *Med Clin (Barc)*. 2008; 131(1):30-4.
32. Galvane JO, Roteli-Martins C, Tadini V. Achados da inspeção visual com ácido acético para rastreamento de câncer do colo uterino. *J Bras Doenças Sex Transm* 2002; 14: 435.
33. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *International Journal of Cancer* 2002; 97(5): 654-659.
34. Gillison ML, Koch WM, Capone RB. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; (25):709-20.
35. Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahé C, et al. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med*. 2005; 353(20):2158-68.
36. Gonik B. Strategies for Fostering HPV Vaccine Acceptance. *Infections Diseases Obstetrical and Gynecological* 2006; 14(1): 36797.
37. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9447):1757-1765.
38. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(4):284-92.
39. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity* 2002; 3 (6): 313-330.

40. Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Jornal of the National Cancer Institute* 2000.
42. Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomedicine Pharmacotherapy* 2000; 54(1):54-59.
43. Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Lazcano E, Hernández-Avila M, Salmerón J. High-risk human papillomavirus detection and related risk factors among pregnant and nonpregnant women in Mexico. *Sex Transm Dis.* 2005; 32(10):613-18.
44. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of Cervical Cancer: a review. *Virus Research* 2002; 89 (2): 229-240.
45. Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer.* 2003; 107(5):811-16.
46. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998; 338(7):423-8.
47. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc.* 2008; 107(3):198-217.
48. Huh WK, Roden RB. The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 109 Suppl 2: 48-56.
49. INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008. [Homepage Internet]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
50. Inglis S, Shaw A, Koenig S. Chapter 11: HPV vaccines: commercial research, development. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3:99-105.
51. Janicek MF, Averette HE. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin.* 2001; 51(2):92-114.
52. Kahn JA, Bernstein DI. Human papillomavirus vaccines and adolescents. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005;17(5):476-82.

53. Kaufman RH, Adam E, Vonka V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2000; 43: 363-380.
54. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *Journal of Virology* 2005; 79: 3737-54.
55. Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, Glew S. TNFalpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 2004; 92(2):675-9.
56. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *British Journal of Cancer* 2000; 82(7): 1332-1338.
57. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997;102(5):3-8.
58. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskeva E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2006; 367(9509):489-98.
59. Liaw KL, Glas AG, Manos MM, Greer CE. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(11):954-60.
60. Linhares AC, Villa LL. Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV). *Jornal de Pediatria* 2006; vol.82 n°. 3.
61. Lorenzato FR, Singer A, Ho L, Santos LC, Batista Rde L, Lubambo TM, et al. Human papillomavirus detection for cervical cancer prevention with polymerase chain reaction in self-collected samples. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(5):962-8.
62. Maciag PC, Schlecht NF, Sousa PSA, Franco EL, Villa L, PETZL-ERLER, ML. Major histocompatibility complex classe polymorphisms and risk of cervical cancer and

human papillomavirus infection in Brazilian woman. *Cancer Epidemiology, biomarkers e prevention* 2000; (9): 1183-1191.

63. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; 20:505-9.

64. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL10. *Trends Immunol.* 2003;24(1):36-43.

65. Moore KW, Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and interleukin -10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19: 683-765.

66. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000;19(1-2):1-5.

67. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Haya Kawa H et al. Mechanisms of human papillomavirus- Induced Oncogenesis. *The Journal of Virology* 2004; 78(21): 11451-11460.

68. Nadal, LRM e Nadal, SR. Indicações da vacina contra o papilomavirus humano. *Rev bras. colo-proctol.* 2008, vol.28, n.1, pp. 124-126.

69. Nicolau SM, Camargo CGC, Stávale JN, Gallo C, Dôres GB, Lörincz A, et al. Hybrid capture in the detection of HPV DNA in male sexual partners of women with genital infection. 19th International Papillomavirus Conference, HPV 2001, Florianópolis; 2001.

70. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev. Saúde Publica* 2002; 36:95-100.

71. Nussbaum R, Mcinnes R, Willard H. *Genética Médica.* Editora Guanabara Koogan S.A. 2002; 6ª edição: 244-254.

72. Odunsi K, Terry G, HO L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Association between HLA DQB1* 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Molecular Medicine* 1995; 1(2):161-171.

73. Okada MMK, Gonçalves MAG, Giraldo PC. Epidemiologia e patogênese do Papilomavírus Humano (HPV). In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural, 2000. P. 143.

74. Palefsky JM, Gillison ML, Strickler HD. Chapter 16: HPV vaccines in immunocompromised women and men. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:140-6.

75. Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical cancer, treatment, and prevention. *Clinical & Laboratory Science* 2001; 14(3): 183-186.

76. Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. Hpv co-factors in cervical carcinogenesis. *Revista Associação Médica Brasileira* 2002; 48: 73-82.

77. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89(12): 868-873.

78. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(2):181-4.

79. Rapp L, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *International Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 1998; 1378 (1):1-19.

80. Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, Bettinger D, Schaal JP, Carbillet JP, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8:157-64.

81. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-7. Epub 2008 Sep 16.

82. Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG, et al. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:7-28.

83. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005; 15(5):727-46.
84. Schiffman M, Adriansa ME. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Cytol*. 2000; 44(5):726-42.
85. Schiffman M, Castle PE, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370(95): 890-7.
86. Seamans Y, Sellors J, Broekhuizen F, Howard M. Preliminary report of a gas conditioner to improve operational reliability of cryotherapy in developing countries. *BMC Womens Health*. 2006; (6): 2.
87. Shyu JS, Chen CJ, Chiu CC, Huang SC, Harn HJ. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: an in-situ polymerase chain reaction approach. *J Surg Oncol*. 2001; 78(2):101-9.
88. Silva LMS; Araújo Silva H; Paiva Pereira I; Furtado Pinheiro VM. Cytomorphologic criteria for the diagnosis of HPV and its relation with the gravity of cervical intraepithelial neoplasia. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2005; vol. 37(2): 127-132.
89. Silva TT, Guimarães ML et al. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intraepitelial. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2006. Vol 28 n5.
90. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121(3):621-32.
91. Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005; 16(4):306-16.
92. Soper D. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2006; 14(1): 83-84.
93. Spittler A, Schiller C, Wilhelm M, Tempfer C. IL10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4 driven CD23 expression on cultured human blood

monocytes: effects of IL10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology*. 1995;85(2):311-7.

94. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL10 production. *International Journal of Cancer* 2001; 94(6): 792-794.

95. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:62-9.

96. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV-16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 2003; 22(8): 1225-1237.

97. Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*. 2006;12 (17 Suppl):S462-72.

98. Vargas, V.R.A. & Dalla Corte, E.A. Prevalência das lesões intra – epiteliais escamosas em exame citológico numa determinada população de Santo Ângelo, RS. Monografia Especialização Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Regional Sul 2002. Porto Alegre.

99. Walboomers JM, Husman AM, Snijders PJ, Stel HV, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al. Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. *J Clin Pathol* 1995; 48:728-32.

100. Wang SS, Schiffman M, Shields TS, Herrero R et al. Seroprevalence of human papillomavirus 16, 18, 31 and 45 in population-based cohort of 10.000 women in Costa Rica. *British Journal of Cancer* 2003; 89(7): 1248-1254.

101. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *The American Osteopathic Association* 2006; 106(3 Suppl 1):S2-8.

102. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 2006; 354(25):2645-54.

103. Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003; 348(6):489-90.

104. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71(3): 2463-2472, 1997.

105. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisuljov F et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogenes* 2003; 22(25): 3977-3984.

6. ARTIGO

Expressão do polimorfismo (-1082 A/G) do gene da Interleucina 10 (IL10) em lesões do colo uterino positivas para o Papilomavírus Humano (HPV)

Expressão do polimorfismo (-1082 A/G) do gene da Interleucina 10 (IL10) em lesões do colo uterino positivas para o Papilomavírus Humano (HPV)

Gabriela Tonini¹, Maria Lúcia da Rosa Rossetti², Sabrina Esteves de Matos Almeida³,
Miriam Alice Frantz³, Mary Clarisse Bozzetti^{1,4}

¹ Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Laboratório Central do Rio Grande do Sul (CDCT/LACEN), Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³ Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Correspondência:

Gabriela Tonini

Rua Bagé, 317. Bairro Planalto – CEP 96950-000 – Encantado, RS – Brasil

Telefone: (51) 92052523

E-mail: gabriela_tonini@yahoo.com.br

Resumo

Introdução: Os polimorfismos no gene da IL10 têm sido implicados na susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores. Na infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), os dados são conflitantes em relação a IL10 apresentar predomínio para o padrão associado com a eliminação viral ou, ao contrário, com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais.

Objetivos: Verificar a frequência do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL10 e sua associação com a infecção genital pelo HPV.

Materias e métodos: Trata-se de um estudo de caso-controle. Os casos são 84 mulheres com infecção genital pelo HPV que apresentavam exame histopatológico da cérvix uterina alterado. Os controles correspondem a 211 mulheres HPV-DNA negativas e sem alteração ao exame citopatológico da cérvix uterina. A técnica de amplificação refratária de mutações (ARMS-PCR) foi utilizada para a identificação do polimorfismo da IL10. O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas observadas são concordantes com as esperadas na população em estudo. O método de regressão logística múltipla foi utilizado para verificar a associação das variáveis estudadas com a infecção genital pelo HPV.

Resultados: A frequência genotípica observada no grupo de mulheres com infecção foi 59,0% para o genótipo GG e entre os controles esta frequência foi de 28,4% ($p < 0,001$). Entre as mulheres com infecção e com lesões de baixo grau (LSIL), predominantes nessa população (73,8%), a frequência do genótipo GG foi de 62,9%. Nos casos com lesões de alto grau (HSIL) (26,2%), o genótipo GG foi observado em 50,0%. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos em lesões de alto e baixo grau ($p = 0,59$). Além disso, foi observada diferença de significância limítrofe entre a distribuição

da frequência dos genótipos comparando mulheres com HPV oncogênicos em relação a mulheres HPV negativas ($p=0,05$). Observou-se que o grupo etário (RC= 5,00; IC95%: 2,33 – 10,75), e o genótipo GG (RC=4,41; IC95%:1,87 – 10,42) apresentaram-se independentemente associados ao desfecho (infecção genital pelo HPV). As variáveis, escolaridade (RC= 3,28; 1,00 – 11,18) e co-infecção por HIV (RC= 10,64; 1,00 -111,11) apresentaram significância limítrofe.

Conclusão: Os resultados sugerem que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL10 (GG) pode estar associada à infecção pelo HPV e ao processo de transformação maligna, mostrando a importância da resposta imunológica do hospedeiro no processo de infecção.

Palavras-Chave: IL10, polimorfismo IL10 (-1082), lesões cervicais, HPV.

Abstract

Background: The gene polymorphism in the IL10 has been related to the susceptibility of the development of cancers. In Human Papillomavirus (HPV) infection, data are conflicting with respect to whether IL-10 presents the pattern associated with the elimination of the virus, or conversely, the one associated with persistence of infection and progression to cervical lesions.

Objective: To evaluate the frequency of polymorphism -1082 A/G present in the promoter region of the gene of IL10 and its role in the development of cervical lesions.

Material and method: A case-control study was conducted. The case group included 84 HPV positive women with abnormal anatomopathological results. The control group included 211 healthy women, which were HPV negative and had a normal cytology. The amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) technique applied to identify the polymorphism of the IL10. The Hardy-Weinberg equilibrium was used to verify whether the observed allelic and genotypic frequencies were according with the expected in the studied population. Multiple logistic regression was used to verify the association between the study factors and the outcome (genital infection by HPV).

Results: The genotypic frequency observed among cases and controls was 59.0% and 28.9 for the GG genotype, respectively ($p < 0.001$). Among the HPV infected women, the low grade lesions (LSIL), predominant in this sample (73.8%), the GG genotype frequency was observed in 62.9%. In those with high grade lesions (HSIL) (26.2%), the GG genotype was observed in 50.0% ($p = 0.59$). In addition, a borderline significance was observed between the genotype frequency when comparing women infected by a high risk HPV with those HPV-DNA negatives. Age group (OR=5.00; 95%CI: 2.33 – 10.75), and the GG genotype (4.41; 1.87 – 10.42) were independently associated to the outcome (HPV genital infection). The

variables schooling (3.28; 1.00 – 11.18) and HIV co-infection (10.64; 1.00-111.11) presented a borderline significance.

Conclusion: The results suggest that a genetic predisposition to produce high levels of IL10 (GG) production may be related with cancer development, showing the importance of the immunologic response in the process of HPV infection and in the progression of cervical lesions caused by the Human Papillomavirus.

Keywords: IL10, IL10 (-1082) polymorphism, cervical lesion, HPV.

Introdução

Em todo o mundo, estima-se que, a cada ano, ocorram 510.000 novos casos de câncer cervical e 288.000 mortes; destes 70,0% são causados pelos tipos oncogênicos de HPV (16 e 18). Além do câncer cervical, o HPV pode causar outros tipos de câncer (vagina, vulva, pênis e ânus). Alguns outros tipos que apresentam baixo potencial oncogênico, como o 6 e 11, são responsáveis por mais de 90,0% das verrugas genitais que acometem até 10,0% dos homens e mulheres com vida sexual ativa ^[1].

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

A resposta imune do hospedeiro também é um fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. A prevalência da infecção pelo HPV, bem como a progressão para lesões displásicas ou mesmo para o câncer, é mais freqüente em mulheres imunodeficientes, quando comparado a mulheres imunocompetentes ^[5].

As citocinas são moléculas importantes na defesa do organismo contra infecções virais. Elas podem atuar de forma indireta, através da determinação de um padrão de resposta imune ou diretamente pela inibição da replicação viral ^[6]. El Sherif *et al* (2001) sugere uma regulação cruzada entre os diferentes padrões de citocinas na resposta imune do hospedeiro.

Se por um lado, as citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon-gama (IFN- γ), induzem uma resposta imune efetiva contra infecções virais e neoplasias, por outro lado, citocinas imunoinibitórias, como a Interleucina 10 (IL10), induzem uma resposta imune adaptativa, que é eficaz contra antígenos extracelulares, entretanto, permissiva ao desenvolvimento de tumores [7].

Avaliações da produção de citocinas por linfócitos T do sangue periférico têm sido realizadas em mulheres portadoras de lesões cervicais em vários graus de gravidade, sugerindo que o desenvolvimento das lesões parece estar associado, preferencialmente, ao padrão local de citocinas imunoinibitórias, como no caso da IL10 [6]. Os diferentes níveis secretados de IL10 podem estar associados à eliminação do HPV, ou à persistência da infecção e progressão para lesões cervicais [6].

Segundo Giannini *et al* (2002), níveis aumentados de IL10 em mulheres com lesões cervicais infectadas pelo HPV em relação às mulheres saudáveis indicam a ocorrência de imunossupressão local, uma vez que a IL10 estaria inibindo a apresentação de antígenos, a função das células T citotóxicas, a proliferação das células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias [8].

Já foram descritos três polimorfismos simples de nucleotídeos (SNPs) na região promotora do gene da IL10, nas posições -1082, -819 e -592. Estes parecem ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL10 [9, 10]. Em um estudo avaliando o polimorfismo -1082 foi observado que mulheres com câncer cervical portadoras do alelo G parecem estar imunogeneticamente predispostas a produzir altos níveis da IL10. Além disso, foi descrito que a frequência do alelo associado à baixa produção de IL10 (-1082 A) foi menor no grupo de mulheres com câncer cervical quando comparado com o grupo controle. Estes resultados sugerem que a habilidade,

geneticamente determinada, de produzir altos níveis da IL10 pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer cervical ^[11].

Frente a estas considerações, este estudo tem como objetivo verificar a frequência do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL10 e sua associação com a infecção genital pelo HPV.

Materiais e Métodos

Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo de caso-controle. O desfecho estudado foi a infecção genital pelo HPV. Fazem parte do estudo uma amostra de mulheres que participaram de um estudo de coorte, realizado no período de Fevereiro de 2003 a Dezembro de 2006 ^[12], em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, Brasil. Estas mulheres procuraram atendimento na Unidade de Atenção Primária Jardim Leopoldina, pertencente ao Serviço de Saúde Comunitária do Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre/RS) com o intuito de realizar rastreamento de câncer de colo uterino. Os critérios de entrada no estudo já foram descritos em publicação prévia ^[12].

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

Amostra e Amostragem

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

Definição de Casos: foram considerados casos todas as mulheres da base de dados que apresentavam infecção genital pelo HPV, detectadas através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e que apresentavam resultado histopatológico alterado. O número definido para o estudo foi de 84 casos.

Definição de Controles: foram considerados potenciais controles as mulheres HPV negativas e com resultado citológico sem alterações. Compuseram o grupo controle, 211 mulheres e, para cada caso, três controles eram selecionados emparelhados aos casos de acordo com o mês de entrada no estudo.

Cabe mencionar que da amostra inicial disponível, houve uma perda de 19 % para os casos e 16% para os controles, decorrente de problemas relacionados à técnica utilizada para a detecção do polimorfismo IL10 -1082 A/G. O poder do estudo foi recalculado e este foi de 80%, sendo considerado adequado para os objetivos do estudo.

Coleta do material

Foram utilizadas amostras cérvico-vaginais das mulheres, coletadas através de uma escova citológica (*cytobrush*) para a pesquisa de DNA viral e humano obtidas da ectocérvice/endocérvice. O transporte das amostras foi realizado em condições de baixas temperaturas e conservado à temperatura de -20°C até o momento da extração. O protocolo de extração de DNA utilizado foi descrito por Bauer ^[13] e Coutlée ^[14]. Todas as amostras foram avaliadas quanto à presença do DNA viral e genotipadas para os HPV oncogênicos, 16, 18 e 31.

Informações sobre as participantes, dados clínicos e laboratoriais (citopatológico, colposcopia e anatomopatológico) foram extraídas da base de dados existente para o estudo de coorte ^[12].

Diagnóstico histopatológico das amostras do colo uterino

O diagnóstico histopatológico foi categorizado em dois grupos considerando a gravidade da lesão ^[15]:

- Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – LSIL: NIC I e alterações celulares secundárias à infecção pelo HPV);

- Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – HSIL: NIC II, NIC III e câncer cervical).

Detecção do polimorfismo IL10 -1082 A/G

A detecção dos alelos A ou G na posição - 1082 na região promotora do gene da IL10 foi realizada pela técnica de ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), descrita por Perrey ^[16]. A seqüência dos *primers* utilizados na PCR foram os seguintes:

IL10 (-1082) *Primer* Genérico (antisense): 5'-cagtccaactgagaatttgg-3'

IL10 (-1082) *Primer* G (sense): 5'-ctactaaggcttcttgggac-3'

IL10 (-1082) *Primer* A (sense): 5'-actactaaggcttcttgggaa-3'

O tamanho do produto amplificado corresponde a 258 pb.

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

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

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

O tamanho do produto amplificado corresponde a 429 pb.

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

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

Análise Estatística

Para a comparação das variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho (infecção genital por HPV) foi utilizado teste qui-quadrado (χ^2 de *Yates* ou *Pearson* e teste *Exato de Fisher* quando indicado). Para a comparação de variáveis contínuas foi utilizado teste *t de student* ou Mann-Whitney quando a distribuição das mesmas não era gaussiana.

O modelo de regressão logística múltipla foi utilizado para estimar a razão de chance (RC) e correspondente intervalo de confiança (IC) de 95%, para verificar as variáveis independentemente associadas ao desfecho do estudo. Foram selecionadas para entrar no modelo todas as variáveis com valor de $p < 0,25$ na análise bivariada e/ou clinicamente relevantes ao estudo. Foram consideradas estatisticamente significativas as variáveis com valor de $p < 0,05$.

O software SPSS® (versão 17.0) ^[17] foi utilizado para estas análises.

O cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ^[18] foi realizado a partir do software GraphPad InStat[®] (v. 3.06) ^[19] e utilizado para verificar se as frequências genóticas observadas estavam de acordo com as frequências esperadas na população em estudo.

Resultados

As características demográficas e sócio-comportamentais na população estudada encontram-se descritas na Tabela 1. Observaram-se diferenças significativas entre casos e controles em relação a idade, paridade e escolaridade, onde os casos eram em média mais jovens que os controles ($p<0,001$), tinham menos filhos ($p=0,01$) e escolaridade superior ($p=0,06$). Houve uma significância limítrofe com a idade na primeira relação sexual ($p=0,06$), co-infecção por HIV ($p=0,07$) e número de parceiros sexuais ao longo da vida ($p=0,08$), sendo que os casos iniciavam vida sexual mais precocemente, tinham mais parceiros e um percentual maior de infecção por HIV.

A frequência genotípica observada no grupo de mulheres com infecção foi 59,0% para o genótipo GG e entre os controles esta frequência foi de 28,4%. (Figura 1). Houve diferença significativa entre casos e controles quanto à frequência genotípica (Teste χ^2 , $p<0,001$). Através do Cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg verificou-se que as frequências genóticas observadas foram concordantes com as frequências esperadas na população.

Na Tabela 2 estão descritas as razões de chance brutas e ajustadas, com os correspondentes intervalos de confiança de 95%, para a associação entre as variáveis estudadas e o desfecho. Observou-se que o grupo etário (RC=5,00; IC95%:2,33-10,75), e o genótipo GG (RC=4,41; 1,87-10,42) apresentaram-se independentemente associados ao desfecho (infecção genital pelo HPV). As variáveis, escolaridade (RC=3,28; 1,00-11,18) e co-infecção por HIV (RC=10,64; 1,00-111,11) apresentaram significância limítrofe.

A Figura 2 mostra a distribuição dos genótipos do polimorfismo IL10 -1082 em mulheres infectadas pelo HPV, de acordo com o grau das lesões, se alto (HSIL) ou baixo grau (LSIL). Nas lesões de baixo grau, que são predominantes nessa população (73,8%), a frequência do genótipo GG foi 62,9%. Em mulheres que apresentavam HSIL (26,2%), o genótipo GG foi observado em 50,0%. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos em lesões de alto e baixo grau ($p=0,59$).

A frequência dos genótipos de acordo com o tipo de HPV oncogênico (HPV 16, 18 e 31) e com a ausência do vírus são mostrados na Figura 3. Das mulheres arroladas portadoras de HPV-AR, 50,0% apresentavam o genótipo GG, 36,7% AG e 13,3% AA. Entre as mulheres HPV negativas, as frequências dos genótipos foram de 48,8% para AG, 28,4% GG e 22,7% AA. Foi observada diferença de significância limítrofe entre a distribuição da frequência dos genótipos comparando mulheres com HPV oncogênicos em relação a mulheres HPV negativas ($p=0,05$).

Discussão

Vários estudos têm avaliado a influência de fatores genéticos e produção de citocinas no desenvolvimento de lesões cervicais, visto que desempenham um papel fundamental na resposta imune do hospedeiro [6, 20, 21, 22, 23].

As populações nas quais são identificadas lesões cervicais apresentam, em média, idade entre 30-35 anos [24], uma vez que o vírus pode manter-se na sua forma latente e se manifestar no decorrer dos anos. A média de idade dos casos neste estudo foi de 35,7 anos ($\pm 14,0$), corroborando os achados de Schiffman *et al* (2007). No presente estudo, a idade (<35 anos) mostrou-se independentemente associada à infecção genital por HPV em mulheres com LSIL ou HSIL.

Vários estudos têm sugerido uma associação significativa entre os tipos de lesões cervicais e dados sócio-comportamentais, como idade da primeira relação sexual, número de

parceiros, o uso de contraceptivos orais e tabagismo [25, 26, 27, 28]. Sun-Kuie *et al* (2004) sugerem que a combinação do uso de contraceptivos orais e tabagismo está associada à HSIL [29]. Em nosso estudo não foi observada associação entre fatores sócio-comportamentais e o desenvolvimento de lesões cervicais (LSIL e HSIL). Uma possível explicação é a baixa frequência de lesões de alto grau onde esta associação tem sido mais observada.

Em relação à co-infecção por HIV, mulheres infectadas pelo HPV tendem a desenvolver mais lesões cervicais escamosas de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) [30]. No presente estudo, a infecção por HIV apresentou uma associação limítrofe com o desfecho. No entanto, estes achados devem ser interpretados com cautela, considerando-se o pequeno número de mulheres que apresentaram co-infecção.

Alterações na expressão dos níveis da IL10 têm sido avaliadas em vários estudos [23, 32, 33, 34, 35]. O genótipo homozigoto AA do gene da IL10 na região promotora -1082, relacionado à baixa expressão da citocina, foi associado com vários tipos tumorais, incluindo avançados melanomas cutâneos [23], câncer de mama [10] e câncer de próstata [34], enquanto a expressão elevada da IL10 proporcionada pelo genótipo GG parece estar relacionada ao câncer cervical [36].

No presente estudo, a infecção por HPV e a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões cervicais apresentou associação com o polimorfismo -1082 G/G do gene da IL10, corroborando os achados de trabalhos prévios no qual o alelo G esteve associado à infecção viral e às lesões cervicais [11, 37]. Além disso, em 50,0% das lesões HSIL, o genótipo GG esteve presente. Estes resultados estão em concordância com os achados de Bermúdez-Morales *et al* (2008), no qual o genótipo GG também foi observado em 62,0% das HSIL e em 84,0% dos casos de câncer [37]. Outros estudos também relatam uma alta frequência do genótipo GG (IL10) nas amostras cervicais de câncer, bem como em outros tipos tumorais [23, 32, 34, 37].

Sabe-se que os tipos oncogênicos do HPV estão relacionados ao desenvolvimento de lesões cervicais e à progressão para o câncer cervical [6]. Observamos diferença com significância limítrofe entre portadoras de HPVs oncogênicos (16, 18 e 31) e mulheres HPV negativas quanto a presença dos alelos A/G da IL10. Apesar de não existirem trabalhos mostrando a relação dos genótipos da IL10 com os tipos de HPV, estudos avaliando os níveis dessa interleucina nas lesões sugerem que a presença da infecção pelo HPV 16 parece influenciar os níveis dessa citocina [6,36].

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

Algumas limitações devem ser consideradas ao examinarmos os resultados desse estudo. Uma delas foi o pequeno número de mulheres (casos) com lesões graves (NIC III e câncer), considerando-se que a extração de DNA de biópsias de amostras cervicais em blocos de parafina é um procedimento laborioso e, geralmente com resultados pouco satisfatórios. Além disso, neste estudo foi analisado um único SNP (-1082), embora observações advindas do estudo de um único SNP (-1082) possam parecer limitadas, esta variante parece ser importante nos diferentes níveis de expressão da IL10. Assim, espera-se que os achados deste estudo possam contribuir para o entendimento do papel da IL10 na etiologia do câncer cervical.

Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL10 (GG) pode estar associada à infecção genital por

HPV, o que ratifica a importância da resposta imunológica do hospedeiro na história natural da infecção viral e na progressão de lesões cervicais.

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

Referências Bibliográficas

1. Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG, et al. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:7-28.
2. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virology*. 2005; 32(4): 16-24.
3. Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical cancer, treatment, and prevention. *Clin & Lab Sci*. 2001; 14(3): 183-6.
4. Villa LL. Human papillomavirus and Cervical Cancer. *J Clin Oncol*. 1997; 71(9): 321-41.
5. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (Editors). *Cancer incidence in five continents*. Lyon (France): IARC; 2002.
6. Fernandes AP, Gonçalves MA, Duarte G, Cunha FQ, Simões RT, Donadi EA. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology*. 2005; 334(2): 294-8.
7. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins DI. Quantitative analysis of IL10 and INF-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol*. 2001; 195(2): 179-85.
8. Gianini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Inter J Cancer*. 2002; 97(5): 654-9.

9. Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement. *Eur J Immunogenetics*. 1999; 26(3): 135-223.
10. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun*. 2006; 7(4):269-76.
11. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL10 production. *Int J Cancer*. 2001; (94): 792-4.
12. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-7. Epub 2008 Sep 16.
13. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20(5): 274-8.
14. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H et al. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiology*. 2002; 40(3): 902-7.
15. Sherry LW, Janet FS, Patricia ES, Mary K, Amy HP, Diane DD. Interobserver Variability in Subclassification of Squamous Intraepithelial Lesions. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 1999; Vol. 123, No. 11, pp. 1079–1084.

16. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL10, TNF-alpha and TGF-beta-1 gene polymorphism. *Transplant Immunology*. 1999; 7(2): 127-8.
17. Ebrahimi N & Bilgili D. A new method of testing for Hardy–Weinberg equilibrium and ordering populations. *J Genetics*. 2007 April; 86:1-7.
18. *Statistical Package for Social Sciences – SPSS* (Pacote Estatístico para Ciências Sociais) Versão 17.0. <http://www.spss.com/statistics>.
19. GraphPad InStat 3.06. Analyse, Graph and Organize your data. Versão 3.06. <http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>
20. Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008 Oct;140(2):241-4. Epub 2008 May 27.
21. Song SH, Lee JK, Seok OS, Saw HS. The relationship between cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2007 Mar;104(3):732-8. Epub 2006 Dec 22.
22. Sharma A, Rajappa M, Saxena A, Sharma M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Jul-Aug; 17(4):879-85. Epub 2007 Mar 5.
23. Passmore JA, Morroni C, Shapiro S, Williamson AL, Hoffman M. Papanicolaou smears and cervical inflammatory cytokine responses. *J Inflamm (Lond)*. 2007 Apr 24;4:8.

24. Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *J Nutrition*. 2007; (137): 194-9.
25. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; (370): 890-7.
26. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*. 2005 Dec 20;117(6):1007-12.
27. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA et al. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):113-20.
28. Syrjänen K. New concepts on risk factors of HPV and novel screening strategies for cervical cancer precursors. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008;29(3):205-21.
29. Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M, Boniver J et al. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Jan 29;264(1-2):1-5. Epub 2006 Dec 4
30. Tay Sun-Kuie, Tay Kae-Jack. Passive cigarette smoking is a risk factor in cervical neoplasia. *Gynecologic Oncology*. 2004; (93): 116-20.
31. Krishnan A, Levine AM. Malignancies in women with HIV infection. *Womens Health (Lond Engl)*. 2008 Jul; 4(4):357-68.

32. Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-gamma in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinogenesis*. 2003; 3(2): 1477-3163.
33. Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Della Ragione F. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem*. 2003; (49):1664-7.
34. Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun*. 2001; (2): 25-31.
35. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res*. 2002; (62): 3369-72.
36. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 1-8.
37. Bermúdez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-González JM, Burguete A, Madrid-Marina V. Correlation Between IL10 Gene Expression and HPV Infection in Cervical Cancer: A Mechanism for Immune Response Escape. *Cancer Investigation*, 2008; 26(10): 1037-43.

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

Variáveis	Casos (n=84)	Controles (n=211)	Valor de p
<i>Cor da Pele - n (%)</i>			
Branca	65 (77,4%)	177 (84,2%)	0,18*
Não-branca	19 (22,6%)	34 (15,8%)	
<i>Idade (média em anos e DP)</i>	35,7 (13,7)	44,3 (11,6)	<0,001**
<i>Escolaridade - n (%)</i>			
Até 1º. Grau Incompleto	20 (24,4%)	64 (30,2%)	0,06***
De 1º. Grau Completo a 2º. Grau Incompleto	25 (26,3%)	75 (35,6%)	
De 2º. Completo ou acima	39 (46,4%)	72 (34,2%)	
<i>Infecção por HIV - n (%)</i>			
Sim	3 (3,6%)	1 (0,5%)	0,06*
Não	81 (96,4%)	210 (99,5%)	
<i>Fumo - n (%)</i>			
Sim	24 (28,6%)	52 (23,4%)	0,43*
Não	60 (71,4%)	170 (76,6%)	
<i>Uso de Contraceptivo oral - n (%)</i>			
Sim	83 (99,9%)	213 (93,4%)	0,12 *
Não	1 (1,0%)	9 (4,6%)	
<i>Sexarca (média em anos e DP)</i>	18,4 (4,1)	19,4 (4,2)	0,06**
<i>Parceiros Sexuais na Vida (média e DP)</i>	6 (13,0)	3 (4,0)	0,08**
<i>Paridade (média e DP)</i>	2 (1,9)	2,5 (1,8)	0,01**

* Teste χ^2 de Yates/Fisher; ** Test t de student/MannWhitne; *** χ^2 de Pearson

DP: desvio padrão.

Tabela 2. Razões de Chances (RC) Brutas e Ajustadas das variáveis estudadas em relação à infecção genital por HPV.

Variáveis	RC _{bruta} (IC95%)*	Valor <i>p</i>	RC _{ajustada} (IC95%)**	Valor de <i>p</i>
Grupo Etário (em anos)				
≥ 35 (Ref.)	1,0		1,0	
< 35	4,76 (2,76 - 8,26)	< 0,001	5,0 (2,33 - 10,75)	<0,001
Cor				
Branca (Ref.)	1,0		1,0	
Não Branca	1,56 (0,83 - 2,92)	0,18	1,76 (0,83 - 3,75)	0,20
Fumo				
Não (Ref.)	1,0		1,0	
Sim	1,31 (0,74 - 2,30)	0,43	1,16 (0,58 - 2,31)	0,74
Sexarca				
≥25 (Ref.)	1,0		1,0	
18 a 24	1,18 (0,51- 2,74)	0,38	1,65 (0,62 - 4,37)	0,56
≤ 17	1,50 (0,64 - 3,51)	0,09	1,95 (0,66 - 5,76)	0,40
Uso de Contraceptivo Oral				
Não (Ref.)	1,0		1,0	
Sim	4,23 (0,44 - 37,8)	0,12	2,12 (0,23 - 19,61)	0,65
Parceiros Sexuais na Vida				
1 (Ref.)	1,0		1,0	
2 a 4	1,44 (0,81 - 2,56)	0,29	1,12 (0,42 - 2,96)	0,90
≥ 5	1,55 (0,71 - 3,40)	0,23	1,27 (0,64 - 2,52)	0,44
Infecção por HIV				
Não (Ref.)	1,0		1,0	
Sim	7,94 (0,82 -76,92)	0,06	10,64 (1,00 - 111,11)	0,08
Escolaridade***				
SGC ou acima (Ref.)	1,0		1,0	
PGC à SGI	3,74 (1,49 - 9,40)	0,34	2,68 (0,90 - 8,09)	0,12
Até PGI	4,47 (1,65 -12,12)	0,06	3,28 (1,0 -11,18)	0,08
Paridade				
≤ 2 filhos (Ref.)	1,0		1,0	
> 2 filhos	1,49 (0,88 - 2,54)	0,01	1,47 (0,65 - 2,60)	0,54
Genótipos				
AA (Ref.)	1,0		1,0	
AG	1,10 (0,48 - 2,47)	<0, 001	1,12 (0,46 - 2,72)	0,57
GG	3,92 (1,80 - 8,55)	<0, 001	4,41 (1,87 - 10,42)	<0, 001

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

*** Escolaridade: PGI – primeiro grau incompleto; PGC – primeiro grau completo; SGI – segundo grau incompleto; SGC – segundo grau completo.

Figura 1. Distribuição dos genótipos nas mulheres estudadas, de acordo com a presença ou ausência do desfecho.

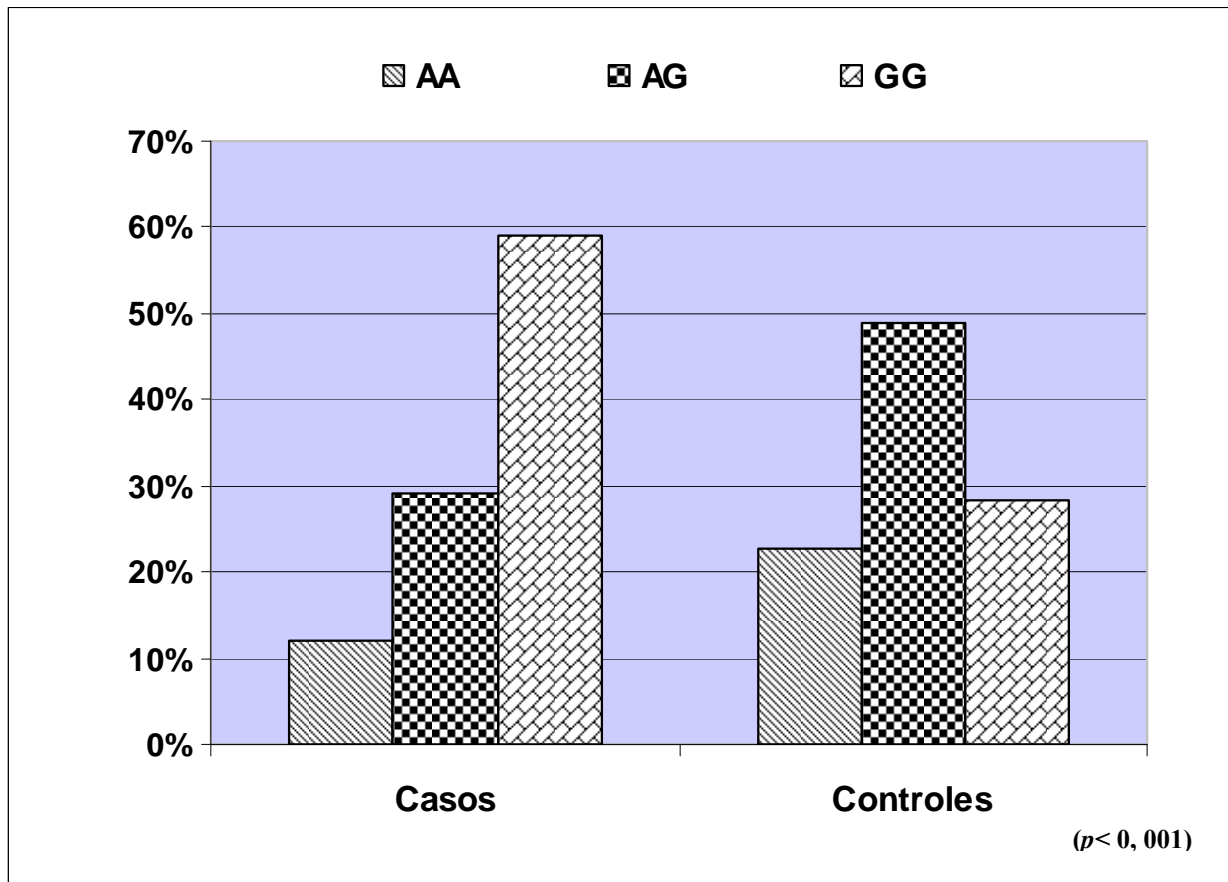


Figura 2. Freqüências genotípicas da IL10 em lesões baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) em mulheres HPV positivas.

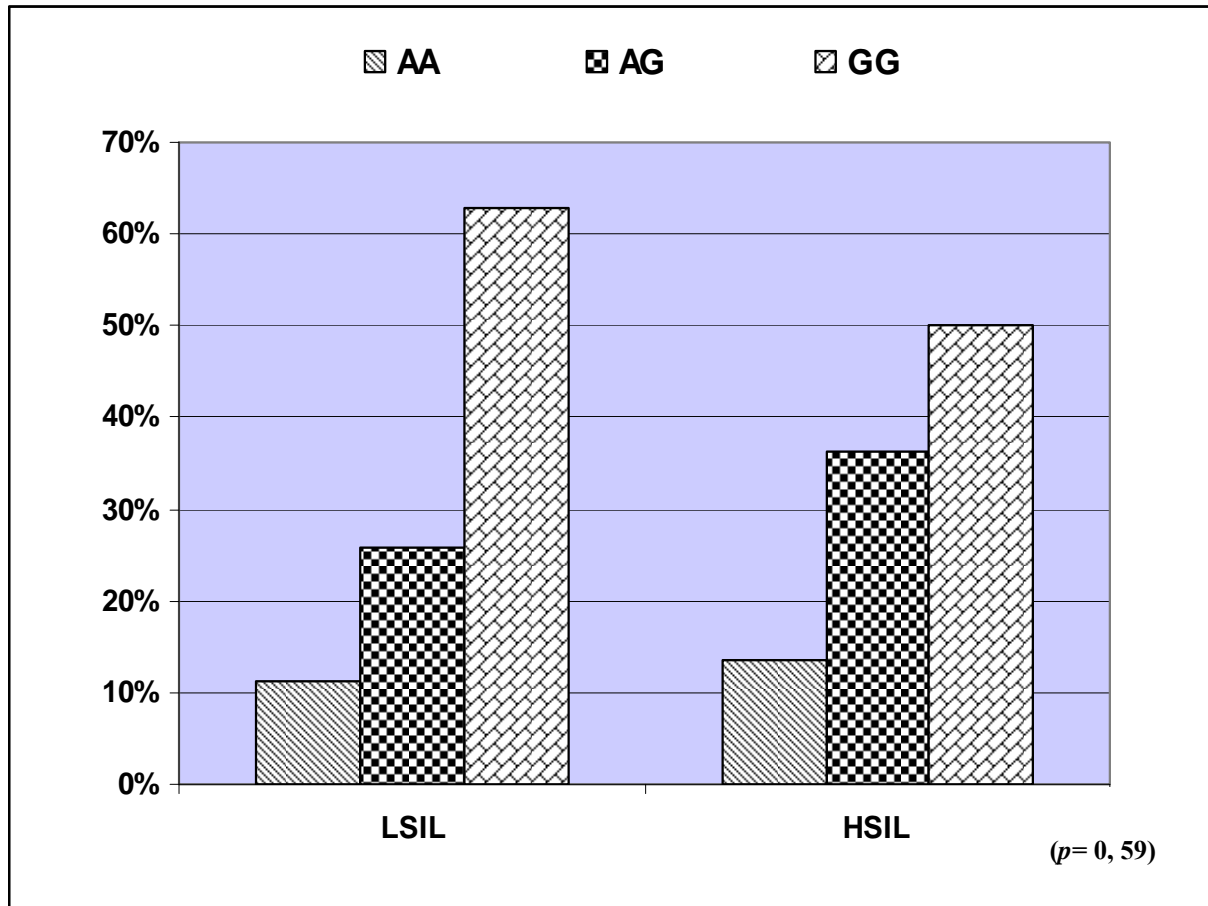
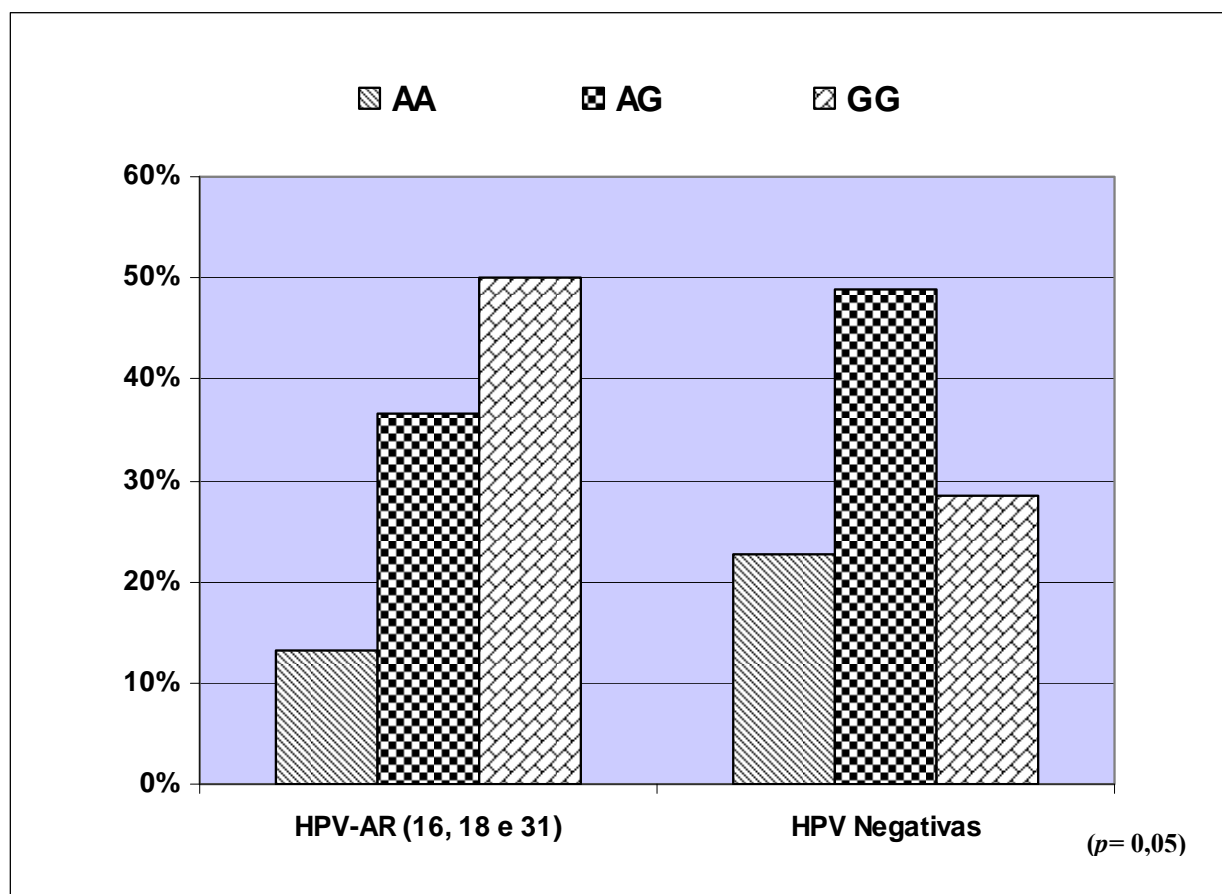


Figura 3. Distribuição dos genótipos estudados de acordo com a presença de infecção pelos tipos virais oncogênicos (HPV 16, 18 e 31) e com a ausência de infecção viral.



7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é um fator associado com o desenvolvimento do câncer de colo de útero. A frequência de mulheres com infecção genital pelo HPV é consideravelmente mais elevada que o número de mulheres com câncer cervical. Este fato torna relevante a busca de um entendimento maior deste processo, como por exemplo, a predisposição imunológica do hospedeiro.

No presente estudo, a infecção por HPV e a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões cervicais apresentou associação com o polimorfismo -1082 G/G do gene da IL10, corroborando os achados de trabalhos prévios no qual o alelo G esteve associado à infecção viral e às lesões cervicais ^[11, 37]. Além disso, em 50,0% das lesões HSIL, o genótipo GG esteve presente. Estes resultados estão em concordância com os achados de Bermúdez-Morales *et al* (2008), no qual o genótipo GG também foi observado em 62,0% das HSIL e em 84,0% dos casos de câncer ^[37]. Outros estudos também relatam uma alta frequência do genótipo GG (IL10) nas amostras cervicais de câncer, bem como em outros tipos tumorais ^[23, 32, 34, 37].

A partir deste achados, poder-se-ia sugerir que a predisposição determinada geneticamente para a produção de altos níveis de IL-10 (GG) parece estar associada à infecção genital pelo HPV, mostrando a importância da resposta imunológica do hospedeiro no processo de infecção e na progressão das lesões cervicais pelo HPV.

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

8. ANEXOS

ANEXO I

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

PROJETO DE MESTRADO

**ANÁLISE DE UM POLIMORFISMO NO GENE DA INTERLEUCINA 10 (IL10)
EM LESÕES CERVICAIS CAUSADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

GABRIELA TONINI

ORIENTADORA: Dra. MARY CLARISSE BOZZETTI

PORTO ALEGRE, JULHO 2009

SUMÁRIO

1. CARACTERIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	82
2. OBJETIVOS.....	85
2.1 Objetivo Geral.....	85
2.2 Objetivos Específicos.....	85
3. EMBASAMENTO TEÓRICO.....	86
3.1 Epidemiologia do Câncer Cervical.....	86
3.2 Alterações celulares provocadas pelo HPV	87
3.3 Biologia Molecular do HPV	89
3.4 Co-fatores do HPV na oncogênese cervical	90
3.5 Sistema Imunológico e HPV.....	92
3.5.1 Antígeno Leucocitário Humano (HLA).....	92
3.5.2 Fator de Necrose Tumoral (TNF- α).....	94
3.5.3 Interferon – gama (INF- γ)	94
3.6 Interleucina 10 (IL10)	95
3.7 Vacina.....	97
4. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	99
5. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.....	103
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	104
7. RECURSOS.....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1. CARACTERIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus de DNA da família *Papillomaviridae* que foi descrito pela primeira vez em 1954. É o principal agente etiológico de lesões urogenitais tais como verrugas genitais, lesões planas e alterações estruturais no colo do útero, vagina e vulva, sendo considerado o principal fator envolvido no desenvolvimento da neoplasia cervical ou câncer do colo uterino (Bibbo & Silva Filho, 1998).

Atualmente, o HPV é a infecção viral sexualmente transmissível mais freqüente, atingindo cerca de 10,0 a 12,0% das mulheres com vida sexualmente ativa (Carvalho, 2000; NAUD, 1993). Em relação às mulheres jovens, entre 20 e 29 anos, sua prevalência é ainda maior, de 20,0 a 40,0% (Ferreira Santos, 2003).

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

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

Estima-se que a incidência em escala mundial seja cerca de 500.000 casos por ano, sendo a patologia responsável por 15,0% de todas as neoplasias invasoras diagnosticadas em

mulheres. Constitui-se um dos mais graves problemas de saúde pública, especialmente para os países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil, onde se estima que cerca de 40.000 casos novos surjam anualmente (Silva Silveira *et al*, 2005).

A implicação do HPV em praticamente todos os cânceres cervicais nos leva à investigação de outros fatores associados, pois o número de infecções é extremamente maior do que o número de casos de câncer cervical. Certamente, outros fatores associados também contribuem para a formação e progressão das lesões pré-malignas e do câncer cervical, uma vez que nem todas as mulheres infectadas pelo HPV de alto risco fatalmente desenvolverão câncer (Odunsi *et al*, 1995; Pinto *et al*, 2002).

A exposição ao fumo, mesmo sendo passiva, tem sido sugerida como fator relacionado a um aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical (Brinton *et al*, 1986; Pinto *et al*, 2002). A presença de substâncias carcinogênicas provenientes no cigarro na mucosa cervical tem sido descrita como possível explicação para essa associação epidemiológica.

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

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

Na genética médica, os marcadores têm uma ampla utilidade na avaliação da predisposição para diversos distúrbios, entre eles, o câncer cervical. Os polimorfismos têm

como principal valor o seu uso como “marcadores” genéticos para distinguir diferentes formas hereditárias de um gene (Nussabaum, Mcinnes, Willard, 2002).

Nesse estudo será avaliada a influência genética do polimorfismo (-1082) localizado no gene da IL10 no desenvolvimento de lesões cervicais, visto que, esta citocina é uma molécula importante na resposta imune contra infecções virais. Geneticamente determinadas, pode apresentar predomínio para padrão associado com a eliminação do HPV, ou associadas com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais (Fernandes *et al*, 2004).

O conhecimento de polimorfismos relacionados a lesões e ao câncer do colo uterino pode auxiliar no entendimento da variabilidade genética das populações e no desenvolvimento de métodos de prevenção, como novas vacinas e de programas de vigilância epidemiológica para o controle das doenças sexualmente infecciosas (DSI).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a frequência do polimorfismo presente na região promotora (-1082) do gene da IL10 e sua associação com a infecção genital pelo HPV.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos alelos encontrados no polimorfismo -1082A/G do gene da IL10 nas amostras investigadas.

- Verificar a possível associação do polimorfismo 1082A/G do gene da IL10 com a infecção genital pelo HPV (presença ou ausência do vírus, e presença de HPV de alto risco 16, 18 e 31).

- Verificar a possível associação do polimorfismo 1082A/G do gene da IL10 com o grau de lesões cervicais em mulheres infectadas pelo HPV.

3. EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1. Epidemiologia do Câncer Cervical

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

As lesões precursoras do câncer de colo uterino são de grande interesse científico, devido ao grande número de casos registrados mundialmente todos os anos. No Brasil, a estimativa que foi apresentada para o ano de 2008 mostrou 18.680 casos, com um risco estimado de 20 casos a cada 100.000 mulheres; no Rio Grande do Sul, para este mesmo ano, 5.620 casos foram registrados, e na capital, a estimativa foi de 28,17 casos para cada 100.000 mulheres. (INCA, 2008).

O desenvolvimento do câncer cervical e sua associação com o HPV estão bem estabelecidos, sendo este o principal fator para o desenvolvimento de câncer cervical. As taxas de aquisição para a infecção por HPV são elevadas, principalmente em adultos jovens com vida sexualmente ativa (Baseman *et al*, 2005).

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

O HPV 16 é um dos tipos de alto risco mais freqüente entre as mulheres, e também o mais comum entre os casos de câncer cervical, com taxas de 23,4% nas mulheres, sendo ainda

maior em adolescentes com idade média de 16-20 anos (HO *et al*, 1998; LIAW *et al*, 1999; Rabelo *et al*, 2003). O subtipo do HPV 18, também classificado de alto risco, apresenta uma prevalência de 7,3% em mulheres com idade em torno dos 16 anos e 7,2% em mulheres com idade ao redor de 25 anos (Baseman *et al*, 2005).

3.2. Alterações celulares provocadas pelo HPV

Quando o HPV infecta uma célula, ele pode ser eliminado, ficar latente ou produzir infecção clínica ou sub-clínica ativa ou pode, ainda, integrar seu genoma ao da célula hospedeira imatura, impedindo sua diferenciação e maturação de forma normal (Martins & Pereyra, 2000).

A infecção clínica pode ser diagnosticada pelos métodos tradicionais morfológicos e apresenta como característica efeitos citopáticos específicos, visíveis em exame citopatológico e em alterações de tecido, identificadas pela colposcopia e histopatologia. A fase proliferativa do vírus é representada pelas verrugas e lesões planas que apresentam um tropismo para o epitélio escamoso do colo uterino e estas são classificadas morfológicamente como lesões de baixo grau (Villa, 1997).

A partir de uma possível integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira podem aparecer lesões de maior grau de transformação morfológica, classificadas como lesões de alto grau e consideradas como lesões precursoras do câncer de colo uterino (Villa, 1997).

A infecção persiste por 10 a 20 anos permitindo, desta forma, o desenvolvimento de alterações genéticas adicionais e progressão de lesões de baixo, moderado e alto grau para câncer invasivo. As alterações provocadas pela integração do vírus ao DNA da célula

hospedeira podem persistir em média por 15 anos, através de alterações genéticas adicionais (Martins & Pereyra, 2000).

As alterações intraepiteliais cervicais podem ser consideradas duas entidades histológicas distintas: HSIL (High Squamous Intraepithelial Lesion - NIC II e NIC III) e LSIL (Low Squamous Intraepithelial Lesion - NIC I e alterações celulares devidas à infecção pelo HPV). As lesões consideradas HSIL se encontram associadas, em sua maioria, aos subtipos oncogênicos do HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68). A presença desses subtipos oncogênicos do HPV na cérvix uterina está relacionado à persistência e progressão das NIC, assim como ao desenvolvimento de câncer cervical (Ho *et al*, 1995; Lungu *et al*, 1992; Schiffman *et al*, 1993). Segundo Silva e colaboradores (2006), os grupos que têm maior probabilidade de desenvolver NIC são aquelas pacientes portadoras de HPV de alto risco, com antecedente de DST, que tiveram início precoce da relação sexual e as tabagistas.

O carcinoma do colo uterino é uma doença que apresenta um espectro de evolução, iniciando com o aparecimento de uma lesão precursora que pode progredir no decorrer dos anos. As lesões precursoras ocorrem, principalmente, em mulheres jovens, com maior incidência em torno dos 30 anos. Mundialmente, tem-se observado um aumento da frequência destas alterações em torno dos 20 anos e, ocasionalmente, em faixas etárias ainda mais jovens (Herbst *et al*, 1992).

Para as pacientes que desenvolvem alterações intraepiteliais cervicais deve haver um esforço maior de programas de prevenção, para identificá-los e, a seguir, garantir atendimento diferenciado com métodos de diagnóstico e aconselhamento, objetivando evitar o surgimento ou a progressão dessas lesões.

3.3. Biologia Molecular do HPV

O genoma viral do HPV é constituído por uma molécula de DNA fita dupla, circular de 8.000 pares de bases (pb). São identificados por três regiões séricas: região precoce (*early*, E) que possuem oito regiões conhecidas como ORFS (*Open Reading Frames*) um complexo de proteínas funcionais codificadas pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e que estão envolvidas no controle da replicação e transcrição viral durante o estado epissomal (Münger *et al*, 2004).

As proteínas dos genes E1 e E2 desempenham importantes funções na replicação viral; a proteína E4 age desestabilizando os filamentos intermediários das camadas superiores das células do epitélio escamoso e da pele, facilitando assim, a liberação do vírus; já a proteína E5 modula os processos de divisão celular a partir da membrana celular (MÜNGER *et al*, 2004). As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 exercem funções na formação de tumores (Janicek *et al*, 2001; Münger *et al*, 2004).

A região de expressão tardia (*late*, L) que compõem o capsídeo viral são codificadas por L1 e L2 (Münger *et al*, 2004). A região reguladora, denominada de *upstream regulatory region* (URL), situa-se entre L1 e E6 e detêm a origem da replicação, representando cerca de 10,0 % do genoma viral total (Chan *et al*, 1995).

A característica mais específica do HPV de baixo risco é que na maioria dos tumores benignos o genoma viral é preservado como DNA epissomal (que não se integra ao genoma do hospedeiro) (Thorland *et al*, 2003; Ziegert *et al*, 2003).

A integração ocorre freqüentemente próxima a locais frágeis do genoma humano, porém, não existem evidências de locais específicos para essa integração (Thorland *et al*, 2003; Ziegert *et al*, 2003).

Em lesões malignas associadas aos HPV 16 e 18, contudo, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros. Para integrar-se ao DNA nuclear, é necessário que haja uma quebra no genoma viral. Esta separação não ocorre de forma aleatória, pois a maioria ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus, resultando na perda de função desses dois genes, acompanhada pela integração do DNA do viral ao genoma da célula hospedeira, que passa a expressar os oncogenes virais E6 e E7 (Kaufman *et al*, 2000; Burd, 2003).

As proteínas codificadas pelo genoma do HPV, principalmente as produzidas pela expressão dos genes E6 e E7 estão relacionadas com a carcinogênese mediada pelo HPV, pois são capazes de inativar as proteínas p53 e pRb, responsáveis pelo controle do crescimento celular. Em particular, foi demonstrado que a proteína E6 interage com a proteína p53 e a proteína E7 com a proteína pRb, causando desequilíbrio no ciclo celular (Kelley *et al*, 2005). Essas duas proteínas são produtos genes supressores de tumor que regulam o crescimento da célula, e previnem os acontecimentos que levam a transformação maligna das células, interrompendo sua divisão e proliferação (Beutner & Tying, 1997; Pinto *et al*, 2002).

A eliminação desse controle de ciclo celular do DNA celular (p53 e pRb) pode provocar um acúmulo de mutações nas células que expressam tais oncoproteínas, resultando em um fenótipo alterado, além disso, a integração na célula hospedeira pode gerar mutações que induzem a formação tumoral. Acredita-se que o potencial oncogênico desses vírus seja, em parte, devido as suas integrações sendo processos moleculares relacionados ao surgimento do câncer pelo HPV, especialmente se comparado aos tipos de baixo risco que não integram o seu genoma ao do hospedeiro (Rapp & Chen, 1998).

3.4. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical

Entre os fatores de risco para o surgimento do câncer cervical uterino e de lesões precursoras, a infecção pelo HPV tem sido estabelecida dentro dos critérios de causalidade.

O desenvolvimento do câncer cervical é quase improvável na ausência da infecção pelo HPV e de fatores coexistentes que fornecem a persistência da infecção (Silva *et al*, 2006).

Diversos fatores sócio-comportamentais podem estar relacionados ao desenvolvimento de uma lesão precursora do câncer cervical associada ao HPV. Entre esses se destacam o comportamento sexual, a idade precoce da atividade sexual, multiplicidade de parceiros, multiparidade, tabagismo, situação sócio-econômica, o uso prolongado de contraceptivos orais, precários hábitos de higiene pessoal, história de doenças sexualmente transmissíveis e fatores imunológicos (Villa, 1997; Perez, 2001). Dentre estes co-fatores citados, o elevado número de parceiros sexuais representa o mais evidente para a infecção pelo HPV (Burk *et al*, 1996).

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

Entretanto, em relação ao uso de contraceptivos orais, é difícil avaliar sua relação com a infecção pelo HPV. Estudos demonstraram que o uso de contraceptivos orais teria uma associação com os subtipos de HPV de alto risco 16, 18 e 31. Além disso, hormônios esteróides na forma de contraceptivos comumente administrados durante a fase reprodutiva parecem aumentar a atividade transformadora dos oncogenes do HPV e interferir na resolução eficiente de lesões causadas pelo vírus na cérvix de mulheres jovens (Wang *et al*, 2003).

A resposta imune do hospedeiro também é um fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. A prevalência da infecção pelo

HPV bem como a progressão para lesões displásicas ou mesmo o câncer é mais freqüente em mulheres imunodeficientes, quando comparado a mulheres imunocompetentes (Anschau *et al*, 2002).

A participação exata de cada um dos fatores abordados acima e quais os elementos essenciais para o desencadeamento do processo carcinogênico, ainda são pontos que necessitam de mais estudos.

3.5. Sistema Imunológico e HPV

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

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

3.5.1. Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

Muitas pesquisas vêm obtendo resultados no que diz respeito aos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), principalmente os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA) que desempenham uma importante função na regulação do sistema imune.

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

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

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

O envolvimento de alelos na proteção contra o desenvolvimento de lesões cervicais também foi relatado. Segundo um estudo realizado por Hildesheim e colaboradores (2002) foi verificado um efeito protetor dos alelos HLA DRB1*13/DQB1*0603 de classe II, sendo estes, os achados mais consistentes na literatura.

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

3.5.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) localiza-se no cromossomo 6, constituinte do MHC, entre as regiões HLA classe I e HLA classe II (Deshpande *et al*, 2005). No que diz respeito ao HPV, ele está relacionado com o controle direto e indireto na infecção; no controle direto da infecção, o TNF- α induz a apoptose nas células infectadas pelo vírus e nas células tumorais, estimulando assim uma resposta inflamatória através do aumento da regulação das moléculas de adesão vascular e de citosinas, contendo assim, o crescimento da infecção pelo HPV e a regulação do gene de transcrição do HPV. Em relação ao controle indireto no desenvolvimento da infecção pelo HPV, a regulação dos níveis de TNF- α , localizados e sistêmicos, ocorre em níveis genéticos. (Deshpande *et al*, 2005).

Um estudo que investigou o efeito dos polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs), na região promotora do gene, constatou que SNPs nas posições -307 [17,18], -375 [19], -863 [18, 20] e -857 [20] afetam a transcrição do TNF- α . Alterações nos níveis de TNF- α podem influenciar na resposta imune a diversos patógenos que estão associados com a susceptibilidade para doenças infecciosas. Foi demonstrada a associação de um polimorfismo de microsatélite, TNF- α -11, com infecção pelo HPV-16 e com neoplasia intraepitelial cervical (NIC), quando combinados com os alelos do gene HLA-DQB. (Deshpande *et al*, 2005).

3.5.3. Interferon – gama (INF- γ)

Os linfócitos T são divididos em células Th1, que produzem IL-2, IFN- γ e TNF- β , e células Th2, que produzem IL-4, IL-5, IL10 e IL-13. Sabe-se que o IFN- γ aumenta a imunidade celular e estimula a imunidade humoral. A avaliação dos padrões de citocina na

infecção associada ao HPV revela que alterações no equilíbrio das mesmas estão relacionadas ao desenvolvimento dessa infecção. (Maciag & Villa, 1999).

Vários fatores regulam o equilíbrio entre Th1 e respostas Th2, tal como citocinas produzidas por células de imunocompetentes. Enquanto citocinas Th1 estimulam a resposta imune celular, as citocinas Th2 favorecem a repressão da resposta celular. (ABBAS *et al*, 1996). Embora evidências experimentais indiquem que moléculas de MHC poderiam participar na regulação e no equilíbrio de Th1 e Th2, o papel destas moléculas de regulação ainda não está claro (Hanson *et al*, 1999).

Estudos comprovam que vários polimorfismos no gene do IFN- γ estariam associados com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da carcinogênese cervical (Hung-Cheng LAI *et al*, 2004).

3.6. Interleucina 10 (IL10)

As citocinas são moléculas importantes na resposta imune contra infecções virais. Geneticamente determinadas, podem apresentar predomínio para padrão associado com a eliminação do HPV, ou associadas com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais, como a IL10. Avaliações da produção de citocinas pelos linfócitos T do sangue periférico têm sido realizadas em mulheres apresentando a infecção pelo HPV e portadoras de lesões cervicais de diferentes graus de severidade. Estes estudos sugerem que o desenvolvimento das lesões cervicais está associado, preferencialmente, ao padrão local de citocinas imunoinibitórias, como a IL10 e não a um padrão de resposta imune pró-inflamatória, que seria mais apropriada contra infecções virais e tumores (Fernandes *et al*, 2004).

Sabe-se que existem três SNPs descritos na região promotora do gene da IL10, nas posições -1082, -819 e -592. A presença do nucleotídeo A na posição -1082 está correlacionada com baixa produção da IL10. Os polimorfismos do gene da IL10 da região promotora parecem ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL10. A capacidade de secretar diferentes níveis de citocinas, herdadas geneticamente, parece ser relevante na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais. No entanto, são raros os estudos avaliando polimorfismos de citocinas nas lesões cervicais (Bidwell *et al*, 1999; Haukim *et al*, 2002).

Um estudo avaliando o polimorfismo -1082 do gene da IL10 demonstrou que as pacientes portadoras do alelo G e com câncer cervical parecem estar imunogeneticamente predispostas a produzir altos níveis de IL10. Além disso, foi observado que a prevalência do alelo associado (-1082 A) à baixa produção foi menor no grupo de pacientes com câncer cervical quando comparados com o de mulheres saudáveis, no qual não foram observados alelos para alta produção. Estes resultados sugerem que a habilidade, geneticamente determinada, de produzir altos níveis da IL10 pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer cervical (Stanczuk *et al*, 2001).

Segundo Gianini *et al*, (2002) níveis aumentados de IL10 em mulheres com lesões cervicais infectadas pelo HPV, em relação às mulheres saudáveis apresentando colos uterinos normais, indicam a ocorrência de imunossupressão local, visto que a IL10 estaria inibindo a apresentação de antígenos, a função das células T citotóxicas, a proliferação das células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas inibições contribuem para a instalação e o desenvolvimento de lesões cervicais após infecção pelo HPV.

Acredita-se que a presença da infecção pelo HPV-16, tipo viral predominantemente encontrado em estudos brasileiros, parece influenciar na produção da IL10, aumentando sua

produção em mulheres que geneticamente estariam predispostas a produzir níveis reduzidos dessa citocina, deixando-as mais susceptíveis a instalação e progressão de lesões cervicais, precursoras do câncer do colo uterino (Fernandes *et al*, 2004).

3.7. Vacina

Uma vez que o HPV é considerado o principal responsável pelo desenvolvimento do câncer cervical sendo assim, duas formas de prevenção são propostas: o rastreamento das lesões precursoras com testes diagnósticos sensíveis ou a imunização contra o HPV (Franco & Harper, 2005). Embora a incidência do câncer genital venha diminuindo devido aos métodos de rastreamento, seu custo ainda é elevado (Soper, 2006). Logo, a prevenção das doenças relacionadas ao vírus deveria ser disponível sob a forma de vacinação.

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

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

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

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

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

4. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

4.1. Delineamento

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

Esse trabalho é parte do Projeto Associação entre Polimorfismos de Genes do Sistema Imunológico (Il-10, Tnf- α) e Infecção por HPV nos diferentes graus de Lesões Cervicais” (Protocolo nº. 25.70.06.0401), do grupo de pesquisas em Bioanálises, já aprovado pelo Comitê de Ética da Feevale. O referido projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP – GHC) sobre o protocolo nº. 112/2002.

4.2. Amostras

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

Serão analisados dois grupos: uma amostra de mulheres HPV positivas e com exame citopatológico alterado e, uma amostra de mulheres com resultado negativo para HPV pelo teste de PCR e resultado normal para o teste citopatológico, em amostras de lavado cérvico-vaginais.

4.2.1 Amostras cérvico-vaginais

As amostras cérvico-vaginais para a pesquisa de DNA-HPV foram coletadas da ectocérvice previamente higienizada com gaze para remoção do excesso de muco e realizada a coleta de três *swabs*, utilizando a escova citológica (*cytobrush*), para a obtenção de uma quantidade representativa de células.

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

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

4.3 Extrações

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

4.3.1 Extração de DNA das amostras de lavado cérvico-vaginais

Foi utilizado o protocolo de extração de DNA em amostras cérvico-vaginais anteriormente descrito por Bauer *et al*, 1993 e Coutlée *et al*, 2002.

4.4. Reação de Amplificação (PCR)

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

O DNA das amostras clínicas será submetido à amplificação pela metodologia de ARMS – PCR (*Amplification Refractory Mutation System*), uma técnica muito utilizada para determinar vários tipos de polimorfismos nos diferentes alelos dos genes da IL10, do TNF- α e IFN γ . Acredita-se que esta metodologia tenha muitas vantagens, além de ser precisa, rápida e confiante para a determinação de genótipos de um grande número de amostras de DNA para os diversos polimorfismos de citocinas (Perrey *et al*, 1999).

A técnica também apresenta benefícios em estudos de susceptibilidade e/ou prognóstico de doenças genéticas. Será utilizado no presente estudo para o polimorfismo da IL10 (-1082A/G) a seqüência de *primers* a seguir:

IL10 (-1082)	<i>Primer</i> Genético (antisense):	5'-cagtgccaactgagaatttgg-3'
IL10 (-1082)	<i>Primer</i> G (sense):	5'-ctactaaggcttctttgggac-3'
IL10 (-1082)	<i>Primer</i> A (sense):	5'-actactaaggcttctttgggaa-3'

O tamanho do produto amplificado será de 258 pb.

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

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

O tamanho do produto amplificado será de 429 pb.

Nas reações será realizada uma reação de PCR para cada alelo investigado, utilizando

primers de controle interno para cada reação.

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

4.5. Análise Estatística

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

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

O software SPSS[®] (versão 17.0) será utilizado para estas análises.

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

5. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Ao término deste estudo, espera-se colaborar para o entendimento da relação entre o polimorfismo do gene da IL10 e as lesões encontradas em pacientes infectadas pelo HPV, mostrando a importância desse conhecimento para pesquisas futuras e manejo dessas pacientes.

Além disso, o conhecimento da distribuição dos subtipos oncogênicos mais frequentes e suas variações poderá ter um impacto importante sobre a implementação de futuros programas de vacinação para esse vírus e programas de vigilância epidemiológica para o controle das doenças sexualmente infecciosas (DSI).

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

		Jan-Fev-Mar	Abr-Mai-Jun	Jul-Ago-Set	Out-Nov-Dez
Trabalho de campo	2003-2005	2008	2008	2009	2009
Revisão da Literatura		X	X	X	
Redação projeto		X	X		
Defesa projeto				X	
Análise dos dados			X	X	
Redação dissertação e artigo			X	X	
Defesa fechada					X
Defesa final					X

7. RECURSOS

Os materiais necessários para a realização deste projeto encontram-se discriminado na Tabela 1.

Tabela 1 – Discriminação do material de pesquisa

	Quantidade	Valores em R\$
Material de Escritório		
Papel Chamex A-4 Alcalino 75 g/m ²	500	15,00
Cartucho preto	01	50,00
Cartucho colorido	01	85,00
Subtotal		150,00
Material de Laboratório¹		5.000,00
Par de primers	01	200,00
Taq DNA polimerase	02	250,00
Conjunto de dNTPs <i>Invitrogen</i>	01	850,00
Agarose – 500 g	01	1.800,00
50 bp DNA Ladder, 50ug, <i>Invitrogen</i>	01	475,00
100 bp DNA Ladder, 50ug, <i>Invitrogen</i>	01	445,00
N’N’ Methylenebisacrylamide 100G, <i>Invitrogen</i>	01	340,00
Brometo de Etídio 10mg/10ML, <i>Invitrogen</i>	01	187,00
TRIS, ultra-puro, 1KG, <i>Invitrogen</i>	01	282,00
EDTA, ultra-puro, 500G, <i>Invitrogen</i>	01	327,00
Materiais plásticos (ponteiras e eppendors) e tubos PBS	01	2.100,00
Subtotal		7.506,00
Material Bibliográfico		100,00
Transporte		300,00
Máquina de PCR²		25.000,00
Total		33.056,00

¹ Todo o material de laboratório utilizado será fornecido pelo Centro Universitário Feevale através do Grupo de Pesquisa em Bioanálises liderado pela professora Miriam Alice Frantz e colaboradores.

² A Máquina de PCR será fornecida pelo Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Feevale.

Os demais valores serão custeados pela aluna proponente do projeto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A, Murphy Km & Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793.
2. Anschau F, Schmitt VM, Gonçalves Mag. O papilomavírus humano nas lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina: aspectos imunológicos e moleculares. *Revista de Medicina da PUCRS* 2002; vol. 12 nº.2: 148-154.
3. Ault KA. Vaccines for the prevention of human papillomavirus and associated gynecologic diseases: a review. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2006; 61:26-31.
4. Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutation Research* 2003; 544(2-3):375-383.
5. Bauer HM, CE Greer R, Mannos MM. Determination of genital HPV infection using consensus PCR. In: Herrington CS, McGee JD editores. *Diagnostic molecular pathology: a practical approach*. England: Oxford University Press 1993. P.224.
6. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32:16-24.
7. Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *American Journal of the Medical Sciences* 1997; 102: 9-15.
8. Bibbo M & Silva Filho AM. *Lesões Relacionadas à Infecção por HPV no Trato Anogenital*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 1998.
9. Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement. *European Journal of Immunogenetics* 1999; 26: 135-223.

10. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16: 1-17.
11. Burger MP, Hollema H, Gouw AS, Pieterswj. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *British Medical Journal* 1993; 306(6880): 749-752.
12. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M et al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *Journal of Infectious Diseases* 1996; 174(4): 679-689.
13. Brinton LA, Shairer C, Haenszel W, Stalley P et al. Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *Journal of the American Medical Association* 1986; 255(23): 3265-3269.
14. Carvalho, Julio José M.; OYAKAWA, Nadir. I Conselho Brasileiro de HPV-Papilomavírus humano 2000 São Paulo: Editora BG cultural.
15. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *The Journal of Virology* 1995; 69(5): 3074-3083.
16. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Journal Clinical Pathology* 2005; 58: 894-895.
17. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. *Journal Clinical Microbiology* 2002; 40(3): 902-907.
18. Dao DD, Sierra-Torres CH, Robazetti SC, Gomez MN, König R, Lema C, Lester LJ, Au WW, Tyring SK. HLA-DQB1 and cervical cancer in Venezuelan women. *Gynecologic oncology* 2005; 96(2):349-354.

19. Deshpande A, Nolan J, White P, Valdez Y, Hunt W, Peyton, Wheeler C. TNF- α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16-Associated Cervical Câncer. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 191:969-76.
20. Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Quintana SM, Duarte G, Donadi EA. Influence of the HPV-16 on IL10 intralesional production in immunogenetically responsive women carrying HIV-1 infection. *DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 2004; 16(3): 67-72.
21. Santos ALF et al. Desempenho do exame citopatológico com revisão por diferentes observadores e da captura híbrida II no diagnóstico da neoplasia intraepitelial cervical graus 2 e 3. *Caderno De Saúde Pública* 2003; 19 (4): 1029-1037.
22. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine* 2005; 23:2388-2394.
23. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *International Journal of Cancer* 2002; 97(5): 654-659.
24. Gonik B. Strategies for Fostering HPV Vaccine Acceptance. *Infections Diseases Obstetrical and Gynecological* 2006; 14(1): 36797.
25. Hanson MS, Cetkovic-Cvrlje M, Ramiya VK, Atkinson MA, Maclaren NK, Singh B, Elliott JF, Serreze DV & Leiter EH. Quantitative thresholds of MHC Class II I-E expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *Journal of Immunology* 1999; 157: 1279-1287.
26. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity* 2002; 3 (6): 313-330.
27. Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Jornal of the National Cancer Institute* 2000.

28. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9447):1757-1765.
29. Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomedicine Pharmacotherapy* 2000; 54(1):54-59.
30. Herbst AL. Intraepithelial neoplasia of the cervix In: *Comprehensive Gynecology*. St Louis, Mosby Year Book 1992: 821-859.
31. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of Cervical Cancer: a review. *Virus Research* 2002; 89 (2): 229-240.
32. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338(7): 423-428.
33. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R & Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87:1365-1371.
34. Hung-Cheng LAI , Cheng-Chang Chang, Ya-Wen Lin , Su-Feng Chen, Mu-Hsien Yu , Shin Nieh , Ta-Wei Chu, Tang-Yuan Chu. Genetic polymorphism of the interferon- γ gene in cervical carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 2004; volume 113(5): 712-718.
35. Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: Prevetion, Diagnosis and Therapeutics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2001; 51(2): 92-114.
36. Kahn JA, Bernstein DI. Human papillomavirus vaccines and adolescents. *Journal of Obstetrics Gynecology*. 2005; 17(5):476-482.
37. Kaufman RH, Adam E, Vonka V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2000; 43: 363-380.

38. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *Journal of Virology* 2005; 79: 3737-3747.
39. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *British Journal of Cancer* 2000; 82(7): 1332-1338.
40. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *Institute National Cancer* 1999; 91(11): 954-960.
41. Linhares AC, Villa LL. Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV). *Jornal de Pediatria* 2006; vol.82 nº. 3.
42. Lorenzato F, Singer A, Mould T, Santos LC, Maia A, Cariri L. Cervical cancer detection by hybrid capture TM and evolution of local risk factors. *International Journal of Gynecology e Obstetrics* 2001; (73) 41-46.
43. Lungu O, Sun XW, Felix J, Richart RM, Silverstein S & Wright TC. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. *The Journal of the American Medical Association* 1992; 267: 2493-2496.
44. Maciag PC, Schlecht NF, Sousa PSA, Franco EL, Villa L, Petzl-Erler, ML. Major histocompatibility complex classe polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian woman. *Cancer Epidemiology, biomarkers e prevention* 2000; (9): 1183-1191.
45. Maciag PC, Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; volume 32(7) 915- 922.
46. Martins NV, Pereyra EG. *Conhecendo o HPV: patologia do trato genital inferior, colposcopia e cirurgia de alta frequência*. 1. ed. São Paulo: Frôntis Editorial; 2000.

47. Miller AS, Dykes DD, Olesky HF. Simple salting-out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1255.
48. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Haya Kawa H et al. Mechanisms of human papillomavirus- Induced Oncogenesis. *The Journal of Virology* 2004; 78(21): 11451-11460.
49. Naud, Paulo (colab). DST e AIDS. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1993: 118-132.
50. Nussbaum R, Mcinnes R, Willard H. *Genética Médica*. Editora Guanabara Koogan S.A. 2002; 6ª edição: 244-254.
51. Odunsi K, Terry G, Ho L, Bell J, Cuzick J, Ganesan TS. Association between HLA DQB1* 03 and cervical intra-epithelial neoplasia. *Molecular Medicine* 1995; 1(2):161-171.
52. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL10, TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 gene polymorphisms. *Transplant Immunology* 1999; 7: 127-128.
53. Perez LA. Genital HPV: Links to Cervical cancer, treatment, and prevention. *Clinical & Laboratory Science* 2001; 14(3): 183-186.
54. Pinto AP, TULIO S, CRUZ OR. Hpv cofactors in cervical carcinogenesis. *Revista Associação Médica Brasileira* 2002; 48: 73-82.
55. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffman D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogens in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89(12): 868-873.
56. Rabelo Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP et al. Human Papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial Neoplasia III and Invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2003; 98(2): 181-184.
57. Rapp L, CHEN JJ. The papillomavirus E6 proteins. *International Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 1998; 1378 (1):1-19.

58. Silva Silveira LM; Araújo Silva H; Paiva Pereira I; Furtado Pinheiro VM. Cytomorphologic criteria for the diagnosis of HPV and its relation with the gravity of cervical intraepithelial neoplasia. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2005; vol. 37(2): 127-132.

59. Silva TT, Guimarães ML et al. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intraepitelial. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria* 2006. Vol 28 n5.

60. Soper D. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2006; 14(1): 83-84.

61. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of National Cancer Institute* 1993; 85: 958-964.

62. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL10 production. *International Journal of Cancer* 2001; 94(6): 792-794.

63. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV-16 intergrations in cervical tumors. *Oncogene* 2003; 22(8): 1225-1237.

64. Vargas, V.R.A. & Dalla Corte, E.A. Prevalência das lesões intra – epiteliais escamosas em exame citológico numa determinada população de Santo Ângelo, RS. Monografia Especialização Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Regional Sul 2002. Porto Alegre.

65. Villa LL. Human papillomavirus and Cervical Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 71: 321-341.

66. Wang SS, Schiffman M, Shields TS, Herrero R et al. Seroprevalence of human papillomavirus 16, 18, 31 and 45 in population-based cohort of 10.000 women in Costa Rica. *British Journal of Cancer* 2003; 89(7): 1248-1254.

67. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *The American Osteopathic Association* 2006; 106(3 Suppl 1):S2-8.

68. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisuljov F et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogenes* 2003; 22(25): 3977-3984.

69. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, Van Der Steege G, De Vries EG, Te Meerman GJ, Van Der Zee AG. Analysis of the HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *Journal of Medical Genetics* 2005; 42(8): e49.

ANEXO II

GHC	GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO
	HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A. - CNPJ 92.787.118/0001-20 - Av. Francisco Trein, 596 - F.341-1300 - Porto Alegre - RS - CEP: 91350-200
	HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO - (Unidade Pediátrica do Hospital Nossa Senhora da Conceição S.A.)
	HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A. - CNPJ 92.787.126/0001-76 - Rua Domingos Rubbo, 20 - F.361-3366 - Porto Alegre - RS - CEP: 91040-000
HOSPITAL FÊMINEA S.A. - CNPJ 92.693.134/0001-53 - Rua Mostardeiros, 17 - F.311-9698 - Porto Alegre - RS - CEP: 91430-001	
Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90	

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

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.

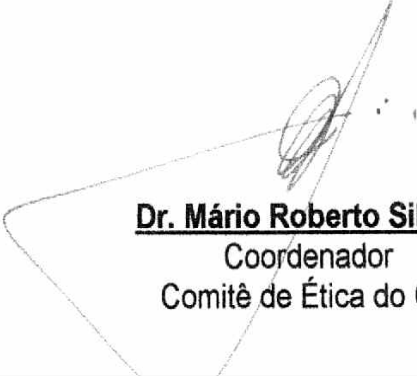
O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

Nº 112/2002

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

Pesquisador (es): Mary Clarisse Bozzetti

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


Dr. Mário Roberto Silveira
Coordenador
Comitê de Ética do GHC

ANEXO III

Termo de Consentimento Informado

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

Protocolo nº: _____

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

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

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

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

Objetivos do estudo:

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença

deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

Procedimentos:

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

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

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

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas poderá ser no mínimo

semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

Riscos e Desconfortos:

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

Benefícios:

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

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

Compensação financeira:

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

Confidencialidade:

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

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:

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

Em caso de danos:

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

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

Participação voluntária:

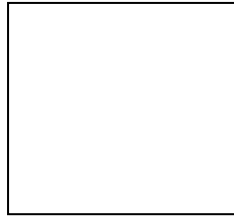
A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

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

O Significado de Sua Assinatura:

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

VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO



Carimbo do estudo

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

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

Data:

Assinatura do coordenador do estudo

Data:

Coordenadora

Dr^a Mary Clarisse Bozzetti

Rua Ramiro Barcelos 2600, 4º andar Sala 417 D

Bairro Santana, Porto Alegre CEP 90035-003

ANEXO IV

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

I. QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

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

QUEST _ _ _ _

1. Nome: _____

2. Endereço: _____

3. Telefone de contato: _____

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

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

6. Idade: __ (em anos) IDADE: __

7. Estado marital: ESTMARIT: _

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

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

(4) Divorciada/desquitada (5) Separada

(6) Viúva

8. Ocupação: _____ OCUP: __

9. Cor da pele:

(1) branca (2) negra (3) mulata (4) amarela COR: _

10. Escolaridade: ESCOLAR: _

(1) analfabeta (2) primeiro grau incompleto

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

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

(7) terceiro grau completo (9) ignorado

11. Número de pessoas que residem na casa: __ PCASA: __

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

13. Você fuma? (1) Sim (2) Não FUMO: _

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

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

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

16. Idade da primeira menstruação: __ MENARCA: __

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

18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não MENOP1: _

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

19. Se não, há quanto tempo? __ (em anos) MENOP2: __

20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal? MENOP3: _

(1) Sim (2) Não

21. Se sim, por quanto tempo? __ (em anos) MENOP4: __

22. Qual a idade da primeira relação sexual: __ SEXARCA: __

23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: __ PARSEX1: __

24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: __ PARSEX2: __

25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional? ACO1: _

(1) Sim (2) Não

26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou? ACO2: __

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

- (2) Condon (camisinha); (4) Diagrama;
 (5) “Camisinha” feminina; (6) DIU/Mirena;
 (7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;
 (10) Não se aplica; (11) Outro: _____

27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não GESTA1: _

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

28. Se sim, quantas vezes? __ GESTA2: __

29. Que idade tinha na primeira gestação? GESTA3: __

30. Quantos filhos nasceram vivos? FVIVOS: __

31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não ABO1: _

32. Se sim, quantos? __ ABO2: __

33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças?

(1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe

Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): _ COND: _

AIDS/ HIV positiva: _ HIV: _

Sífilis: _ SIFILIS: _

Gonorréia: _ GONO: _

Candidíase genital: _ CANDIDA: _

Clamídia genital: _ CLAMIDIA: _

Herpes genital: _ HERPES: _

Outra, qual?: _____ OUTDST: _

34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? TRAT1: _

35. Se sim, qual? _____ TRAT2: _

36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes

doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe

Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais):	CONDIM: _
AIDS/ HIV positivo:	HIVM: _
Sífilis:	SIFILISM: _
Gonorréia:	GONOM: _
Candidíase genital:	CANDIDAM: _
Clamídia genital:	CLAMIDIAM: _
Herpes genital:	HERPESM: _
Outra, qual?: _____	OUTDSTM: _
37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento?	TRATM1: _
38. Se sim, qual? _____	TRATM2: _
39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe	CP1: _
40. Se sim, qual a data do último exame? ____ / ____ (mm/aaaa)	DATCP: _ / _
41. Você costuma realizar auto-exame de mamas?	MAMA1: _
(1) Sim (2) Não	
42. Se sim, com que frequência?	MAMA2: _
(1) diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: _____	
43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde?	
(1) Sim (2) Não (9) Não sabe	
Doença cardiovascular (HAS, DIC):	HDCV: _
Lesões pré-invasivas de colo de útero:	HLPCU: _
Doença endócrino-metabólica (diabetes):	HDEM: _
Doença Respiratória (asma, dpoc):	HDR: _
Doença psiquiátrica (depressão):	HDP: _

Câncer ginecológico: _	HCAG: _
Outro tipo de câncer: _	HC: _
44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não	TRATPS1: _
45. Se sim, qual o tratamento? _____	TRATPS2: _ _
46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou teve algum dos seguintes problemas de saúde? (1) Sim (2) Não (9) Não sabe	
Doença cardiovascular (HAS, DIC): _	HFDCV: _
Lesões pré-invasivas de colo de útero: _	HFLPCU: _
Doença endócrino-metabólica (diabetes): _	HFDEM: _
Doença Respiratória (asma, dpoc): _	HFDR: _
Doença psiquiátrica (depressão): _	HFDP: _
Câncer ginecológico: _	HFCAG: _
Outro tipo de câncer: _	HFC: _
AIDS(HIV positivo): _	HFAIDS: _
47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o este problema de saúde? (1) Sim (2) Não	TRATPSF1: _
48. Se sim, qual o tratamento? _____	TRATPSF2: _ _
49. História de óbito na família nos últimos cinco anos? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe	ÓBITOF: _
50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: _ _ (anos)	OBFIDAD: _ _
51. Se sim, qual a causa da morte? _____	CAUSAOFB: _ _

PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

II. QUESTIONÁRIO DE DADOS DO EXAME E COLETA DE MATERIAL

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

QUEST _ _ _ _

1. Nome: _____

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

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

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado do CP?

CP: _ _

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

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

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

Coleta de material para PCR (PCR):

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da PCR (HPV-DNA)?

HPVDNA: _

(1) Positiva (2) Negativa

Se positiva, qual o tipo de HPV identificado? _____ **THPV:** _

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

(1) Sim (2) Não, porque? _____

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? _____

Resultado da sorologia para o HPV?

SOROHPV: _

(1) Positiva (2) Negativa

Foi indicado colposcopia?

(1) Sim (data: _____) (2) Não

Foi realizada colposcopia?

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

Resultados da colposcopia?

COLPO: _

(1) Anormal com realização de biópsia;

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

(3) Normal