UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - DERMATOLOGIA

FERNANDO AUGUSTO MIRANDA DA COSTA

**Resposta imune *in vitro* aos antígenos de
Papilomavírus Humano
(HPV) em homens na cidade de São Paulo, Brasil.**

**São Paulo
2013**

FERNANDO AUGUSTO MIRANDA DA COSTA

**Resposta imune *in vitro* aos antígenos de
Papilomavírus Humano
(HPV) em homens na cidade de São Paulo, Brasil.**

**Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Dermatologia
Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb**

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Fernando Augusto Miranda da

Resposta imune *in vitro* aos antígenos de Papilomavirus Humano (HPV) em
homens na cidade de São Paulo, Brasil / Fernando Augusto Miranda da Costa. --
São Paulo, 2013.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Dermatologia.

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb.

Descritores: 1.Infecções por papillomavirus 2.Papillomavirus humano 16
3.Equilíbrio Th1-Th2 4.Células Th17

USP/FM/DBD-263/13

**Dedico esta tese à minha família,
Vanessa e Giovanna, que estiveram ao
meu lado em todos os momentos.**

À meus pais.

À minha tia Ivone (*In memorian*).

Aos meus familiares

Todo carinho e agradecimento a vocês.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Por me proporcionar saúde para realizar e alcançar todos os meus objetivos.

Agradeço, sem medidas, à minha família: Minha esposa, Vanessa e nossa filha, Giovanna. Sei que foi dura a caminhada, as várias horas longe de casa, as madrugadas estudando, mas com vocês ao meu lado, a caminhada foi menos árdua. Obrigado por serem a família amorosa e que apoiaram todos os meus planos. Amo vocês. Vocês são a minha vida!

Agradeço aos meus pais. Sem vocês nada disto seria possível. Cada esforço da parte de vocês, não é nem metade do que eu poderia retribuir. Obrigado por me fazer o homem que hoje eu sou.

Agradeço à toda a minha família. Meus irmãos, tios, tias, primos, primas, sogros, cunhados que sempre torceram e rezaram pela minha vitória. Não há palavras para agradecer.

Agradeço a todos os meus amigos. Cada um de vocês é especial em minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Jorge Casseb, pela oportunidade de realizar o doutorado em uma Universidade referência no mundo.

Aos meus amigos do laboratório: Karen Oliveira, Adriele Fontes, Maria Gonçalves, Ericka, Adriana de Brito e Rafael Oliveira, pelas horas de discussão de resultados e bate papo sem compromisso. Obrigado por fazerem minha estada no LIM-56 mais divertida.

Obrigado a todos!

Fernando

Resumo

Introdução: O Papilomavírus Humano está muito bem associado com diversos tipos de cânceres humanos, como câncer anogenital e oral. Alguns estudos demonstram que o aparecimento de lesões e a progressão para o câncer estão relacionados ao tipo de resposta imune do hospedeiro. Deste modo, evidências indicam que a resposta imune do hospedeiro tem um papel muito importante para o curso da infecção pelo HPV. **Objetivo:** Avaliar a resposta imune específica *in vitro* ao Papilomavírus Humano (HPV) em homens com lesões causadas por HPV e sem lesão por HPV. **Material e Métodos:** Foram recrutados 31 pacientes e 11 voluntários, que formaram 4 grupos de estudo; sendo 12 pacientes no Grupo A (HIV+/HPV+); 09 pacientes no Grupo B (HIV-/HPV+); 10 pacientes no Grupo C (HIV+/HPV-); e 11 indivíduos saudáveis no Grupo D (HIV-/HPV-). Foram realizados ensaios de cultura celular para mensurar a resposta celular específica “*in vitro*” do tipo Th1/Th2/Th17 (INF- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-17) sob o estímulo da vacina quadrivalente do HPV (HPV 6, 11, 16 e 18) e à proteína E7 de HPV-16. **Resultados:** O grupo coinfectado (HIV+/HPV+) apresentou níveis mais elevados de citocinas, principalmente do perfil Th2, comparando-se com os dados dos demais grupos de estudo. O grupo coinfectado apresentou níveis elevados de IL-6 e IL-10 (Perfil Th2) em relação ao grupo controle (HIV-/HPV-), com significância estatística ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente). **Conclusão:** Foi demonstrada uma elevada produção de citocinas no grupo HPV+/HIV+, sugerindo uma forte imunomodulação pela coinfeção HIV/HPV. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para comprovar estes dados. Além de apresentar um perfil essencialmente Th2 do grupo coinfectado, principalmente pelos níveis elevados de IL-6 e IL-10 apresentados, sugerindo que estas duas citocinas possam servir como biomarcadores para persistência viral, uma vez que, os pacientes soropositivos para HIV apresentam maior persistência de HPV, e monitorar a progressão para lesões mais graves.

Descritores: Papilomavirus Humano, HPV, Equilíbrio Th1 – Th2, Células Th17.

Abstract

Introduction: Human Papillomavirus is associated with different types of human cancers, such as anogenital and oral cancer. Some studies show that the appearance of lesions and progression to cancer are related to the type of host immune response. Thus, evidence indicates that the host immune response has a role key in the course of HPV infection.

Objective: To evaluate the specific immune response *in vitro* to HPV in men with lesions caused by HPV and without injury caused by HPV. **Methods:** We recruited 31 patients and 11 volunteers, who formed four groups, with 12 patients in Group A (HIV+/HPV+); 09 patients in Group B (HIV-/HPV+); 10 patients in Group C (HIV+/HPV-) and 11 healthy subjects in Group D (HIV-/HPV-). Cells culture assay was performed to measure the specific immune response “*in vitro*” Th1/Th2/Th17 (IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-17) under the stimulation of quadrivalent HPV vaccine (HPV 6, 11, 16 and 18) and the E7 protein of HPV-16. **Results:** The coinfecting group (HIV+/HPV+) had higher levels of cytokines, especially Th2 profile, compared with data from the other study groups. The coinfecting group showed high levels of IL-6 and IL-10 (Th2 profile) compared to the control Group (HIV-/HPV-), with statistical significance ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively). **Conclusion:** This study demonstrated a high production of cytokines in the coinfecting group, suggesting a strong immunomodulation by coinfection HIV/HPV. However, further studies should be conducted to confirm these data. In addition to presenting essentially a Th2 profile, especially by high levels of IL-6 and IL-10 presented, suggesting that these two cytokines may serve as biomarkers for viral persistence, since HIV seropositive patients have a higher persistence of HPV, and monitor the progression to more serious injuries.

Word Keys: Human Papillomavirus, HPV, Th1-Th2 balance, Th17 cells.

Lista de Tabelas

Tabela 01: Genótipos de Papilomavírus Humano e risco oncogênico	17
Tabela 02: Vacinas Profiláticas baseados em VLPs de HPV	31
Tabela 03: Limites de detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL17A e IL-10 do kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine	39
Tabela 04: Mediana e variação da produção de citocinas nos grupos HIV+/HPV+, HIV-/HPV+, HIV+/HPV- e HIV-/HPV- sob estímulo de proteína E7.	41
Tabela 05: Mediana e variação da produção de citocinas nos grupos HIV+/HPV+, HIV-/HPV+, HIV+/HPV- e HIV-/HPV- sob estímulo da vacina.	41

Lista de Figuras

Figura 01: Taxa de Incidência anual de Câncer Cervical a cada 100.000 mulheres	12
Figura 02: Prevalência de HPV tipo-específico em cérvix normal, com neoplasia intraepitelial de alto grau e carcinoma cervical invasivo	13
Figura 03: Início dos programas de triagem citológica da cérvix uterina e as taxas de incidência e mortalidade de câncer cervical dos últimos 30 anos nos Estados Unidos	14
Figura 04: Visão da superfície molecular do modelo atômico com cores de acordo com a distância do centro até o capsídeo do HPV-16	16
Figura 05: Prevalência de HPV em cânceres associados ao HPV	17
Figura 06: Genoma do Papilomavirus Humano tipo 16 (HPV-16)	18
Figura 07: Etapas da patogênese da infecção por Papilomavírus Humano (HPV)	20
Figura 08: Processo multifatorial da carcinogênese cervical	18
Figura 09: O curso natural da infecção por Papilomavírus Humano (HPV).	24
Figura 10: Modelo proposto para a associação entre imunidade das células TCD4+ específicas a infecção por HPV-16 e o desenvolvimento de doenças induzidas pelo HPV-16.	26
Figura 11: Organograma do fluxo de estudo dos indivíduos da pesquisa para caracterização da Resposta Th.	35
Figura 12: Produção de IL-17 nos 4 grupos de estudo	41
Figura 13: Produção de IFN- γ nos 4 grupos de estudo	42
Figura 14: Produção de TNF- α nos 4 grupos de estudo	42
Figura 15: Produção de IL-2 nos 4 grupos de estudo	43
Figura 16: Produção de IL-10 nos 4 grupos de estudo	44
Figura 17: Produção de IL-6 nos 4 grupos de estudo	45
Figura 18: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV+ sob estímulo de proteína E7	45
Figura 19: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV+ sob estímulo de proteína E7	46
Figura 20: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV- sob estímulo de proteína E7	46
Figura 21: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV- sob estímulo de proteína E7.	47
Figura 22: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV+ sob estímulo da vacina Gardasil	47
Figura 23: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV+ sob estímulo da vacina Gardasil.	48
Figura 24: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV- sob estímulo da vacina Gardasil	48
Figura 25: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV- sob estímulo da vacina Gardasil	49

SUMÁRIO

Câncer e Papilomavírus Humano (HPV)	12
Papilomavírus Humano (HPV)	15
Objetivos	32
Objetivo Geral	33
Objetivo específico	33
Material e Métodos	34
Casuística	35
Coleta de Sangue	36
Isolamento de Células Polimorfonucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	36
Estímulo para Cultura de PBMCs	36
Ensaio Cytometric Bead Array	37
Análise Estatística	38
Resultados	38
Citometria de Fluxo e dosagem de citocinas pelo kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine	40
Discussão	51
Perfil de Resposta Imunológica Th1/Th2	51
Conclusões	57
Referências Bibliográficas	59

INTRODUÇÃO

Câncer e Papilomavírus Humano (HPV)

Atualmente, o câncer cervical é uma das malignidades ginecológicas mais comuns no mundo, representando cerca de 15% de todas as cânceres, sendo o segundo tipo mais incidente e prevalente, depois do câncer de mama (Zur Hausen, 2002; Franco, 2007; Sapy *et al.*, 2008) [Figura 01]. Sabe-se que o câncer cervical tem como um dos fatores de risco a infecção por tipos específicos de Papilomavírus Humano (HPV), sendo considerado um fator necessário para o desenvolvimento de lesões neoplásicas (Zur Hausen, 1996; 2002; Sapy *et al.*, 2008; Stanley, 2010; Syrjanen *et al.*, 2011).

Figura 01: Incidência anual de Câncer Cervical a cada 100.000 mulheres. (Franco, 2007)

Nos anos de 1974 a 1976, diversos estudos foram iniciados para postular e analisar o possível papel do HPV no câncer cervical. Em 1976, foram publicados dois estudos demonstrando a presença de coilócitos em amostras de esfregaço cervical, indicando a infecção por papilomavírus. Neste mesmo período, foi demonstrada a natureza heterogênea dentro da família *Papilomavírus*, com o isolamento de tipos específicos a partir de verrugas genitais e papilomas laríngeos, o que permitiu um novo olhar para o possível envolvimento dos papilomavírus em cânceres anogenitais (Zur Hausen, 2002).

Após as pesquisas que estabeleceram o HPV como agente necessário para o desenvolvimento do câncer cervical, estudos posteriores demonstraram que cerca de 100% dos cânceres cervicais apresentavam seqüências de DNA de HPV de algum tipo genital de alto risco oncogênico. Os mais importantes são o HPV-16 e o HPV-18, encontrados em 50 – 70% e 7 – 20% dos casos, respectivamente. Outros tipos também são encontrados em proporções menores (Figura 02). Estima-se que 4% de todos os cânceres humanos são atribuídos ao HPV, porém quando a proporção de câncer de cabeça e pescoço atribuída ao HPV for melhor entendida, é possível que esta taxa esteja subestimada (Stanley, 2010).

Figura 02: Prevalência de HPV tipo-específico em cérvix normal, com neoplasia intraepitelial de alto grau e carcinoma cervical invasivo (Stanley, 2010). HSIL: Lesão Intraepitelial de Alto Grau; SCC: Carcinoma Cervical Escamoso; ADC: Adenocarcinoma.

O câncer cervical surge em uma região de mucosa chamada zona de transformação cervical (Schiffman *et al.*, 2007). É necessária a infecção com pelo menos 1 de cerca de 15 tipos de HPV que infectam a mucosa para o desenvolvimento do câncer cervical. Apesar das infecções serem comuns e tipicamente transientes, uma pequena parcela das mulheres permanece infectada por um período maior de tempo, com infecção persistente com

tipos oncogênicos de HPV, tornando-se vulneráveis e com alto risco para o desenvolvimento de lesões cervicais pré-cancerosas e câncer cervical (Garcia-Pineros *et al.*, 2006).

O sucesso dos programas de triagem citológica da cérvix uterina vêm reduzindo as taxas de câncer cervical nos últimos 50 anos (Figura 03). Atualmente, evidências de diversos estudos suportam a incorporação de métodos de prevenção do câncer do colo uterino focando o Papilomavírus Humano, incluindo vacinas em meninas adolescentes que previnem a infecção pelo HPV e a adição de métodos de triagem, como a biologia molecular, possibilitando a eliminação de cerca de 10 milhões de visitas anuais, somente nos Estados Unidos (Schiffman *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2011).

Figura 03: Início dos programas de triagem citológica da cérvix uterina e as taxas de incidência e mortalidade de câncer cervical dos último 30 anos nos Estados Unidos (Carter *et al.*, 2011).

Apesar dos extensos dados na literatura da infecção por HPV em mulheres, os dados da infecção nos homens ainda são limitados (Baldwin *et al.*, 2003). A infecção em homens aparenta ser tão comum quanto a infecção nas mulheres (Baseman e Koutsky, 2005). Doenças associadas com HPV também ocorrem em homens, como carcinomas de pênis, ânus e orofaríngeo (Silva *et al.*, 2011). A infecção masculina, geralmente é subclínica, resultando em um potencial número de assintomáticos, servindo de reservatórios e transmissores do vírus (Baldwin *et al.*, 2003).

A prevalência da infecção por HPV entre homens apresenta-se de forma bastante variável em diversos países, devido aos diferentes métodos utilizados para a obtenção de amostras genitais de homens, dificultando a realização da comparação entre os estudos (Baseman e Koutsky, 2005). Entretanto, os resultados das diversas investigações têm sugerido que a infecção por HPV em homens sexualmente ativos é tão prevalente quanto a infecção por HPV na cérvix uterina (Baldwin *et al.*, 2003)

O HPV infecta o epitélio escamoso da genitália masculina da mesma forma que afeta o trato genital feminino. A prevalência de HPV encontrada em câncer de pênis varia de 30 – 80%, dependendo da sensibilidade de detecção do método e da seleção do tipo de tumor. Entretanto, existem poucos trabalhos que possam esclarecer a associação dos genótipos de HPV com câncer de pênis (Senba *et al.*, 2006). O estudo da infecção nos homens é necessário para melhorar o entendimento da transmissão do HPV, do processo de carcinogênese e da prevenção da doença (Baldwin *et al.*, 2003).

Papilomavírus Humano (HPV)

Os Papilomavírus são um grupo de pequenos vírus de DNA dupla fita, circular, não-envelopados [Figura 04], com cerca de 8 Kb, causadores de tumores, que infecta o epitélio mucoso e cutâneo de uma variedade de vertebrados superiores, de forma espécie-específico, induzindo proliferação celular. Os Papilomavírus não são classificados em sorotipos, mas por genótipos (Stanley, 2010). Até o momento, mais de 130 genótipos de papilomavírus, humanos e animais, já foram seqüenciados e aproximadamente um terço deles infecta o epitélio escamoso do trato genital (IARC, 2007; Moody e Laimins, 2010; No *et al.*, 2010; Snow e Laudadio, 2010; Stanley, 2010; Lorenzon *et al.*, 2011; Vorsters *et al.*, 2011).

Figura 04: Visão da superfície molecular do modelo atômico com cores de acordo com a distância do centro até o capsídeo do HPV-16 (Modis *et al.*, 2002).

O grande grupo dos papilomavírus é subdividido em dois subgrupos: um grupo compreende os tipos que infectam a pele, também chamados de HPV do tipo cutâneos e outro grupo que infecta a mucosa, os chamados HPVs do tipo mucoso. Filogeneticamente, HPVs cutâneos e mucosos formam árvores distintas, refletindo na divergência de suas sequências, constituindo a enorme variedade de tipos identificados (Snijders *et al.*, 2010).

Além desta classificação, podem ser alocados também em três grupos de acordo com seu potencial carcinogênico: grupo de alto risco; provável grupo de alto risco ou risco intermediário e grupo de baixo risco (tabela 01). Os HPVs de baixo risco estão associados com lesões benignas e lesões de baixo grau, como verrugas genitais e papilomatoses recorrente laríngea. Os HPVs de alto risco contribuem no desenvolvimento de diversos cânceres que incluem o câncer cervical, vaginal, vulvar, anal, peniano e orofaríngeo (No *et al.*, 2010).

Tabela 01: Genótipos de Papilomavírus Humano e risco oncogênico (No *et al.*, 2010).

Tipo de risco	Tipo de Papilomavírus Humano (HPV)
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, 73, e 82
Intermediário	26, 53 e 66
Baixo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108

O HPV possui um vasto espectro de doenças, afetando diversas áreas do corpo, variando de verrugas benignas comuns ao câncer invasivo. A infecção por HPV foi descrita em um grande numero de sítios do corpo, incluindo trato anogenital, uretra, pele, laringe, mucosa traqueobrônquica, cavidade nasal, sino paranasal e cavidade oral (No *et al.*, 2010; Kumaraswamy e Vidhya, 2011). A prevalência de HPV em cânceres associados ao vírus pode variar de 3 a 100%, dependendo do sítio de infecção (No *et al.*, 2010) [Figura 05].

Figura 05: Prevalência de HPV em cânceres associados ao HPV (No *et al.*, 2010).

O HPV-16 e 18 são os principais tipos carcinogênicos, responsáveis por 70% - 100% do câncer cervical. Em contrapartida, os tipos 6 e 11 são responsáveis por cerca de 90% das verrugas genitais (Schiffman *et al.*, 2007). A infecção persistente por tipos de HPV de alto risco é um fator necessário para o desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas de alto risco ou câncer cervical (Fontaine *et al.*, 2007).

O genoma dos Papilomavírus Humanos contém oito *Open Reading Frames* (ORFs), que codificam seis proteínas Precoces (E) e duas proteínas Tardias (L). A ORF L1 é utilizada na identificação de novos tipos de HPV, por ser a mais conservada entre as oito ORFs dentro do genoma (Zheng e Baker, 2006; Hariharan e Pillai, 2009; Rautava e Syrjanen, 2011) [Figura 06].

Figura 06: Genoma do Papilomavírus Humano tipo 16 (HPV-16) (Rautava e Syrjanen, 2011).

A região *Early* dos Papilomavírus ocupa mais de 50% do genoma viral, codificando as proteínas *precoces* do HPV: E1, E2, E1^{E4}, E5, E6 e E7. Os genes *Late*, expressos pelo promotor *Late*, incluem as proteínas L1 e L2 do capsídeo, assim como E1^{E4} e E5. A região *Late* de todos os Papilomavírus, ocupa cerca de 40% do genoma viral e a região LCR, com cerca de 850 pb, ocupa 10% de todo o genoma (Zheng e Baker, 2006; Beglin *et al.*, 2009).

Embora tenha um genoma pequeno, o padrão temporal e espacial da expressão gênica é complexo e depende da total diferenciação do epitélio (Hebner e Laimins, 2006; Stanley, 2010). A entrada do vírus no corpo humano requer soluções de continuidade, permitindo a entrada do HPV na camada basal do epitélio, através de possíveis receptores,

ainda não muito bem descritos, como Alfa-6-integrina, laminina 5 extracelular e heparan sulfato proteoglicano (Rautava e Syrjanen, 2011).

Em algum momento após a infecção, ocorre replicação do DNA viral, que parece ser independente do ciclo celular, ampliando o número de cópias virais para cerca de 50 – 100 cópias por célula (Zur Hausen, 2002; Stanley, 2010). As células infectadas migram para as camadas superiores do epitélio e os *early* genes promovem altos níveis de amplificação do genoma viral, levando à síntese e liberação de novos vírions (No *et al.*, 2010).

Após a entrada, o vírus estabelece-se no núcleo da célula na forma episomal. Neste estágio a replicação viral é considerada não produtiva; as proteínas virais E1, E2, E6 e E7 são expressas em baixos níveis e ainda não há produção de progênes virais (Rautava e Syrjanen, 2011). Quando a célula infectada entra no compartimento de diferenciação, existente no ciclo celular, ocorre uma massiva *upregulation* da expressão de todas as proteínas virais necessárias a replicação, com abundante expressão de E6 e E7. (Stanley, 2010).

A replicação do DNA viral ocorre, com cerca de 1000 cópias por célula e finalmente ocorre a expressão das proteínas *Late*, L1 e L2, e montagem das novas partículas virais. Nas células diferenciadas, o DNA viral é empacotado em capsídeos virais e liberado através da superfície da célula epitelial. Este ciclo infeccioso leva cerca de 2 a 3 semanas *in vivo*, tempo que o queratinócito basal move-se entre as camadas superficiais do epitélio e diferencia-se (Hebner e Laimins, 2006; No *et al.*, 2010; Stanley, 2010; Rautava e Syrjanen, 2011) [Figura 07].

Figura 07: Etapas da patogênese da infecção por Papilomavírus Humano (HPV) – Adaptado de (Rautava e Syrjanen, 2011).

As proteínas E6 e E7 parecem ser os principais mediadores no desenvolvimento de carcinoma cervical induzido por HPV (Hebner e Laimins, 2006; No *et al.*, 2010; Stanley, 2010). Durante todo este processo, a integração dos genes virais E6 e E7 no DNA do hospedeiro ocorre como um evento inicial para a carcinogênese, porém estes eventos são muito raros. Eventos genéticos e epigenéticos adicionais também contribuem para o processo de carcinogênese (No *et al.*, 2010).

O evento da carcinogênese é um processo multifatorial envolvendo infecção persistente, lesões prévias e câncer invasivo (Figura 8). Entre a infecção inicial por HPV de alto risco e o desenvolvimento do câncer cervical, há pelo menos um intervalo de 10 anos de história natural, permitindo que lesões pré-cancerígenas do colo do útero possam ser diagnosticadas em programas de triagem citológica (No *et al.*, 2010). A maioria das infecções é eliminada naturalmente, porém a minoria das infecções por HPV torna-se persistente,

aumentando a possibilidade de transformação celular, levando a imortalização celular e posteriormente a lesões pré-neoplásicas e cancerígenas (Rautava e Syrjanen, 2011).

Figura 08: Processo multifatorial da carcinogênese cervical. Adaptado de (No *et al.*, 2010).

As infecções anogenitais por HPV são transmitidas principalmente por contato pele-a-pele ou mucosa-a-mucosa. A probabilidade de infecção por contato sexual não é conhecida, porém sabe-se que é alta, sem diferença na transmissão entre tipos de HPV. Devido à rota de transmissão comum, os tipos de HPV tendem a ser transmitidos juntos, resultando em uma alta proporção de infecção com múltiplos tipos de HPV (Schiffman *et al.*, 2007).

Além da rota comum de transmissão entre os HPVs, facilitando a infecção por tipos de alto risco, outros cofatores influenciam nas altas taxas de prevalência e transmissão do vírus. Um deles é o número de parceiros sexuais. O risco acumulado de aquisição de HPV na primeira relação sexual é de cerca de 45% em 3 anos. Após os 30 anos, a prevalência de infecção por HPV declina bastante para cerca de 5% e os fatores para esse declínio se dá pela mudança no comportamento sexual masculino, como menor número de parceiros sexuais (Carter *et al.*, 2011).

Outros cofatores estão associados ao câncer cervical, como a idade do primeiro intercurso sexual, sexo com parceiros com múltiplos parceiros sexuais, ser soropositivo para

HIV-1, histórico familiar de câncer cervical, mulheres idosas, fumo e pobreza (Franco e Harper, 2005; Kahesa *et al.*, 2008). Porém, a infecção por HPV é uma condição necessária para o desenvolvimento do câncer. Nenhum outro câncer humano tem tão claramente identificado esta causa necessária. Existem alguns paradigmas com outros tipos de cânceres, mas que não representam relação causal necessária (Franco e Harper, 2005).

Apesar da infecção por HPV se espalhar mais comumente de forma sexual, outros meios de transmissão também já foram descritos, como a transmissão vertical (com a passagem da criança pelo canal do colo do útero durante o parto) e também através de auto-inoculação. Pesquisadores já conseguiram identificar o HPV na placenta e no sangue do cordão umbilical, aumentando as chances de transmissão ao feto (Rautava e Syrjanen, 2011).

Alguns pesquisadores defendem a transmissão do HPV, não somente de forma sexual, mas também através de fômites, como o uso compartilhado de toalhas úmidas, uma vez que o HPV é altamente resistente aos efeitos do calor e secura (Kumaraswamy e Vidhya, 2011).

Como dito anteriormente, o caráter subclínico da infecção nos homens o coloca com um papel muito importante na transmissão do HPV, uma vez que o HPV DNA já foi detectado na genitália de mais de 73% de homens saudáveis. Um dado preocupante, é que os homens têm infecção por tipos de HPV de alto risco para o câncer, não percebem que são susceptíveis ao HPV e não acreditam que a infecção possa ser um problema grave a eles (Banura *et al.*, 2011).

A infecção por HPV em homens é altamente prevalente, particularmente entre homens que fazem sexo com homens (HSH). A maioria dos HSH relatou possuir verrugas genitais, porém não acreditam estar infectados pelo HPV. Estudos relataram que o risco de desenvolvimento de câncer anal é 17 vezes maior em HSM do que em heterossexuais. Estas taxas de aumento de risco para diversos tipos de câncer associados ao HPV, como o câncer oral também é aumentada em HSM (Dietz e Nyberg, 2011).

Com base nos estudos de meta-análise, estimativas mostram que cerca de 291 milhões de mulheres carregam o HPV DNA, das quais cerca de 32% são portadoras dos tipos HPV-16 ou 18, ou ambos os tipos. Estes tipos encontrados são similares aos descritos nos casos de lesões pré-neoplásicas e câncer, embora a contribuição relativa de HPV-16 e 18 é substancialmente mais baixa em mulheres citologicamente normais (De Sanjose *et al.*, 2007).

Um dos cofatores mais importantes na persistência do HPV e no desenvolvimento do câncer associado ao vírus é a coinfeção com o Vírus da

Imunodeficiência Humana (HIV). Mais de 1.7 milhões de pessoas vivem infectadas com o HIV-1 na América Latina, sendo que um terço desta população são mulheres (Gonçalves *et al.*, 2008). A coinfeção por HPV e HIV se mostrou relevante na disseminação e persistência do papilomavírus. De fato, algumas questões permanecem a serem respondidas, como por exemplo, se ocorre um efeito adicional na infecção pelo HIV na aquisição, reativação ou persistência da infecção pelo HPV (De Sanjose e Palefsky, 2002). A transmissão sexual eficiente de ambas as infecções permite um elevado número de pessoas co-infectadas em nosso meio (Silva *et al.*).

Quando associada a infecção do HPV com HIV, a prevalência de infecção cervical é claramente bem mais elevada, com taxas três vezes maior de infecção por tipos de HPV de alto risco. A infecção por HIV também eleva o risco de infecção persistente de HPV, com maiores probabilidades de desenvolvimento de câncer cervical (De Sanjose e Palefsky, 2002) e reduz as chances de eliminação do HPV (Fontaine *et al.*, 2008).

Homens infectados pelo HIV-1 têm duas a seis vezes mais chances de desenvolver o câncer anal quando comparados com homens soronegativos. A incidência de HPV anal sobe de 5% para 15% em homens soropositivos para o HIV quando comparados aos soronegativos (Hagensee *et al.*, 2004). Dados anteriores também mostram que homens que fazem sexo com homens (HSH), soropositivos para o HIV-1 apresentam prevalência próxima a 100% (Dos Ramos Farias *et al.*, 2011).

Em imunocompetentes, a infecção geralmente é eliminada em 7 a 10 meses. Nos imunossuprimidos, a infecção geralmente persiste e a imunodeficiência tem um papel importante na patogênese das neoplasias intraepiteliais anais. Entretanto, o exato mecanismo de interação entre o HIV e o HPV ainda não é bem compreendida, porém aparenta ser uma ausência da resposta imune mediada por células como resultado da infecção pelo HIV (Kreuter *et al.*, 2008). O eliminação viral pelas células TCD4+ é importante na resolução da infecção do HPV e existe clara associação entre os baixos níveis de TCD4+ e displasia cervical (Macleod *et al.*, 2011).

A interação do HIV com queratinócitos infectados por HPV pode acarretar no aumento da expressão de certas citocinas, que promovem o a expressão dos genes do HPV. Outra interação do HIV/HPV pode ser pela proteína Tat do HIV que aumenta a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV nos queratinócitos, levando à inativação de p53 e pRb, induzindo instabilidade cromossomal e a transformação maligna (Kreuter *et al.*, 2008).

Do ponto de vista dos microbiologistas evolucionários, os papilomavírus são agentes infecciosos muito bem sucedidos. Induzem infecção crônica que não apresenta seqüela sistêmica aparente e raramente mata o hospedeiro, que, entretanto, periodicamente libera grande quantidade de vírus infecciosos, transmitindo-os a indivíduos saudáveis (Stanley, 2009). A defesa do hospedeiro é uma parceria entre a imunidade inata (fagócitos, citocinas, complemento e barreiras epiteliais) e a imunidade adaptativa (anticorpos, células efectoras citotóxicas) (Stanley, 2006).

A resposta imunológica mediada por células tem um papel importante no controle das neoplasias induzidas pelo HPV. As lesões por HPV são, geralmente, transitórias e regredem por ação do sistema imunológico competente (Gravitt *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2005; Stanley, 2006; Delgado *et al.*, 2009). As infecções persistentes estão inevitavelmente ligadas a mecanismos de evasão do sistema imunológico (Bolpetti *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos e de história natural sugerem fortemente que a resposta imunológica a infecção por HPV segue um padrão similar de resposta (Gravitt *et al.*, 2003; Stanley, 2006) [Figura 09].

Figura 09: O curso natural da infecção por Papilomavírus Humano (HPV). Adaptado de (Stanley, 2006).

Nos imunodeprimidos, como pacientes infectados pelo HIV-1, existe uma clara evidência que a coinfeção HIV/HPV pode influenciar a progressão para a AIDS por dois

mecanismos: recrutamento de células-alvo para o HIV, como os LTCD4+, dentro de sítios de intensa atividade da infecção por HPV; e pela produção de algumas citocinas inflamatórias que já foi demonstrada induzirem a replicação e a transcrição reversa do HIV (Nicol, Fernandes e Bonecini-Almeida Mda, 2005).

Recentes estudos têm demonstrado um aumento na prevalência da persistência de HPV-16 e HPV-18 no trato genital de mulheres soropositivas para o HIV-1, além de alta incidência de cânceres genitais e rápida progressão de tumores associados ao HPV (Delgado *et al.*, 2009). Mais de 20% destes pacientes coinfectados desenvolvem lesões pré-malignas induzidas pelo HPV na cérvix uterina dentro de 3 anos do diagnóstico de HIV. A progressão sem tratamento de uma lesão displásica por HPV pode levar ao câncer cervical, doença definidora de AIDS (Taylor *et al.*, 2004).

Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção viral causa a produção e liberação de diversas citocinas proveniente de macrófagos, células NK, linfócitos, fibroblastos e queratinócitos (Boccardo *et al.*, 2004). A ativação de células TCD4+ resulta na produção e secreção de citocinas que ajudam e regulam outras células. O padrão de expressão de citocinas define os dois principais *subsets* celulares de linfócitos TCD4+ conhecidos como Th1 e Th2 (Stanley, 2006; Sharma *et al.*, 2007).

As citocinas exercem um papel muito importante na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo HPV, modulando a infecção viral e polarizando a resposta imunológica para o padrão Th1 e Th2 (Fernandes *et al.*, 2005). A análise do padrão de citocinas de células T *helper* tipo 1 e tipo 2 (Th1 e Th2) vem sendo utilizada para caracterizar a resposta imunológica em diversas doenças humanas, incluindo doenças associadas ao HPV (Agarossi *et al.*, 2003). As citocinas na resposta imune à infecções são geralmente classificadas como citocinas imunoestimulantes de T *Helper* (Th1) e T *Helper* 2 (Th2) (Song *et al.*, 2007).

Alguns destes estudos vêm demonstrando, durante a carcinogênese do epitélio cervical, uma mudança de resposta Th1 para Th2 (Azar *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2009). A mudança de resposta imunológica Th1 para Th2, que determina a *downregulation* da imunidade celular pode explicar a perda imunológica do controle do HPV e suas complicações oncológicas (Agarossi *et al.*, 2003; Van Der Burg *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009) [Figura 10]. Diversos estudos sugerem que uma resposta Th1 está associada ao *clearence* viral (Clerici *et al.*, 1997; Lopez e Stanley, 2000) e a resposta Th2 na persistência da infecção pelo HPV (Song *et al.*, 2008).

Figura 10: Modelo proposto para a associação entre imunidade das células TCD4+ específicas a infecção por HPV-16 e o desenvolvimento de doenças induzidas pelo HPV-16. Adaptado de (Van Der Burg *et al.*, 2004). CIN: Neoplasia Intraepitelial Cervical; CxCa: Câncer Cervical.

O desnível na resposta Th1 e Th2 pode determinar resistência ou susceptibilidade à doença. A resposta Th1 é associada com a imunidade mediada por células e com um perfil de citocinas de interleucina 2 (IL-2) e *Interferon Gama* (IFN- γ). A resposta Th2 é associada com a imunidade humoral com o perfil de citocinas de IL-4, IL-6 e IL-10. Em pacientes com câncer, o desvio imunológico é caracterizado por uma *upregulation* do perfil de citocinas Th2 em linfócitos do sangue periférico (Ghim *et al.*, 2001).

Células Th2 secretam IL-4, IL-6 e IL-10 (e outras citocinas) e auxiliam os linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos e secretarem anticorpos, que são moléculas efetoras do sistema imune humoral. São moléculas inibitórias do sistema imunológico e podem estimular o crescimento tumoral (El-Sherif *et al.*, 2001; Stanley, 2006). As células Th1 secretam IFN- γ , moléculas chave para a ativação de células efetoras citotóxicas – macrófagos, células NK e linfócitos TCD8+, gerando imunidade celular (Stanley, 2006).

Como dito anteriormente, a resposta imunológica do tipo Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) está associada a um péssimo prognóstico de pacientes com lesões cervicais associadas ao HPV. A IL-10 em particular, bloqueia a síntese de outras citocinas produzidas pelos linfócitos T *helper*, monócitos ativados e células NK. Um decréscimo na atividade das células NK está associado com a reativação da infecção latente por HPV (Lee *et al.*, 2004). IL-10 também está associado à *downregulation* do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), resultando na redução da resposta Th1 (Bolpetti *et al.*, 2010). As concentrações de IL-10 aumentam significativamente com a severidade da displasia (Bais *et al.*, 2005).

O interferon (IFN) induz um potente mecanismo de defesa antiviral, sendo sugerido até mesmo como tratamento para infecções por HPV. Porém, os níveis de IFN encontram-se reduzidos em células infectadas pelo HPV quando comparadas aos queratinócitos normais (Song *et al.*, 2008; Beglin *et al.*, 2009). No epitélio normal, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são as principais fontes de IFN- γ . Em neoplasias associadas ao HPV, a diminuição de IFN- α epitelial pode estar relacionada com a depleção de TCD4⁺ (El-Sherif *et al.*, 2001).

A IL-2 é um potente ativador de linfócitos T, células NK, macrófagos, linfócitos B e estimula a liberação de outras citocinas. Seu efeito antitumoral promove a ativação de células NK e outras células citotóxicas, assim como a indução de IFN- γ e TNF- α (Bermudez-Morales *et al.*, 2005), aumentando a capacidade de destruição das células tumorais (Clerici *et al.*, 1997).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α é um dos principais mediadores de inflamação da pele e da mucosa, com um potente efeito anti-proliferativo em células epiteliais normais. Numerosas observações indicam que o TNF- α pode influenciar no destino das células infectadas por HPV (Boccardo *et al.*, 2009).

As células T *helper* 17 (Th17), desde a sua descoberta, ganharam notoriedade nos estudos de virologia, doenças autoimunes, inflamação e resposta imune a vários parasitas e fungos. Embora, sua função em grande parte destas condições ser bem definida, ainda é controversa seu papel na imunologia de tumores. Não existem trabalhos relacionando as células Th17 e cânceres relacionados ao HPV. Entretanto, alguns trabalhos com outros tipos de cânceres tem demonstrado uma grande importância deste tipo celular. Em pacientes com câncer de ovário, os níveis de IL-17 correlacionou-se positivamente com a sobrevivência da paciente. A média de sobrevivência de pacientes com níveis > 220 pg/mL foi de 78 meses,

enquanto em pacientes com menos IL-17 foi de 27 meses (Wilke *et al.*, 2011). Com isso, torna-se importante a tentativa de entender o papel desta citocina nas infecções por HPV.

Na associação com outras doenças, é desconhecido, no trato genital feminino, se a coinfeção com o HIV-1 afeta a síntese de citocinas do tipo 1 e 2, em mulheres infectadas com HPV, na medida em que contribui para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais (Nicol, Fernandes e Bonecini-Almeida Mda, 2005). Pouco é conhecido como a imunidade celular por linfócitos T age contra o HPV nos diferentes estágios da progressão da doença (Seresini *et al.*, 2007). Não existem dados na literatura, abordando a resposta do tipo Th1 e Th2 em homens, principalmente infectados pelo HPV.

Em pacientes soropositivos para o HIV-1, observa-se predominância de citocinas Th2, podendo explicar, em partes, a susceptibilidade à infecções recorrentes do trato genital, permitindo o desenvolvimento de atipias neoplásicas (Fernandes *et al.*, 2005). É observado também que o declínio na produção de citocinas do tipo 1 e o aumento das citocinas do tipo 2 estão associados com a progressão da infecção por HIV para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Clerici *et al.*, 1997).

Algumas citocinas podem promover um microambiente favorável para uma acelerada transcrição do HPV e/ou proliferação celular, contribuindo para uma progressão das lesões intraepiteliais sob infecção por HIV-1. Sugere-se que o HPV pode evadir do sistema imune do hospedeiro em um microambiente cervical de citocinas Th2, muito observado em pacientes soropositivos para o HIV-1. As altas concentrações de citocinas Th2 diminuem a atividade dos LTCD8+, levando a uma infecção persistente (Nicol, Fernandes, Grinsztejn *et al.*, 2005).

Um medicamento, o Imiquimod, um modulador sintético da resposta imune, é utilizado para o tratamento de lesões genitais e perianais (verrugas). O medicamento induz a produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12, inibindo IL-5, demonstrando desvio imunológico para o tipo Th1 (Richwald, 1999). Atua na ativação de células dendríticas, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de linfócitos T, resultando em uma profunda resposta imune direta contra o tumor (Terlou *et al.*, 2010).

Mesmo após mais de 25 anos do estabelecimento do HPV como agente causal do câncer cervical, ainda não existe um tratamento eficaz contra a infecção por HPV. Mesmo após o consenso da etiologia do HPV, a presença ou ausência do vírus não tem impacto nenhum na decisão do tratamento. A estratégia é primariamente anti-câncer e não anti-viral.

Diversas terapias estão disponíveis para o tratamento de doenças associadas ao HPV (Bharti *et al.*, 2009).

Todos os tratamentos são citodestrutivos, com exceção do uso do Imiquimod e uso de interferons intralesões, que são terapias imunoestimulantes. A taxa de recorrência da lesão, incluindo novas lesões previamente tratadas ou em novos sítios, é de geralmente 20-30%. Atualmente, não há critérios definidos de qual paciente vai responder de forma favorável ao tratamento, quando a resposta irá ocorrer e qual paciente terá recaída (Stefanaki *et al.*, 2009). Por isso a importância de se estudar os eventos imunológicos em pacientes com algum tipo de lesão associada ao HPV.

A obrigatoriedade do papel do HPV no desenvolvimento do câncer cervical, a imunização de homens e mulheres utilizando uma vacina diretamente contra os tipos de HPV de alto risco mais comuns representa uma lógica estratégia de prevenção primária para a redução da ocorrência desta doença devastadora. A imunização, tanto de homens quanto de mulheres, com a vacina profilática quadrivalente, tendo como alvo estes tipos mais comuns de HPV irá resultar em uma redução da infecção por HPV e na carga atual das doenças relacionadas ao HPV (Villa, 2007).

Além dos tratamentos, atualmente já estão aprovadas e licenciadas duas vacinas anti-HPV. São duas vacinas profiláticas baseadas em Virus-like-Particles (VLPs), licenciadas para uso humano, de diferentes fabricantes, adjuvantes e produzidas em diferentes tipos de células (Lepique *et al.*, 2009) [Tabela 2]. A vacina Gardasil® (Merck & Co., Inc) é uma vacina quadrivalente contendo VLPs da proteína L1 dos tipos 6, 11, 16 e 18 e como adjuvante, o alumínio. Outra vacina, também licenciada, é a Cervarix™ (GlaxoSmithKline), bivalente, contendo VLPs da proteína L1 de HPV-16 e 18 e como adjuvante o AS04 (Han *et al.*, 2009).

Tabela 02: Vacinas Profiláticas baseados em VLPs de HPV. (Lepique *et al.*, 2009)

	Quadrivalente	Bivalente
Fabricante	Merck Sharp & Dohme	GlaxoSmithKline
Tipos de VLP	6/11/16/18	16/18
Dose da proteína L1	20/40/40/20 µg	20/20 µg
Células Produtoras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressando L1	Linhagem celular de <i>Trichoplusia ni</i> infectada com Baculovírus e L1 recombinante
Adjuvante	225 µg aluminum hydroxyphosphate sulfate	500 ug aluminum hydroxide, 50 ug 3-O-deacylated-4'- monophosphoryl lipid A
Administração	0, 2, 6 meses	0, 1, 6 meses

Foi demonstrado que com a proteína recombinante L1, a principal proteína do capsídeo do HPV, ocorre automontagem em partículas semelhantes aos vírus (VLPs), morfológicamente similares aos vírions nativos, sem o genoma viral e capazes de induzir resposta de anticorpos neutralizantes (Tobery *et al.*, 2003; Bhat *et al.*, 2011).

Enquanto a exposição à proteína L1 do capsídeo do HPV na infecção natural leva a produção de baixos títulos de anticorpos, devido à falta de uma fase sistêmica infecciosa e da natureza não-citolítica da infecção por HPV, a administração sistêmica da proteína L1 provoca uma vigorosa e protetora resposta de anticorpos do hospedeiro. Os anticorpos são gerados contra múltiplos epítomos conformacionais do capsídeo e a resposta é largamente genótipo-específica (Bhat *et al.*, 2011).

A duração da proteção de uma vacina representa um teste crítico para a sua utilidade como instrumento de intervenção em saúde pública. Algumas vacinas induzem imunidade a longo prazo. Outras requerem a administração de doses de reforço. A experiência com a vacina de Hepatite B pode fornecer algumas orientações sobre o tempo de imunidade da vacina para HPV, uma vez que ambas as vacinas tem desenho similar (Villa *et al.*, 2006).

A literatura sugere que dentro de 4 anos após o início da atividade sexual, mais de 63% das mulheres poderão ser infectadas por qualquer tipo de HPV. Estes dados reforçam a importância de uma intervenção precoce em relação ao câncer cervical (Olsson *et al.*, 2009). É de grande conhecimento que a vacinação de meninas adolescentes deve ser feito de forma prioritária nos programas de vacinação (Schiller *et al.*, 2008).

As vacinas oferecem ao menos 5 anos de proteção e previnem não somente infecção persistente de HPV, mas também displasia epitelial anogenital e malignidade. As

vacinas para HPV, atualmente não apresentam ação terapêutica em lesões já existentes ou câncer instalado, porém observa-se uma reação cruzada dos genótipos presentes na vacina com outros genótipos causadores de câncer, particularmente o HPV-45 com o HPV-18 e o HPV-33 com o HPV-16. Entretanto, não previnem a infecção com todos os genótipos de alto risco (Bhat *et al.*, 2011).

A primeira vacina disponível e licenciada pela *US Food and Drug Administration* (FDA) foi a quadrivalente Gardasil[®], aprovada em Junho de 2006 para uso em mulheres entre 9 e 26 anos de idade. A vacina bivalente, Cervarix[®], não havia sido aprovada pelo FDA até outubro de 2009, por falta de dados, apesar de seu uso em diversos locais, como Europa, Austrália e Filipinas. A vacina bivalente é aprovada para administração em mulheres entre 10 e 25 anos de idade. (Sheinfeld Gorin *et al.*, 2011).

Apesar do licenciamento da vacina e novos tratamentos para as lesões, inclusive na população masculina, há ainda pouca informação sobre a infecção por HPV em homens, principalmente, infectados pelo HIV-1. Entretanto, a infecção em homens se mostra tão prevalente quanto em mulheres. Em ensaios anteriores de nosso grupo utilizando a urina como fonte de detecção do vírus foi possível identificar a presença do HPV-DNA e os tipos de HPV presentes na população masculina infectada pelo HIV-1 (Costa et al, 2009).

Com a imunodepressão observada em pacientes soropositivos para o HIV-1, e demonstrando-se que uma resposta imunológica eficiente do hospedeiro, está intimamente ligada à persistência ou *clearence* viral, e com as citocinas exercendo um papel muito importante na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo HPV, com a polarização da resposta para Th1 ou Th2, existe a necessidade de se estudar o perfil imunológico dos pacientes infectados com HPV e correlacionar com a progressão de lesões, uma vez que vem sendo observado que a progressão das lesões e progressão para o câncer está intimamente ligadas a esta mudança no perfil de resposta imune de Th1 para Th2. Os resultados deste estudo fornecerão informações úteis para o melhor entendimento da resposta imune específica do hospedeiro ao HPV e a progressão da doença.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune específica *in vitro* ao Papilomavírus Humano (HPV) em homens da cidade de São Paulo, Brasil.

OBJETIVO EPECÍFICO

1. Avaliar o padrão de resposta imune ao HPV, por meio de dosagem de citocinas, por citometria de fluxo, [INF- γ , IL-2 e TNF- α (resposta Th1), IL-4, IL-6 e IL-10 (resposta Th2)] e IL-17 (Th17) no sobrenadante de cultura de linfócitos TCD4+.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foram recrutados 31 pacientes e 11 voluntários, que formaram 4 grupos de estudo; sendo 12 pacientes infectados pelo HIV-1 e com lesões causadas por HPV (Grupo A – HIV+/HPV+); 09 pacientes soronegativos para o HIV-1 e com lesões causadas por HPV (Grupo B – HIV-/HPV+), que passavam por consulta médica com o urologista ou com o proctologista; 10 indivíduos soropositivos para o HIV-1 e sem infecção por HPV (Grupo C – HIV+/ HPV-); e 11 indivíduos saudáveis (Grupo D – HIV-/HPV-) [Figura 11].

Os pacientes foram atendidos pelo médico em um Serviço de tratamento a Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) e ambulatório de especialidades (HIV), dentro do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS de São Paulo – CRT/SP. Após informados sobre a pesquisa e caso houvesse o aceite de participação, eram encaminhados a outra sala para serem orientados sobre o estudo, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a coleta do sangue periférico.

Figura 11: Organograma do fluxo de estudo dos indivíduos da pesquisa para caracterização da Resposta Th.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa de ambas as instituições, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HC/FMUSP e Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS de São Paulo – CRT/SP.

COLETA DE SANGUE

Foram coletadas amostras de sangue periférico através de punção venosa dos indivíduos participantes da pesquisa em três tubos vacutainer de 10 mL contendo heparina sódica (Becton & Dickinson, NJ, USA) para a realização da cultura celular.

ISOLAMENTO DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)

A técnica de separação de PBMCs é baseada na separação de gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England). As amostras de sangue total foram diluídas em solução salina na proporção 1:1 e transferidas para um tubo cônico de 50 mL contendo Ficoll-Hypaque na proporção 1:3 para posterior centrifugação a 800 xg, por 20 minutos, a 16 °C.

As PBMCs separadas pelo gradiente de densidade foram removidas e transferidas para um tubo cônico de 15 mL e lavadas com solução salina sob centrifugação a 450 xg, por 10 minutos, a 16°C. Uma segunda lavagem com solução salina foi realizada nas mesmas condições da lavagem anterior.

O sobrenadante foi removido e o *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 para contagem de leucócitos no citômetro Cell-Dyn (Abbott Park, Illinois, U.S.A). Foram separadas alíquotas contendo $2 \cdot 10^6$ células/mL com RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro AB, que foram adicionadas em placas de cultura de 24 poços e estimuladas com os estímulos específicos.

ESTÍMULOS PARA CULTURA DE PBMCs

Foi utilizada vacina comercialmente disponível (Gardasil[®], Merck & Co., INC,USA) contendo antígenos da região L1 de quatro tipos de HPV (HPV-6, 11, 16 e 18) e proteína E7 de HPV-16, disponibilizada pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As PBMCs foram suspensas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro AB a 2×10^6 cels/well em placa de cultura com 24 poços e estimuladas separadamente com 2 µg/mL da vacina Gardasil[®], 15 µg/mL da proteína E7 e controles.

Como controle positivo, as PBMCs foram estimuladas com 5 µg/ml de PHA e como controle negativo as PBMCs foram cultivadas apenas em meio de cultura RPMI 1640.

As culturas foram submetidas a condições de 72 horas, 37 °C e 5% de CO₂. Após o período de cultura celular, o sobrenadante foi coletado e congelado à – 72 °C, para posterior análise.

ENSAIO CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

Para as análises de expressão de citocinas por citometria de fluxo, foi utilizado o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine. O Kit BD CBA Human Th1/Th2/Th17 cytokine pode ser utilizado para medir os níveis de proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17 em uma única amostra. O kit pode ser padronizado para análise de concentrações fisiológicas relevantes (pg/mL) de citocinas específicas em sobrenadantes de cultura de tecidos, plasma EDTA e amostras de soro (Becton & Dickinson, NJ, USA). O kit de CBA fornece um método de captura de um analito solúvel ou set de analitos com *beads* de tamanhos conhecidos e fluorescentes, tornando-se possível detectarmos analitos utilizando-se citometria de fluxo.

Cada *bead* de captura é conjugada com anticorpos específicos. O reagente de detecção fornecido no kit é uma mistura de anticorpos conjugados com ficoeritina (PE), que fornece um sinal fluorescente na proporção do analito que ocorreu ligação.

Quando as beads de captura e o reagente detector são incubados com uma amostra desconhecida contendo analitos, é formado um complexo-sanduíche (bead de captura + analito + reagente de detecção). Estes complexos podem ser medidos utilizando citometria de fluxo para identificar partículas com fluorescência.

O kit CBA utiliza a tecnologia de beads array para detectar simultaneamente múltiplas citocinas protéicas em amostras de pesquisa. Sete populações de beads com intensidades fluorescentes distintas foram revestidos com anticorpos específicos para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e Th17.

Resumidamente, a técnica consiste em transferir as *beads* da curva padrão padrão para um tubo de 15 mL de polipropileno e reconstituir em 2 mL de tampão diluente, fornecido pelo kit. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Com este padrão, realizou-se uma diluição seriada: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256.

Ressuspendeu-se as beads de captura, localizadas em garrafas individuais. Adicionou-se uma alíquota de 10 uL de cada bead de captura para cada tubo a ser analisado, dentro de um único tubo marcado com MIXED CAPTURE BEADS.

Em cada tubo identificado, foi adicionado 50 µL de sobrenadante de cultura, previamente descongelado. Posteriormente, adicionou-se 50 µL do reagente de detecção *Mouse Th1/Th2/Th17 PE* em cada um dos tubos. Foi realizada incubação de 3 horas, a temperatura ambiente.

Após o final da incubação, foram realizadas lavagens, adicionando-se 1 mL de *Wash Buffer*, centrifugando-se a 200g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 µL de *wash buffer*. Os sobrenadantes foram analisados imediatamente em citômetro de fluxo BD LSR Fortessa cell analyzer (Becton & Dickinson, NJ, USA). O limite de detecção de cada citocina está representada na tabela 03.

Tabela 03: Limites de detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL17A e IL-10 do kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine.

Cytokine	Limit of detection (pg/mL)
IL-2	0.1
IL-4	0.03
IL-6	1.4
IFN-γ	0.5
TNF	0.9
IL-17A	0.8
IL-10	16.8

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Graphpad Prism* versão 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste de análise de variância “ANOVA” foi utilizado. Valores de $p < 0.05$ foram considerados como significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Citometria de Fluxo e dosagem de citocinas pelo kit BD Cytometric Bead Array (CBA)

Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine

A tabela 04 demonstra a mediana e a variação de produção de citocinas, sob estímulo de proteína E7 de HPV-16, dentre os diferentes grupos de estudo, demonstrando grande produção de citocinas do tipo 2 (Th2) e menor produção de citocinas do perfil Th1, em pacientes coinfectados pelo HIV e HPV.

Tabela 04: Mediana e variação da produção de citocinas nos grupos HIV+/HPV+, HIV-/HPV+, HIV+/HPV- e HIV-/HPV- sob estímulo de proteína E7.

Grupos	IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-17
HIV+/HPV+	5,28 (0 - 4226,75)	0,00 (0 - 2,96)	504,72 (23,58 - 41445,14)	180,99 (57,72 - 2075,28)	40199,13 (34323,02 - 45953,69)	0 (0 - 11,43)
HIV-/HPV+	28,77 (0 - 137,5)	1,01 (0 - 8,44)	1167,88 (4,96 - 1921,8)	121,61 (0 - 917,46)	33186,65 (594,84 - 39591,79)	0 (0 - 2,9)
HIV+/HPV-	0 (0 - 5,63)	0 (0 - 8)	29,89 (0 - 1065,18)	1,34 (0 - 620,73)	2266,85 (198,66 - 40735,43)	0
HIV-/HPV-	6,98 (0 - 436,16)	1,14 (0 - 7,05)	1123,94 (0 - 14339,14)	36,75 (0 - 686,31)	29026,88 (240,45 - 39703,58)	0 (0 - 22,8)

A Tabela 05 demonstra o perfil de citocinas dos grupos de estudo sob estímulo da vacina Gardasil. Foi observada elevada produção de IL-6 em todos os grupos sob estímulo da vacina, além da citocina TNF- α nos grupos HIV+/HPV+ e HIV-/HPV+, sem significância estatística. O grupo HIV+/HPV- tem a níveis elevados de todas as citocinas em estudo.

Tabela 05: Mediana e variação da produção de citocinas nos grupos HIV+/HPV+, HIV-/HPV+, HIV+/HPV- e HIV-/HPV- sob estímulo da vacina Gardasil.

Grupos	IFN- γ	IL-2	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-17
HIV+/HPV+	6,60 (0 - 4790,41)	1,87 (0 - 5,94)	296,29 (14,05 - 40404,95)	159,96 (40,86 - 1619,07)	39281,56 (33469,65 - 42096,16)	0 (0 - 11,43)
HIV-/HPV+	10,84 (0 - 38,97)	3,71 (0-13,37)	306,12 (0 - 840,97)	37,11 (0 - 620,73)	21010,87 (158,13- 39513,6)	0 (0 - 35,6)
HIV+/HPV-	0 (0 - 0,32)	0,05 (0-126,1)	0 (0 - 18,19)	0 (0 - 2,6)	25,07 (2,4- 7557,75)	0 (0 - 7,58)
HIV-/HPV-	1,27 (0 - 529,44)	4,47 (0-59,77)	0 (0 - 92,24)	0 (0 - 16,45)	132,97 (54,62- 30058,3)	0 (0 - 15,34)

➤ IL-17

Foram encontrados baixos níveis de IL-17 nos grupos de estudo. Quando estimuladas com a proteína E7 de HPV-16, encontramos o Grupo D (HIV-/HPV-) com níveis maiores de IL-17, quando comparados aos demais grupos de estudo, porém não foi encontrada significância estatística ($p=0.64$) (Figura 12).

Sob estímulo da vacina, encontramos níveis mais elevados da citocina IL-17 no grupo infectado somente por HPV (HIV-/HPV+), enquanto que nos demais grupos, manteve-se os mesmos níveis de produção. Entretanto, não foi observada significância estatística ($p=0.27$) (Figura 12).

Figura 12: Produção de IL-17 nos 4 grupos de estudo.

➤ IFN- γ

Os níveis de IFN- γ dosados no sobrenadante de cultura de linfócitos TCD4+ foram semelhantes, em ambas as condições de cultura. Entretanto, observamos um discreto aumento no nível desta citocina, em células de pacientes com estímulo da vacina Gardasil, porém sem significância estatística [$p=0.4636$ (E7) e $p=0.4344$ (vacina)] [Figura 13].

Figura 13: Produção de IFN- γ nos 4 grupos de estudo.

➤ TNF- α

Foram encontrados altos níveis de TNF- α no grupo coinfectado HIV+/HPV-, sob ambos os estímulos. Entretanto, os grupos HIV-/HPV+ e HIV+/HPV- apresentaram discreta produção desta citocina sob estímulo da proteína E7, enquanto sob estímulo da vacina, houve baixa produção, sem significância estatística (Figura 14). Sob estímulo de E7, o grupo HIV-/HPV- demonstrou uma discreta produção.

Figura 14: Produção de TNF- α nos 4 grupos de estudo.

➤ IL-2

Em ambos os estímulos utilizados na cultura de linfócitos TCD4+, observamos baixa produção de IL-2 (Th1) no grupo coinfectado (HIV+/HPV+). O estímulo com a vacina, induziu uma alta produção de IL-2 nos HIV+/HPV- e HIV-/HPV-, porém sem significância estatística (Figura 15).

Figura 15: Produção de IL-2 nos 4 grupos de estudo.

➤ IL-10

Foi observada elevada produção de IL-10 (Th2) nos grupos HIV+/HPV+ e HIV-/HPV+ em ambas as condições de cultura. Ao estímulo de proteína E7, observou-se maior produção em relação ao estímulo da vacina, entretanto sem significância estatística.

Quando comparados os níveis de IL-10 entre os grupos sob estímulo da vacina, encontrou-se significância estatística entre a produção de IL-10 do grupo coinfectado (HIV+/HPV+) e grupo infectado somente por HIV (HIV+/HPV-) [$p < 0.0001$]; grupo coinfectado (HIV+/HPV+) e grupo controle (HIV-/HPV-) [$p < 0.0001$]. [Figura 17].

Figura 16: Produção de IL-10 nos 4 grupos de estudo.

➤ **IL-6**

A citocina IL-6, do perfil Th2, foi a citocina mais produzida entre todas as citocinas descritas, em todos os grupos e todas as condições de cultura, E7 (figuras 19, 20, 21, 22) e Vacina (Figuras 23, 24, 25, 26). Observou-se elevada produção de IL-6 em todos os grupos, principalmente entre o grupo HIV+/HPV+, em ambas as condições de cultura celular. Sob estímulo de proteína E7, a produção de IL-6 do grupo HIV+/HPV+, quando comparada aos grupos HIV-/HPV+, HIV+/HPV- e HIV-/HPV-, mostrou significância estatística ($p < 0.0005$; $p < 0.0001$ e $p < 0.0436$, respectivamente). Observou-se significância estatística também na produção de IL-6 entre os grupos HIV+/HPV- e HIV-/HPV- [$p < 0.0241$] [Figura 18].

Sob o estímulo da vacina Gardasil, também foi observada elevada produção de IL-6 no grupo HIV+/HPV+. Quando comparado este grupo com os demais grupos de estudo, encontramos significância estatística em todas as comparações entre este grupo e os grupos HIV-/HPV+, HIV+/HPV- e HIV-/HPV-; ($p < 0.0009$; $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$, respectivamente).

Também observamos significância estatística entre o grupo HIV-/HPV+ e os grupos HIV+/HPV- e HIV-/HPV- ($p<0.0057$ e $p<0.0381$, respectivamente).

Figura 17: Produção de IL-6 nos 4 grupos de estudo.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DE PROTEÍNA E7 DE HPV-16 NO GRUPO HIV+/HPV+

Figura 18: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV+ sob estímulo de proteína E7.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DE PROTEÍNA E7 DE HPV-16 NO GRUPO HIV-/HPV+

Figura 19: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV+ sob estímulo de proteína E7.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DE PROTEÍNA E7 DE HPV-16 NO GRUPO HIV+/HPV-

Figura 20: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV- sob estímulo de proteína E7.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DE PROTEÍNA E7 DE HPV-16 NO GRUPO HIV-/HPV-

Figura 21: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV- sob estímulo de proteína E7.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DA VACINA GARDASIL NO GRUPO HIV+/HPV+

Figura 22: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV+ sob estímulo da vacina Gardasil.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DA VACINA GARDASIL NO GRUPO HIV-/HPV+

Figura 23: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV+ sob estímulo da vacina Gardasil.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DA VACINA GARDASIL NO GRUPO HIV+/HPV-

Figura 24: Produção de Citocinas no grupo HIV+/HPV- sob estímulo da vacina Gardasil.

PRODUÇÃO DE CITOCINAS COM ESTÍMULO DA VACINA GARDASIL NO GRUPO HIV-/HPV-

Figura 25: Produção de Citocinas no grupo HIV-/HPV- sob estímulo da vacina Gardasil.

DISCUSSÃO

Discussão

Perfil de Resposta Imunológica Th1/Th2

Os Papilomavírus são vírus de DNA quem induzem transformação celular epitelial durante o curso da infecção. A infecção com tipos oncogênicos de HPV pode resultar em lesões precursoras, como neoplasia intraepitelial cervical, que geralmente regredem quando uma resposta imunológica apropriada é ativada contra o vírus. A infecção persistente de HPV é requisito necessário para a progressão neoplásica e a falha no *clearence* viral tem sido atribuída a uma deficiência na resposta imunológica (Kloth *et al.*, 2008).

Doenças causadas por HPV são caracterizadas por ausência de resposta citotóxica específica para HPV e ausência de células TCD4+ do tipo Th1 que secretam IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Estes tipos celulares são críticos na geração efetiva de imunidade adaptativa mediada por linfócitos T antivirais (James *et al.*, 2011). As citocinas são moléculas vitais para guiar uma resposta imunológica eficiente contra inúmeros patógenos intracelulares (Scott *et al.*, 2006).

Já foi descrito que uma polarização da resposta Th1 está associada com o *clearence* da infecção por HPV e a regressão das lesões cervicais, enquanto as citocinas imunossupressivas (Th2) são associadas com persistência viral e progressão das lesões cervicais (Tsukui *et al.*, 1996; Azar *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2008). Poucos trabalhos na literatura, principalmente no Brasil, foram publicados demonstrando essa mudança de perfil de resposta Th1/Th2 na infecção por HPV. Além também da utilização de diferentes metodologias para análise do perfil de resposta imune.

Este trabalho analisou o perfil Th através de citometria de fluxo de pacientes que formaram 4 grupos: **Grupo A**, soropositivos para o HIV-1 e com lesão decorrente de HPV (**HIV+/HPV+**); **Grupo B**, soronegativos para o HIV-1 e com lesão causada por HPV (**HIV-/HPV+**); **Grupo C**, soropositivos para o HIV e negativos para HPV (**HIV+/HPV-**) e o **Grupo D**, controle, com voluntários saudáveis (**HIV-/HPV-**).

As análises dos dados demonstraram uma elevada produção de citocinas tanto do perfil Th1 (IFN- γ e TNF- α) quanto do perfil Th2 (IL-10 e IL-6) entre os pacientes coinfectados pelo HIV-1 e HPV, quando comparados com os demais grupos de estudo. A infecção pelo HIV por si só causa uma desregulação na produção de citocinas (Willians *et al.*, 2013). Além do que, pouco se conhece se a coinfecção por HIV afeta a síntese de citocinas do

perfil Th1 e Th2 em pacientes infectados pelo Papilomavírus Humano. Sabe-se que pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam altas prevalências de HPV, mais persistência por tipos oncogênicos e progressão mais rápida para o câncer (Lee *et al.*, 1999).

Os dados deste trabalho sugerem uma forte imunomodulação na coinfeção HIV e HPV, uma vez que, estes níveis elevados não foram observados nos demais grupos. Estes resultados corroboram os resultados de outro trabalho que demonstrou altos níveis de IL-6 e IL-10 em mulheres infectadas pelo HIV e HPV. Os autores sugerem que a presença destas coinfeções no trato genital pode causar um desbalanço nos níveis de citocinas, o que pode facilitar as infecções oportunistas (Guha & Chatterjee, 2009).

A mediana dos níveis de citocinas foi calculada. Foi observado que, sob o estímulo da proteína E7 e da vacina Gardasil, a mediana dos níveis de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) do grupo HIV+/HPV+ é inferior quando comparados aos níveis dos demais grupos de estudo. Entretanto, quando foi analisada a produção de citocinas do perfil Th2 (IL-6 e IL-10) o grupo coinfectado HIV+/HPV+ demonstrou níveis mais elevados do que os demais grupos (Tabela 04).

Com isto, comprovamos que o grupo HIV+/HPV+ tem uma produção maior de citocinas do perfil Th2 quando comparados a outros indivíduos, corroborando outros estudos que comprovam este desbalanço, principalmente em pacientes com lesões associadas ao HPV, promovendo uma progressão mais rápida a lesões precursoras e cânceres. Um trabalho realizado em 2007 demonstrou que as citocinas do perfil Th2 eram produzidas em maiores níveis no sangue de mulheres com displasia cervical, acompanhando o aumento do grau de lesão, NIC II e NIC III (Bais *et al.*, 2007). Um trabalho publicado em 1999 demonstrou produção de IL-6 (Th2) em secreções cérvico-vaginais, com níveis aumentados em mulheres com lesão quando comparadas ao grupo controle, relacionando-se a produção de IL-6 à severidade da neoplasia cervical (Tjiong *et al.*, 1999).

➤ **IL-17**

Há duas décadas atrás foi proposto que os linfócitos TCD4+ diferenciam-se em dois tipos, com funções e padrões de citocinas específicos, denominados Th1 e Th2. A partir de 2005, um terceiro tipo celular foi identificado: Th17. Alguns estudos demonstram que a IL-17 favorece o crescimento de tumores e que estes efeitos são superiores aos efeitos anti-tumorais de células T. Em câncer de próstata, por exemplo, é bem definida a produção de receptores de IL-17. No câncer de ovário, as células Th17 encontram-se aumentadas, com os

autores reportando um papel patogênico da IL-17 no desenvolvimento do câncer (Tesmer et al., 2008). Não existem dados na literatura, relacionando os níveis de IL-17 com lesões ou câncer relacionados ao HPV.

Nossos dados demonstraram um aumento na produção de IL-17 em pacientes infectados pelo HPV-16, com lesão, sob estímulo da vacina Gardasil (Figura 12), porém não foi encontrada significância estatística. Entretanto, estes dados podem ser importantes para entendermos os mecanismos em que alguns pacientes podem evoluir mais rapidamente para o câncer e outros não.

➤ **IFN- γ**

Nosso estudo demonstrou que o grupo coinfetado demonstrava níveis mais elevados de IFN- γ quando comparados aos demais grupos, tanto no estímulo de E7 quanto no estímulo da vacina. Estes dados corroboram dados anteriores publicados por Hong *et al.*, (1998), em pacientes com TCD4+ >500 cels/mm³, onde foi observado aumento de IL-2 e IFN- γ , sugerindo que o perfil de citocinas pode ser influenciado pela infecção pelo HIV, na era pré-HAART (Hong *et al.*, 1998). Com a HAART, ocorre aumento das células TCD4+ e o perfil de citocinas mais predominante é a normalização da produção de IL-2 e INF- γ (Autran *et al.*, 1997).

➤ **TNF- α**

O controle direto da infecção do HPV pelo TNF- α ocorre pela indução da apoptose em células infectadas pelo HPV e células de câncer cervical, além de que o excesso de TNF- α pode resultar em uma resposta inflamatória prejudicial que pode contribuir para uma infecção persistente. O nível de expressão desta citocina também pode afetar os níveis de apresentação de antígeno. Apresentação insuficiente de antígenos ao linfócito T efetor pode contribuir para a persistência de HPV-16 e progressão para o câncer cervical (Deshpande et al., 2005).

Os resultados de nosso estudo demonstraram produção elevada de TNF- α no grupo HIV+/HPV+ (Figura 14). Azar et al., em 2004, demonstraram altos níveis de TNF- α em pacientes com lesão de alto grau (Azar et al., 2004). Uma vez que, os pacientes destes dois estudos eram indivíduos infectados pelo HPV-16, torna-se plausível a produção elevada de TNF- α , no grupo HIV+/HPV+, comparados aos demais grupos de estudo. Os pacientes

possuem lesões causadas por HPV-16, com algum nível inflamatório, o que pode influenciar na persistência da infecção. Porém, não foi encontrada significância estatística.

➤ **IL-2**

A IL-2 (perfil Th1) é uma importante citocina produzida pela ativação de células T e é responsável pela proliferação clonal de células T (Lin et al., 2007). Entretanto, este estudo demonstrou, sob estímulo da vacina, baixos níveis de IL-2 no grupo coinfetado (HIV+/HPV+) e infectado por HPV (HIV-/HPV+), ambos com lesão, em relação aos grupos HIV+/HPV- e HIV-/HPV-, sem lesão (Figura 15). Estes dados corroboram o trabalho de Tsukui *et al.* (1996), que foi o primeiro a demonstrar que a produção *in vitro* de citocinas Th1, principalmente IL-2, por linfócitos que responderam aos peptídeos de HPV, encontravam-se diminuídos em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (Tsukui *et al.*, 1996). Em 2003, Lee *et al.* encontraram menor proporção de linfócitos TCD4+ produzindo IL-2, IFN- γ e TNF- α em pacientes com lesões de alto grau quando comparadas com grupo controle (Lee *et al.*, 2003).

Garcia-Pineros *et al.* (2007), após incubação de linfócitos TCD4+ com VLPs de L1, demonstrou aumento significativo de citocinas Th1, principalmente IL-2 e IFN- γ (Garcia-Pineros *et al.*, 2007). A cultura de células realizadas neste estudo, sob estímulo da vacina, formada por VLPs, também induziu maior produção de IL-2, corroborando o estudo anterior, porém sem significância estatística. Este dado demonstra o potencial da vacina na indução de uma resposta Th1, resposta esta associada ao *clearence* viral.

➤ **IL-10**

Este trabalho demonstrou elevada produção de IL-10 na população coinfetada (HIV+/HPV+) e infectada somente pelo HPV (HIV-/HPV+), com significância estatística entre a produção de IL-10 do grupo coinfetado (HIV+/HPV+) e grupo infectado somente por HIV (HIV+/HPV-) [$p < 0.0001$]; grupo coinfetado (HIV+/HPV+) e grupo controle (HIV-/HPV-) [$p < 0.0001$] [Figura 17].

Os dados obtidos em relação a produção de IL-10 corroboram os resultados obtidos por Bhairavabhotla *et al.* (2007). Neste estudo foram obtidas biópsias de tumores cervicais que demonstraram a presença de mRNA de IL-10 nas amostras, explicando o estado

imunossupressivo dos pacientes com câncer cervical. Park *et al*, em 2013, demonstrou uma porcentagem elevada de células TCD3+/IL-10+, em pacientes com verrugas, sugerindo que uma mudança para o padrão Th2 de resposta e o aumento de IL-10 pode impedir o clareamento da infecção (Park et al., 2013).

Azar *et al.*, em 2004, demonstraram altos níveis de IL-10 em pacientes com lesão de baixo grau, sugerindo que esta regulação da secreção de IL-10 pode inibir a resposta imune contra a infecção por HPV em lesões cervicais de baixo grau, tornando-se um indicador útil para a resposta imune local e do estágio de lesões cervicais induzidas pelo HPV (Azar et al., 2004).

Bais *et al*, em 2007, descreveu um aumento da expressão de IL-4 e IL-10 no estágio de NIC III. Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram os resultados encontrados por Bais para a IL-10, exceto IL-4, na qual em nosso estudo não houve secreção, e com isso uma alteração do padrão Th1 para Th2 (Bais *et al.*, 2004).

➤ **IL-6**

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que vem sendo implicada no câncer cervical, embora sua função continue indefinida. Nosso estudo demonstrou níveis elevados de IL-6 no grupo coinfectado HIV+/HPV+ e HIV-/HPV+, sob estímulo da vacina.

Tjiong *et al.* (1999), demonstrou que a IL-6 estava presente em maior concentração em pacientes com câncer cervical. Estes dados corroboram os resultados obtidos por nosso estudo, demonstrando que a coinfecção HIV+/HPV+, induz a produção de IL-6 e relaciona-se com a severidade da lesão (Tjiong, et al., 1999). Wei et al., (2001), demonstrou altos níveis de IL-6 em tecido biopsiado de câncer. Com isto, sugeriu-se que um microambiente com altos níveis de IL-6, pode promover angiogênese e o desenvolvimento do câncer (Wei., 2001).

Outro estudo realizado em 2010, demonstrou a elevada produção de IL-6, comparado com o grupo controle. O que confirma nossas evidências demonstrando elevada produção de IL-6 no grupo HIV+/HPV-, com significância estatística quanto aos demais grupos de estudo (Kemp, *et al.*, 2010). O estímulo da vacina promoveu a secreção de IL-6 em níveis elevados, corroborando diversos autores.

Infelizmente, na literatura existem poucos trabalhos relacionando os níveis de citocinas, de forma individual, com respeito à história natural da infecção pelo HPV (Song *et*

al., 2008) e principalmente com a coinfeção por HIV em homens. Estudos posteriores são necessários para o entendimento da regulação da resposta imune antiviral mediada por linfócitos T a fim de desenvolver novas estratégias para mudar o equilíbrio de polarização para citocinas do tipo Th1 nos cânceres associados ao HPV (Xu *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1 - Foi demonstrada uma elevada produção de citocinas no grupo HPV+/HIV+, sugerindo uma forte imunomodulação pela coinfeção HIV/HPV.

2 – O grupo coinfectado HIV/HPV apresentou um perfil Th2 de citocinas, principalmente pela elevada produção de IL-6 e IL-10 ($p < 0.0001$, ambas as citocinas) e baixa produção de citocinas do perfil Th1.

3 – Com base na literatura, corroborando outros autores, sugerimos que IL-6 e IL-10 possam servir como biomarcadores para persistência viral, uma vez que, os pacientes soropositivos para HIV apresentam maior persistência de HPV, além de monitorar a progressão para lesões mais graves decorrentes da infecção pelo vírus.

4 – O estímulo com a vacina tetravalente mostrou-se um bom indutor de resposta Th1, em pacientes não infectados pelo HPV, uma vez que, observou-se níveis mais elevados das citocinas IFN- γ e IL-2, quando comparados com o estímulo da proteína E7. Entretanto, não observou-se tal aumento em pacientes já infectados pelo HPV, proporcionando uma proteção mais eficaz no grupo que nunca entrou em contato anteriormente com o vírus.

5 – Mais estudos abordando a IL-17 e sua relação com os tipos de cânceres associados ao HPV devem ser realizados, uma vez que alguns estudos demonstram que a IL-17 favorece o crescimento de tumores e que estes efeitos são superiores aos efeitos anti-tumorais de células T. Nosso estudo demonstrou um aumento de IL-17 em pacientes infectados pelo HPV, com lesão. Com isso, torna-se importante o entendimento desta citocina na progressão/indução de lesões e câncer associados ao HPV.

6 – Com dados obtidos neste estudo, torna-se importante a realização de novas pesquisas, de forma mais detalhada, sobre as citocinas do perfil Th1/Th2/Th17 e sua relação com os graus de lesão e câncer associado ao HPV, a fim de entendermos melhor o papel destas moléculas na resposta imunológica antitumoral, principalmente em homens e na população soropositiva para o HIV, cuja informação são muito escassas e/ou inexistentes na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarossi, A., E. Casolati, M. Valieri, E. Ferrazzi, G. Maffei, D. Trabattini e M. Clerici. Mucosal immune response to Human Papilloma Virus (HPV) infection in HIV positive women. Med Wieku Rozwoj, v.7, n.4 Pt 1, Oct-Dec, p.495-502. 2003.
- Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debre e J. Leibowitch. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. Science, v.277, n.5322, Jul 4, p.112-6. 1997.
- Azar, K. K., M. Tani, H. Yasuda, A. Sakai, M. Inoue e T. Sasagawa. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. Hum Pathol, v.35, n.11, Nov, p.1376-84. 2004.
- Bais, A. G., I. Beckmann, J. Lindemans, P. C. Ewing, C. J. Meijer, P. J. Snijders e T. J. Helmerhorst. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. J Clin Pathol, v.58, n.10, Oct, p.1096-100. 2005.
- Baldwin, S. B., D. R. Wallace, M. R. Papenfuss, M. Abrahamsen, L. C. Vaught, J. R. Kornegay, J. A. Hallum, S. A. Redmond e A. R. Giuliano. Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic. J Infect Dis, v.187, n.7, Apr 1, p.1064-70. 2003.
- Banura, C., F. M. Mirembe, A. R. Katahoire, P. B. Namujju, A. K. Mbonye e F. W. Mangen. Epidemiology of HPV genotypes in Uganda and the role of the current preventive vaccines: A systematic review. Infect Agent Cancer, v.6, n.1, Jul 12, p.11. 2011.
- Baseman, J. G. e L. A. Koutsky. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol, v.32 Suppl 1, Mar, p.S16-24. 2005.
- Beglin, M., M. Melar-New e L. Laimins. Human papillomaviruses and the interferon response. J Interferon Cytokine Res, v.29, n.9, Sep, p.629-35. 2009.
- Bermudez-Morales, V. H., O. Peralta-Zaragoza e V. Madrid-Marina. [Gene therapy with cytokines against cervical cancer]. Salud Publica Mex, v.47, n.6, Nov-Dec, p.458-68. 2005.
- Bhairavabhotla RK, Verm V, Tongaonkar H, Shastri S, Dinshaw K, Chiplunkar S. Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. Indian J Biochem Biophys. 2007 Oct;44(5):350-6.
- Bharti, A. C., S. Shukla, S. Mahata, S. Hedau e B. C. Das. Anti-human papillomavirus therapeutics: facts & future. Indian J Med Res, v.130, n.3, Sep, p.296-310. 2009.
- Bhat, P., S. R. Mattarollo, C. Gosmann, I. H. Frazer e G. R. Leggatt. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. Immunol Rev, v.239, n.1, Jan, p.85-98. 2011.

Boccardo, E., C. V. Manzini Baldi, A. F. Carvalho, T. Rabachini, C. Torres, L. A. Barreta, H. Brentani e L. L. Villa. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. Carcinogenesis, v.31, n.3, Mar, p.521-31. 2009.

Boccardo, E., F. Noya, T. R. Broker, L. T. Chow e L. L. Villa. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. Virology, v.328, n.2, Oct 25, p.233-43. 2004.

Bolpetti, A., J. S. Silva, L. L. Villa e A. P. Lepique. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. BMC Immunol, v.11, p.27. 2010.

Carter, J. R., Z. Ding e B. R. Rose. HPV infection and cervical disease: a review. Aust N Z J Obstet Gynaecol, v.51, n.2, Apr, p.103-8. 2011.

Clerici, M., M. Merola, E. Ferrario, D. Trabattoni, M. L. Villa, B. Stefanon, D. J. Venzon, G. M. Shearer, G. De Palo e E. Clerici. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. J Natl Cancer Inst, v.89, n.3, Feb 5, p.245-50. 1997.

Costa, F. A., R. C. Da Silva, L. B. Arruda, A. J. Duarte e J. Casseb. Prevalence of human papillomaviruses in urine samples of male patients infected with HIV-1 in Sao Paulo, Brazil. J Med Virol, v.81, n.12, Dec, p.2007-11. 2009.

De Gruijl, T. D., H. J. Bontkes, A. J. Van Den Muysenberg, J. W. Van Oostveen, M. J. Stukart, R. H. Verheijen, N. Van Der Vange, P. J. Snijders, C. J. Meijer, J. M. Walboomers e R. J. Scheper. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. Eur J Cancer, v.35, n.3, Mar, p.490-7. 1999.

De Sanjose, S., M. Diaz, X. Castellsague, G. Clifford, L. Bruni, N. Munoz e F. X. Bosch. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis, v.7, n.7, Jul, p.453-9. 2007.

De Sanjose, S. e J. Palefsky. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. Virus Res, v.89, n.2, Nov, p.201-11. 2002.

Delgado, F. G., E. Martinez, M. A. Cespedes, M. M. Bravo, M. C. Navas e A. L. Combita Rojas. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. Immunology, Sep 5. 2008.

_____. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. Immunology, v.126, n.4, Apr, p.523-34. 2009.

Deshpande, A; Nolan, JP; White, P.S; Valdez, Y.E.; Hunt, W.C.; Peyton, C.L.; Wheeler, C.M. TNF-a Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus16-Associated Cervical Cancer. The Journal of Infectious Diseases; 2005; 191:969-76

Dietz, C. A. e C. R. Nyberg. Genital, oral, and anal human papillomavirus infection in men who have sex with men. J Am Osteopath Assoc, v.111, n.3 Suppl 2, Mar, p.S19-25. 2011.

Dos Ramos Farias, M. S., M. A. Picconi, M. N. Garcia, J. V. Gonzalez, J. Basiletti, L. Pando Mde e M. M. Avila. Human papilloma virus genotype diversity of anal infection among trans (male to female transvestites, transsexuals or transgender) sex workers in Argentina. J Clin Virol, v.51, n.2, Jun, p.96-9. 2011.

El-Sherif, A. M., R. Seth, P. J. Tighe e D. Jenkins. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. J Pathol, v.195, n.2, Sep, p.179-85. 2001.

Fernandes, A. P., M. A. Goncalves, G. Duarte, F. Q. Cunha, R. T. Simoes e E. A. Donadi. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. Virology, v.334, n.2, Apr 10, p.294-8. 2005.

Fernandes, A. P., M. A. Goncalves, R. T. Simoes, C. T. Mendes-Junior, G. Duarte e E. A. Donadi. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.140, n.2, Oct, p.241-4. 2008.

Fontaine, J., C. Hankins, D. Money, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy e F. Coutlee. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV. J Clin Virol, v.43, n.3, Nov, p.307-12. 2008.

Fontaine, V., C. Mascaux, C. Weyn, A. Bernis, N. Celio, P. Lefevre, L. Kaufman e C. Garbar. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. J Clin Microbiol, v.45, n.3, Mar, p.928-34. 2007.

Franco, E. L. Commentary: Health inequity could increase in poor countries if universal HPV vaccination is not adopted. BMJ, v.335, n.7616, Aug 25, p.378-9. 2007.

Franco, E. L. e D. M. Harper. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. Vaccine, v.23, n.17-18, Mar 18, p.2388-94. 2005.

Garcia-Pineros, A. J., A. Hildesheim, R. Herrero, M. Trivett, M. Williams, I. Atmetlla, M. Ramirez, M. Villegas, M. Schiffman, A. C. Rodriguez, R. D. Burk, M. Hildesheim, E. Freer, J. Bonilla, C. Bratti, J. A. Berzofsky e L. A. Pinto. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. Cancer Res, v.66, n.22, Nov 15, p.11070-6. 2006.

Ghim, S. J., J. Sundberg, G. Delgado e A. B. Jenson. The pathogenesis of advanced cervical cancer provides the basis for an empirical therapeutic vaccine. Exp Mol Pathol, v.71, n.3, Dec, p.181-5. 2001.

Goncalves, M. A., G. Randi, A. Arslan, L. L. Villa, M. N. Burattini, S. Franceschi, E. A. Donadi e E. Massad. HPV type infection in different anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. Infect Agent Cancer, v.3, p.5. 2008.

Gravitt, P. E., A. Hildesheim, R. Herrero, M. Schiffman, M. E. Sherman, M. C. Bratti, A. C. Rodriguez, L. A. Morera, F. Cardenas, F. P. Bowman, K. V. Shah e P. A. Crowley-Nowick. Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions. J Clin Immunol, v.23, n.3, May, p.175-83. 2003.

Guha, D. e R. Chatterjee. Cytokine levels in HIV infected and uninfected Indian women: correlation with other STAs. Exp Mol Pathol, v.86, n.1, Feb, p.65-8. 2009.

Hagensee, M. E., J. E. Cameron, J. E. Leigh e R. A. Clark. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. Am J Med Sci, v.328, n.1, Jul, p.57-63. 2004.

Han, J. E., H. K. Kim, S. A. Park, S. J. Lee, H. J. Kim, G. H. Son, Y. T. Kim, Y. J. Cho e N. G. Lee. A nontoxic derivative of lipopolysaccharide increases immune responses to Gardasil HPV vaccine in mice. Int Immunopharmacol, v.10, n.2, Feb, p.169-76. 2009.

Hariharan, I. e M. R. Pillai. Genotypes of the human papillomavirus: relevance to Indian field trials of the vaccine. Indian J Med Res, v.130, n.3, Sep, p.247-60. 2009.

Hebner, C. M. e L. A. Laimins. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. Rev Med Virol, v.16, n.2, Mar-Apr, p.83-97. 2006.

Hong, M. A., V. L. Wakim, S. J. Salomao, L. S. Camargo, J. Casseb e A. J. Duarte. IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4 secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are related to CD4+ T cells and clinical status in Brazilian HIV-1-infected subjects. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.40, n.6, Nov-Dec, p.351-4. 1998.

IARC, I. A. F. R. O. C.-. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Human Papillomaviruses. v.90. 2007.

James, E. A., J. A. Devoti, D. W. Rosenthal, L. J. Hatam, B. M. Steinberg, A. L. Abramson, W. W. Kwok e V. R. Bonagura. Papillomavirus-specific CD4+ T cells exhibit reduced STAT-5 signaling and altered cytokine profiles in patients with recurrent respiratory papillomatosis. J Immunol, v.186, n.11, Jun 1, p.6633-40. 2011.

Kahesa, C., J. Mwaiselage, H. R. Wabinga, T. Ngoma, J. N. Kalyango e C. A. Karamagi. Association between invasive cancer of the cervix and HIV-1 infection in Tanzania: the need for dual screening. BMC Public Health, v.8, p.262. 2008.

Kemp, TJ; Hildesheim,A; García-Piñeres, A; Williams, M.C; Shearer, GM; Rodriguez, AC; Schiffman M; Burk, R.; Freer, JH.; Bonilla, J.; Herrero, R e L. Pinto, LA. Elevated Systemic Levels of Inflammatory Cytokines in Older Women with Persistent Cervical HPV Infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 August ; 19(8): 1954–1959.

Kloth, J. N., A. Gorter, N. Ter Haar, W. E. Corver, E. S. Jordanova, G. G. Kenter e G. J. Fleuren. Lack of TNF-alpha mRNA expression in cervical cancer is not associated with loss of heterozygosity at 6p21.3, inactivating mutations or promoter methylation. Mol Immunol, v.45, n.1, Jan, p.152-9. 2008.

Kreuter, A., N. H. Brockmeyer, P. Altmeyer e U. Wieland. Anal intraepithelial neoplasia in HIV infection. J Dtsch Dermatol Ges, v.6, n.11, Nov, p.925-34. 2008.

Kreuter, A. e U. Wieland. Human papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men. Curr Opin Infect Dis, v.22, n.2, Apr, p.109-14. 2009.

Kumaraswamy, K. L. e M. Vidhya. Human papilloma virus and oral infections: An update. J Cancer Res Ther, v.7, n.2, Apr-Jun, p.120-7. 2011.

Lee, B. N., M. Follen, D. Y. Shen, A. Malpica, K. Adler-Storthz, W. T. Shearer e J. M. Reuben. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4⁺ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. Clin Diagn Lab Immunol, v.11, n.2, Mar, p.239-44. 2004.

Lee, B. N., M. Follen, G. Tortolero-Luna, N. Eriksen, A. Helfgott, H. Hammill, W. T. Shearer e J. M. Reuben. Synthesis of IFN-gamma by CD8(+) T cells is preserved in HIV-infected women with HPV-related cervical squamous intraepithelial lesions. Gynecol Oncol, v.75, n.3, Dec, p.379-86. 1999.

Lepique, A. P., T. Rabachini e L. L. Villa. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.104, n.1, Feb, p.1-10. 2009.

Lin, C-T; Tsai, Y-C; He, L; Yeh, C-N; Chang, T-C; Soong, Y; Monie, A; Hung, C-F; Lai, C-H. DNA vaccines encoding IL-2 linked to HPV-16 E7 antigen generate enhanced E7-specific CTL responses and antitumor activity. Immunol Lett. 2007 December 15; 114(2): 86-93.

Lopez, M. C. e M. A. Stanley. Cytokine profile of draining lymph node lymphocytes in mice grafted with syngeneic keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. J Gen Virol, v.81, n.Pt 5, May, p.1175-82. 2000.

Lorenzon, L., M. Ferri, E. Pillozzi, M. R. Torrisi, V. Ziparo e D. French. Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature. Int J Colorectal Dis, v.26, n.2, Feb, p.135-42. 2011.

Macleod, I. J., B. O'donnell, S. Moyo, S. Lockman, R. L. Shapiro, M. Kayembe, E. Van Widenfelt, J. Makhema, M. Essex e C. Wester. Prevalence of human papillomavirus genotypes and associated cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women in Botswana. J Med Virol, v.83, n.10, Oct, p.1689-95. 2011.

Modis, Y., B. L. Trus e S. C. Harrison. Atomic model of the papillomavirus capsid. EMBO J, v.21, n.18, Sep 16, p.4754-62. 2002.

Moody, C. A. e L. A. Laimins. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer, v.10, n.8, Aug, p.550-60. 2010.

Nicol, A. F., A. T. Fernandes e G. Bonecini-Almeida Mda. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection -- review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.100, n.1, Feb, p.1-12. 2005.

Nicol, A. F., A. T. Fernandes, B. Grinsztejn, F. Russomano, E. S. Jr, A. Tristao, A. Perez Mde, G. J. Nuovo, O. Martinez-Maza e G. Bonecini-Almeida Mda. Distribution of immune cell subsets and cytokine-producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV)-infected women: influence of HIV-1 coinfection. Diagn Mol Pathol, v.14, n.1, Mar, p.39-47. 2005.

No, J. H., M. K. Kim, Y. T. Jeon, Y. B. Kim e Y. S. Song. Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention. Mol Carcinog, v.50, n.4, Apr, p.244-53. 2010.

Olsson, S. E., S. K. Kjaer, K. Sigurdsson, O. E. Iversen, M. Hernandez-Avila, C. M. Wheeler, G. Perez, D. R. Brown, L. A. Koutsky, E. H. Tay, P. Garcia, K. A. Ault, S. M. Garland, S. Leodolter, G. W. Tang, D. G. Ferris, J. Paavonen, M. Lehtinen, M. Steben, F. X. Bosch, J. Dillner, E. A. Joura, S. Majewski, N. Munoz, E. R. Myers, L. L. Villa, F. J. Taddeo, C. Roberts, A. Tadesse, J. Bryan, R. Maansson, S. Vuocolo, T. M. Hesley, A. Saah, E. Barr e R. M. Haupt. Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with serological evidence of prior vaccine type HPV infection. Hum Vaccin, v.5, n.10, Oct, p.696-704. 2009.

Park HJ, Choi YW, Kim SH, Shin MS, Lee SW, Oh MK, Choi HY. Change in cytokines in patients with warts after contact immunotherapy with squaric acid dibutylester. Clin Exp Dermatol. 2013 Apr 23. doi: 10.1111/ced.12075.

Rautava, J. e S. Syrjanen. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. J Am Dent Assoc, v.142, n.8, Aug, p.905-14. 2011.

Richwald, G. A. Imiquimod. Drugs Today (Barc), v.35, n.7, Jul, p.497-511. 1999.

Sapy, T., R. Poka, K. Szarka, J. Konya, S. Huga e Z. Hernadi. Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.138, n.2, Jun, p.194-8. 2008.

Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez e S. Wacholder. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet, v.370, n.9590, Sep 8, p.890-907. 2007.

Schiffman, M., N. Wentzensen, S. Wacholder, W. Kinney, J. C. Gage e P. E. Castle. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. J Natl Cancer Inst, v.103, n.5, Mar 2, p.368-83. 2010.

Schiller, J. T., X. Castellsague, L. L. Villa e A. Hildesheim. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. Vaccine, v.26 Suppl 10, Aug 19, p.K53-61. 2008.

Scott, M. E., Y. Ma, S. Farhat, S. Shiboski e A. B. Moscicki. Covariates of cervical cytokine mRNA expression by real-time PCR in adolescents and young women: effects of Chlamydia trachomatis infection, hormonal contraception, and smoking. J Clin Immunol, v.26, n.3, May, p.222-32. 2006.

Senba, M., A. Kumatori, S. Fujita, P. Jutavijittum, A. Yousukh, T. Moriuchi, T. Nakamura e K. Toriyama. The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand. J Med Virol, v.78, n.10, Oct, p.1341-6. 2006.

Seresini, S., M. Origoni, F. Lillo, L. Caputo, A. M. Paganoni, S. Vantini, R. Longhi, G. Taccagni, A. Ferrari, C. Doglioni, P. Secchi e M. P. Protti. IFN-gamma produced by human papilloma virus-18 E6-specific CD4+ T cells predicts the clinical outcome after surgery in patients with high-grade cervical lesions. J Immunol, v.179, n.10, Nov 15, p.7176-83. 2007.

Sharma, A., M. Rajappa, A. Saxena e M. Sharma. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. Int J Gynecol Cancer, v.17, n.4, Jul-Aug, p.879-85. 2007.

Sheinfeld Gorin, S. N., B. A. Glenn e R. B. Perkins. The human papillomavirus (HPV) vaccine and cervical cancer: Uptake and next steps. Adv Ther, Aug 1. 2011.

Silva, R. J., J. Casseb, M. A. Andreoli e L. L. Villa. Persistence and clearance of HPV from the penis of men infected and non-infected with HIV. J Med Virol, v.83, n.1, Jan, p.127-31.

Simonato, L. E., J. F. Garcia, M. L. Sundefeld, N. J. Mattar, L. A. Veronese e G. I. Miyahara. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. J Oral Pathol Med, v.37, n.10, Nov, p.593-8. 2008.

Snijders, P. J., D. A. Heideman e C. J. Meijer. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. APMIS, v.118, n.6-7, Jun, p.520-8. 2010.

Snow, A. N. e J. Laudadio. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. Adv Anat Pathol, v.17, n.6, Nov, p.394-403. 2010.

Song, S. H., J. K. Lee, N. W. Lee, H. S. Saw, J. S. Kang e K. W. Lee. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). Gynecol Oncol, v.108, n.3, Mar, p.543-8. 2008.

Song, S. H., J. K. Lee, O. S. Seok e H. S. Saw. The relationship between cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. Gynecol Oncol, v.104, n.3, Mar, p.732-8. 2007.

Stanley, M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine, v.24 Suppl 1, Mar 30, p.S16-22. 2006.

_____. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. Gynecol Oncol, v.117, n.2 Suppl, May, p.S5-10. 2010.

Stanley, M. A. Immune responses to human papilloma viruses. Indian J Med Res, v.130, n.3, Sep, p.266-76. 2009.

Stefanaki, C., M. Hadjivassiliou, I. Katzouranis, G. Bethimoutis, E. Nicolaidou, V. Anyfantakis, E. Lagogianni, C. Caroni, A. Panagiotopoulos, C. Antoniou e A. Katsambas. Prognostic factors for the response to treatment in males with genital warts. J Eur Acad Dermatol Venereol, v.23, n.10, Oct, p.1156-60. 2009.

Syrjanen, S., G. Lodi, I. Von Bultzingslowen, A. Aliko, P. Arduino, G. Campisi, S. Challacombe, G. Ficarra, C. Flaitz, H. M. Zhou, H. Maeda, C. Miller e M. Jontell. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. Oral Dis, v.17 Suppl 1, Apr, p.58-72. 2011.

Taylor, G., T. Wolff, N. Khanna, P. Furth e P. Langenberg. Genital dysplasia in women infected with human immunodeficiency virus. J Am Board Fam Pract, v.17, n.2, Mar-Apr, p.108-13. 2004.

Terlou, A., M. Van Seters, A. Kleinjan, C. Heijmans-Antonissen, L. A. Santegoets, I. Beckmann, M. Van Beurden, T. J. Helmerhorst e L. J. Blok. Imiquimod-induced clearance of HPV is associated with normalization of immune cell counts in usual type vulvar intraepithelial neoplasia. Int J Cancer, v.127, n.12, Dec 15, p.2831-40. 2010.

Tesmer, LA; Lundy, SK; Sarkar, S; Fox, DA. Th17 cells in human disease. Immunol Rev. 2008 June ; 223: 87–113.

Ming Y. Tjong, MY; van der Vange, N; ten Kate, F.J.W; Tjong-A-Hung, SP; ter Schegget, J; Burger, M.P.M.; Out, T.A. Increased IL-6 and IL-8 Levels in Cervicovaginal Secretions of Patients with Cervical Cancer. Gynecologic Oncology; Volume 73, Issue 2, May 1999, Pages 285–291

Tobery, T. W., J. F. Smith, N. Kuklin, D. Skulsky, C. Ackerson, L. Huang, L. Chen, J. C. Cook, W. L. McClements e K. U. Jansen. Effect of vaccine delivery system on the induction of HPV16L1-specific humoral and cell-mediated immune responses in immunized rhesus macaques. Vaccine, v.21, n.13-14, Mar 28, p.1539-47. 2003.

Tsukui, T., A. Hildesheim, M. H. Schiffman, J. Lucci, 3rd, D. Contois, P. Lawler, B. B. Rush, A. T. Lorincz, A. Corrigan, R. D. Burk, W. Qu, M. A. Marshall, D. Mann, M. Carrington, M. Clerici, G. M. Shearer, D. P. Carbone, D. R. Scott, R. A. Houghten e J. A. Berzofsky. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. Cancer Res, v.56, n.17, Sep 1, p.3967-74. 1996.

Van Der Burg, S. H., A. De Jong, M. I. E. Van Poelgeest, J. M. Van Der Hulst, J. W. Drijfhout, G. J. Fleuren, C. J. M. Melief, G. Kenter e R. Offringa. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+T-cell immunity against early antigens E2 and E6. Cancer Research, v.64, n.15, Aug 1, p.5449-5455. 2004.

Villa, L. L. Overview of the clinical development and results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) vaccine. Int J Infect Dis, v.11 Suppl 2, Nov, p.S17-25. 2007.

Villa, L. L., K. A. Ault, A. R. Giuliano, R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, D. R. Brown, A. Ferenczy, D. M. Harper, L. A. Koutsky, R. J. Kurman, M. Lehtinen, C. Malm, S. E. Olsson, B. M. Ronnett, F. E. Skjeldestad, M. Steinwall, M. H. Stoler, C. M. Wheeler, F. J. Taddeo, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, R. Marchese, M. T. Esser, J. Bryan, K. U. Jansen, H. L. Sings, G. M. Tamms, A. J. Saah e E. Barr. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. Vaccine, v.24, n.27-28, Jul 7, p.5571-83. 2006.

Vorstters, A., I. Micalessi, J. Bilcke, M. Ieven, J. Bogers e P. Van Damme. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, Aug 5. 2011.

Xu, Y., K. J. Zhu, N. Zhu, D. H. Jiang, X. Z. Chen e H. Cheng. Expression of Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells and Th1/Th2, Tc1/Tc2 profiles in the peripheral blood of patients with condyloma acuminatum. Clin Exp Dermatol, v.34, n.2, Mar, p.229-35. 2009.

Wei, L-H; Kuo, M-L; Chen, C-A.; Cheng, W-F; Cheng, S-P; Hsieh, F-J; Hsieh, C-Y. Interleukin-6 in Cervical Cancer: The Relationship with Vascular Endothelial Growth Factor. Gynecologic Oncology; Volume 82, Issue 1, July 2001, Pages 49–56

Wilke, C. M.; Kryczek, I.; Wei, S.; Zhao, E.; Wu, k.; Wang, G.; Zou, W. Th17 cells in cancer: help or hindrance? Carcinogenesis, Vol. 32, No 5, pp. 643-649, 2011.

Williams A, Steffens F, Reinecke C, Meyer D. The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: a multivariate cytokinomics approach. Cytokine. 2013 Feb;61(2):521-6.

Zheng, Z. M. e C. C. Baker. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. Front Biosci, v.11, p.2286-302. 2006.

Zhu, N., H. Cheng, K. J. Zhu, X. Zhang, Y. Xu e D. H. Jiang. [Detection of peripheral blood Th1/Th2 and Tc1/Tc2 subsets in patients with condyloma acuminatum and its significance]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, v.23, n.3, Jun, p.229-31. 2009.

Zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta, v.1288, n.2, Oct 9, p.F55-78. 1996.

Zur Hausen. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer, v.2, n.5, May, p.342-50. 2002.