INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA EM DERMATOLOGIA E
IMUNODEFICIÊNCIAS – LIM 56

Resposta específica aos antígenos da vacina bivalente anti-HPV em homens
infectados pelo HIV-1

Proponente: Adriele Souza Fontes

Orientador: Prof. Dr. Jorge Casseb

São Paulo

Julho de 2014

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Fontes, Adriele Souza

Resposta específica aos antígenos da vacina anti-HPV em homens infectados pelo HIV-1 / Adriele Souza Fontes. – São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb

Descritores: 1. HPV. 2. HIV. 3. VACINAS.

USP/IMTSP/BIB-03/2014.

Adriele Souza Fontes

Resposta específica aos antígenos da vacina bivalente anti-HPV em homens infectados pelo HIV-1.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: Adriele Souza Fontes

Título da Dissertação: “Resposta Específica aos Antígenos da Vacina anti-HPV em homens infectados pelo HIV-1”

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em __/__/__ considerou

( ) APROVADO(A) ( ) REPROVADO(A)

Examinador (a)

Assinatura.....

Nome: Expedito José de Albuquerque Luna

Instituição: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT / USP

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome: Bosco Christiano Maciel da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Presidente

Assinatura.....

Nome: Jorge Simão do Rosário Casseb

Instituição: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT / USP

Como dizia Manoel de Barros “ A importância de uma coisa só pode ser medida pelo encantamento que a coisa nos produz”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por inúmeras bênçãos recebidas em todos os dias da minha vida, sem Ele eu não teria conseguido.

Ao meu orientador Dr Jorge Casseb, que me concedeu a oportunidade de ser sua aluna, e depositando sua confiança, só tenho a agradecer pelos ensinamentos, paciência, e por me ajudar nessa etapa da minha vida.

Aos meus queridos PACIENTES, sem vocês esse trabalho não seria concretizado! Agradeço a confiança que depositaram no meu trabalho, me ajudando inúmeras vezes que precisei chamá-los, à vocês todo meu carinho e respeito.

A Dra Luisa Villa e Antonieta, meu muito obrigada por me receberem em seu laboratório, e dispor do tempo para a colaboração do nosso trabalho.

A minha Mãe Pedrina, pelo amor, carinho e compreensão, nos momentos bons e árduos desta jornada, por incentivar e apoiar incondicionalmente todos meus projetos de vida. Ao meu pai José, ao meu irmão Aderlan, pelo seu carinho, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, sempre acreditando e me fortalecendo nas minhas decisões, sendo o alicerce do meu crescimento, meus sobrinhos Kauã e Amanda pelos mais belos sorrisos.

Aos meus familiares, tias Ely e Adilma que foram meu alicerce aqui em São Paulo, aos meus avôs, tios, primos que sempre me apoiaram e me incentivaram nessa minha jornada acadêmica.

Aos meus irmãos de coração Suely, Sandro e Anselmo, que sempre me apoiaram e me ajudaram nessa minha jornada, meu refúgio de finais de semanas, as melhores risadas e companheirismo, amo vocês.

Aos meus queridos amigos Annacelly, Vanessa, Julia, Simara, Luan, Tainá, Barbara, obrigada por sempre acreditar e me incentivar.

A minha querida amiga Karen, que sempre esteve comigo me apoiando desde o recrutamento dos pacientes, nos experimentos, nas disciplinas realizadas, nos congressos, discussões e trocas de artigos, almoços, conversas, choros e risadas...

Ao meu grupo de Imunovirologia, Fernando, Maria, Bosco, Liã, Priscilla, Bruno, Fabrícia e Tatiane, meu muito obrigada pelas reuniões e discussões de artigos.

A minha amiga-irmã-vizinha, Iana que eu tive a honra de poder estar sempre pertinho e que ajudou muito no meu trabalho. Obrigada por tudo, por ser amiga, conselheira, por dar broncas, por vir aos sábados e domingos ao laboratório, por tudo! Principalmente, por alegrar os meus dias com os melhores brigadeiros de SP. risos

A Luciana, Grazi e Adriana, que sempre me apoiaram e demonstraram um grande carinho por mim, meu muito obrigada, vocês sempre permaneceram comigo mesmo que longe!

Queria agradecer a Jefferson, Luanda, Ciro, Ana, Denise, Ana Paula e Paula Rigato, por me ajudarem sempre que precisei tirar duvidas à vocês meu carinho e admiração pela humildade que sempre tiveram em ajudar quando precisei.

Gostaria de agradecer em especial a Edna, Noemia, Tati, Eduardo, Lúcio, Angelo e Celeste. A Todos os alunos e funcionários, meu muito obrigada por dividirem os conhecimentos e incentivos.

Queria agradecer a comissão de pós graduação do Instituto de Medicina Tropical onde realizei meu trabalho.

E a todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente por esta vitória.

Muitíssimo Obrigada de CORAÇÃO a todos vocês!

SUMARIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE SIMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	2
1.2.1 CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA.....	2
1.3.1RESPOSTA IMUNOLOGIA AO HPV.....	5
1.4.1 VACINAS.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3. METODOS.....	13
3.1 LOCAL DO ESTUDO.....	13
3.2 DESENHO DO ESTUDO.....	13
3.3 POPULAÇÃO ALVO.....	13
3.4 VACINA.....	13
3.5 CRITERIO DE INCLUSÃO.....	14
3.6 CRITERIO DE EXCLUSÃO.....	14
3.7 GRUPOS ESTUDADOS.....	14
3.8 ALGORITIMOS DE DIAGNÓSTICO.....	14
4. COLETA E PREPARO DE AMOSTRA.....	14
4.1 CONGELAMENTO.....	15
4.2 ENSAIO IMUNOENZIMATICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HPV	15
4.3 ENSAIO CITOMETRY BEAD ARRAY CBA.....	18
5. CONTROLE DE DADOS.....	18
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	18
8. RESULTADOS.....	19
9. DISSCUSSÃO.....	30
10. CONCLUSÃO.....	35
11. REFERÊNCIAS.....	36
12. ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Demonstração dos tipos dos Papilomavirus de alto risco e baixo risco oncológico	4
Tabela 2. Vacinas Profiláticas baseados em VLPs de HPV.....	8
Tabela 3. Limites de detecção das citocinas.....	18
Tabela 4. Média dos Grupos baseados pelo questionário Sócio demográfico/Comportamental.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas do papilomavirus	2
Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV.....	3
Figura 3. Avaliação pela Técnica de Elisa.....	20
Figura 3a. Avaliação sorológica pela técnica de Elisa, com VLP 16 em 25 pacientes infectados com HIV-1 e 5 controles.....	20
Figura 3b. Mensuração de anticorpos, após a vacinação de 30 dias da vacina Bivalente HPV 16-18 Cervarix.....	21
Figura 3c. Mensuração de anticorpos, após a vacinação de 4 semanas da segunda imunização (30 dias) da vacina Bivalente Cervarix.....	22
Figura 3d. Mensuração de anticorpos, após a vacinação de 4 semanas da segunda imunização (180 dias) da vacina Bivalente Cervarix.....	22
Figura 4. Produção de IL-17.....	23
Figura 4a Produção de IL-17 no tempo Basal e Figura 4b Produção de IL 17 na 1ª dose da vacinação	23
Figura 4c Produção de IL-17 na 2ª dose da vacinação e Figura 4d Produção de IL 17 na 3ª dose da vacinação.....	24
Figura 5a Produção de IL-6 no tempo Basal e Figura 5b Produção de IL 6 na 1ª dose da vacinação.....	25
Figura 5c Produção de IL-6 na 2ª dose da vacinação e Figura 5d Produção de IL 6 na 3ª dose da vacinação.....	25
Figura 6a Produção de IL-10 no tempo Basal e Figura 6b Produção de IL 10 na 1ª dose da vacinação.....	26
Figura 6c Produção de IL-10 na 2ª dose da vacinação e Figura 6d Produção de IL 10 na 3ª dose da vacinação.....	26
Figura 7a Produção de TNF- α no tempo Basal e Figura 7b Produção de TNF- α na 1ª dose da vacinação.....	27
Figura 7c Produção de IL-6 na 2ª dose da vacinação e Figura 7d Produção de IL 6 na 3ª dose da vacinação.....	28
Figura 8a Produção de IFN- γ no tempo Basal e Figura 8b Produção de IFN- γ na 1ª dose da vacinação.....	28
Figura 8c Produção de INF- γ na 2ª dose da vacinação e Figura 8d Produção de INF γ na 3ª dose da vacinação.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ABST	Substrato de peroxidase
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês, <i>Antigen-Presenting Cell</i>)
BSA	Albumina de soro bovino
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido etilenodimianotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAART	<i>Highly Active AntiRetroviral Therapy</i>
HC FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL	Interleucina
IL 6	Interleucina 6
IL 10	Interleucina 10
IL 17	Interleucina 17
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCT-HPV	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INF – γ	Interferon Gama
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana-tipo 1 (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus-1</i>)
HIL	Lesão epitelial escamosa de alto grau
HPV	Papilomavírus humano
kD	quiloDalton
LCR	Região Longa de Controle (<i>Long Control Region</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)</i>
PBS	<i>Salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)</i>
PBS-T	<i>Salina Fosfatada (Phosphate Buffered Saline) Tween</i>

PBMC	<i>células mononucleares do sangue periférico</i>
pb	Pares de Base
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SD	Desvio Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
VLP	Partícula Semelhante ao vírus
TCD4	Linfócitos T auxiliares (CD4)
TCD8	Linfócitos T auxiliares (CD8)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
µL	Micro litro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
γ	gama
°C	Celsius
%	Porcentagem
n°	número
RPM	Rotação por minutos
<	menor
>	maior

RESUMO

Introdução: A infecção pelo Papiloma Virus Humano (HPV) vem sendo reportada como uma das doenças sexualmente transmissíveis com maior incidência na atualidade, porém a sua prevalência não é bem esclarecida em homens, principalmente devido a baixa presença de sintomas. Além disso, poucos estudos foram realizados nesta população até o momento para verificar a resposta imune pós-vacinação. As hipóteses testadas serão fundamentais para aprofundar o conhecimento da imunopatogênese, da resposta vacinal em pacientes infectados pelo HIV e colaborar no desenho e estratégias de vacinação anti-HPV na população infectada pelo HIV. **Objetivos:** Analisar a resposta específica aos antígenos da vacina anti-HPV em homens infectados pelo HIV. **Métodos:** Um total de 24 pacientes infectados pelo HIV que preencheram os critérios de inclusão durante o período de coleta foram vacinados pela vacina anti-HPV bivalente em três doses nos períodos: zero, dois e seis meses. Os grupos foram divididos em: Grupo Controle (Cinco indivíduos saudáveis, com sorologia negativa para HIV); Grupo A (Nove pacientes com $CD4 < 500$ células mm^3); Grupo B (10 pacientes com $CD4 \geq 500$ células mm^3). Foram realizados ELISA para a detecção de anticorpos Anti-HPV nos momentos pré e pós-vacinação nos grupos estudados; posteriormente realizamos nos mesmos o ensaio de cultura celular para detecção de citocinas ($IFN\gamma$, IL17, TNF, IL6 e IL10) pela técnica de CBA. **Resultados:** Obtivemos soroconversão da primeira dose da vacina para o grupo A 55,6%, grupo B 30%, grupo controle 60%; na segunda dose obtivemos para o grupo A 88,8%, grupo B 80%, grupo controle 80%, e por final a terceira dose no grupo A 88,8%, grupo B 90%, grupo controle 100%. A citocina IL 6 (perfil TH2) demonstrou níveis mais elevados, comparados entre os grupos A, B e grupo controle ($p < 0.001$). A partir da 3ª dose da vacinação observamos baixos níveis de $INF-\gamma$ (perfil TH1) A e B ($p < 0.0006$). O grupo controle apresentou produção de $INF-\gamma$ quando comparado com grupos A e B ($p < 0.001$). **Conclusão:** Os pacientes soropositivos e grupo controle foram respondedores a vacinação anti-HPV. Foi demonstrada uma elevada produção das citocinas entre os grupos sugerindo uma imunomodulação do grupo HIV+. Esse trabalho apresenta informações relevantes que estimulam a realização de novos estudos nessa população, avaliações de reações cruzada da vacina que pode resultar em proteção a outros tipos de HPV não presentes na vacina, além de analisar por mais tempo as titulações no soro desses pacientes. Os dados do nosso estudo podem corroborar para a vacinação nessa população, diminuindo assim o risco de uma infecção, mortalidade e morbidade das doenças causadas pelo HPV em homens.

Palavras chave: HIV, HPV e Resposta vacinal.

ABSTRACT

Introduction: Infection with Human Papilloma Virus (HPV) has been reported as one of the sexually transmitted diseases with a higher incidence nowadays, but its prevalence must be clarified in men, mainly due to low presence of symptoms. Moreover, few studies have been performed in this population until now to verify the immune response post-vaccination. The hypothesis here suggested will be the key for better understanding of the immunopathogenesis, the vaccine's response in HIV-infected patients and collaborate in the design and strategies of vaccination against HPV in HIV-infected population. **Objectives:** Analyze the specific response to antigens of HPV vaccine in HIV-infected men. **Methods:** A total of 24 HIV-infected patients who were in accordance with the inclusion criteria during the data collection period were vaccinated with anti-HPV bivalent vaccine in three period doses: zero, two and six months. The groups were distributed in: Control group (five healthy subjects with negative serology against HIV); Group A (nine subjects with CD4 <500 cells/mm³; Group B (10 subjects with CD4 >500 cells/mm³). ELISA was performed to detect the level of antibodies anti-HPV before and after vaccination in the studied cohort. Postenarly, cells of these groups were submitted in culture to verify cytokines production (IFN γ , IL17, TNF, IL6 and IL10) using CBA methodology. **Results:** We obtained seroconversion after the first dose of anti-HPV vaccine: control group 60%, group A 55,6% and group B 30%. In the second dose: control group 80%, group A 88,8% and Group B 80%. And at last, the third dose: Control Group 100%, Group A 88,8% and group B 90%. IL 6 cytokine (TH2 response) was detected in higher level when compared Control, A and B groups ($p < 0.001$). IFN γ cytokine (TH1 response) was detected in low level only after the third dose of vaccination, showing relevance between A and B groups ($p < 0.0006$). Additionally, higher IFN γ production was detected when compared the control with A and B groups ($p < 0.001$). **Conclusion:** HIV patients and controls (HIV-) were responders to anti-HPV vaccination. It was clear that an elevated cytokine production was detected between groups, suggesting immunomodulation of HIV + group. This work suggests relevant information that challenge: new studies in this population, verification of cross-reactions of the vaccine resulting in protection of other HPV types not present in this vaccine, and analyze for longer period the titers of anti-HPV antibodies in these patients. All together, our data can corroborate for vaccination in this population, thus decreasing the risk of infection, mortality and morbidity of the disease caused by HPV in men.

Keywords: HIV, HPV and vaccine response.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, pesquisadores procuraram sem êxito, determinar o agente causador de infecções genitais ocasionadas pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). Essa infecção é um problema de grande importância devido à associação com verrugas e alguns tipos de cânceres, dentre eles; câncer de colo de útero, pênis, orofaringe, cabeça e pescoço (1).

Em 1891, pesquisadores demonstraram que verrugas genitais eram associadas a comportamentos sexuais e potencialmente infecciosos. Anos após, foi considerada uma infecção diretamente ligada à atividade sexual. Atualmente, o HPV é considerado infecção genital sexualmente transmissível frequente em todo o mundo. Essa transmissão se dá pelo contato direto de pele com pele ou de pele com mucosa, comprometendo assim 50% dos indivíduos adultos sexualmente ativos (4- 12-13).

A família dos papilomavirus (PV) representa um pequeno grupo heterogêneo de vírus de DNA, pertencentes a família *Papillomaviridae*, gênero Alfa, Beta e Gama, capazes de infectar animais e homens. Até o momento mais de 200 tipos diferentes de papilomavírus foram identificados e descritos na literatura, dos quais aproximadamente 45 são responsáveis por infectar a região anogenital (2-10).

O HPV é um vírus característico de espécie e dependendo da região do organismo que infecta pode apresentar comportamentos específicos, apresentando lesões de características distintas, tem afinidade por infectar mucosas (região oral, genital e anal) e a derme (sendo mais freqüentes nas mãos e pés)(13).

Vários estudos foram realizados para desvendar a historia natural da infecção pelo HPV e dos seus mecanismos celulares, gênicos, diagnósticos, controle e tratamento, devido à alta taxa de mortalidade através do câncer de colo de útero. A prevalência da infecção na população masculina também é significativa, porém na maioria é assintomática, quando presentes as lesões localizam-se mais na região do pênis (20-24).

Frente a essa situação, pesquisadores produziram a vacina anti HPV, esta foi o resultado da concretização das principais tecnologias, capazes de produzir partículas semelhantes a vírus (VLP). O DNA recombinante foi usado para gerar VLPs capazes de mimetizar o vírus natural, provocando altos títulos de anticorpos soro neutralizantes(34).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CLASSIFICAÇÃO DO HPV E EPIDEMIOLOGIA

O Papilomavírus Humano (HPV) pertence à família *papillomaviridae* do gênero Alfa, Beta e Gama, capazes de infectar animais e homens, representam um pequeno grupo heterogêneo de vírus de DNA. Devido a sua grande importância médica, o Papiloma vírus humano tem sido o mais estudado da família do *pappilomaviridae*. Os HPVs são vírus não envelopados de simetria icosaédrica e medem aproximadamente 55 nm de diâmetro (1-10). Figura 1.

Fig1. Micrografia eletrônica de partículas do papilomavirus Fonte: Stannard (1995)

O genoma do HPV é constituído por uma molécula de DNA dupla fita circular, com aproximadamente oito mil pares de bases (pb), associados às histonas H2a, H2b, H3 e H4, formando um complexo semelhante à cromatina. O genoma viral do HPV está dividido em três regiões denominadas ORFs (*Open Reading Frames* ou unidades de tradução) onde são encontrados em uma mesma fita de DNA: região longa de controle, região precoce e região tardia(1-3).

O genoma circular do HPV é constituído por nove regiões codificadoras, dividido em três segmentos: uma região de ação precoce, por ser a primeira a se expressar e denomina-se E (*early*), compreendendo seis genes, E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, necessárias à replicação viral e com propriedades de transformação

oncogênica; uma região de ação tardia, denominada *late* (L), que codifica duas proteínas estruturais, as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (4). A proteína principal que compõe o capsídeo viral L1, gênero específica, serve como medidor indireto da infectividade, possui cerca de 55 kD e representa em torno de 80% de toda proteína viral. A proteína secundária do capsídeo viral L2. É altamente específica, e tem aproximadamente 70 kD(2-33). A região não codificadora, regulatória, conhecida como *large control region* (LCR) representados na Figura 2, contém as sequências de controle para a replicação e expressão genética do HPV (3-10).

Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV, com a localização dos genes precoces (E) ou não estruturais dos genes de expressão tardia (L1 e L2) a região reguladora não codificante LCR.

O gene E7 é uma fosfoproteína, com aproximadamente 100 aminoácidos que se ligam à forma hipofosforilada da proteína célula pRB (produto do gene retinoblasto), um gene supressor que quando ligada a oncoproteína E7 é degradada pela via de proteólise dependente de ubiquinação. A proteína forma um complexo juntamente com as proteínas de controle do ciclo celular, como pRB, p107, p130 e ciclina A, sua função pode estar relacionada a capacidade de induzir a proliferação e imortalização de células. A proteína E7 com p-RB faz com que p-RB perca a função reguladora negativamente. As proteínas E7, dos tipos HPV de alto risco oncogênico, como 16 e o 18, ligam-se a p-RB com maior afinidade do que os classificados de baixo risco, como 6 e 11 (tabela 1) (12-18).

Os papilomavírus usam os organismos animais para desenvolverem o seu ciclo de vida e se replicarem. Têm uma afinidade natural para infectar as células epiteliais, cutânea, zonas mucosas, e induzem a formação de tumores, ou papilomas, para fomentar a sua própria replicação (17). Têm a capacidade de se manterem associados ao hospedeiro durante longos períodos de tempo, usando infecções persistentes. No entanto, não costumam ser graves para o organismo, pois, por um lado, a infecção mantém-se localizada e, por outro, os tecidos infectados estão continuamente a ser regenerados, ao mesmo tempo em que as células danificadas vão sendo eliminadas (25).

Até o momento, mais de 200 tipos de HPV foram identificados e classificados em subgrupos de acordo com o potencial oncogênico e cerca de 45 tipos são responsáveis por infectar a região anogenital (10). Os papilomavírus são caracterizados por grupos: alto risco oncogênico e baixo risco oncogênico (4), de acordo com o quadro 1 seguido abaixo no texto.

Quadro 1: Demonstração dos tipos dos Papilomavirus de alto risco e baixo risco oncogênico.

Tipo de risco	Tipo de Papilomavírus Humano (HPV)
Alto	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68, 73, e 82

Baixo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89

O grupo de baixo risco está associado com a presença de verrugas, papilomas laríngeos e tumores ano-genitais, sendo considerados benignos. Por outro lado, o grupo de alto risco possui um maior potencial oncogênico, sendo considerados agentes etiológicos no câncer (5).

O HPV é considerado uma infecção genital sexualmente transmissível mais frequente em todo o mundo (4). Essa transmissão se dá pelo contato direto de pele com pele ou de pele com mucosa, comprometendo assim 50% dos indivíduos adultos sexualmente ativos (12-13). Aproximadamente 80% das mulheres sexualmente ativas irão se infectar com o vírus em algum momento (6).

A infecção genital por HPV ocorre através do contato sexual ou seja, contato epitelial direto, pele e mucosas das regiões oral, vaginal, vulvar, peniana ou anal, é a principal via de transmissão do HPV sendo possível a infecção em um único contato sexual com um parceiro infectado. Esse contato com o parceiro infectado será condição necessária para a transmissão do HPV (4-10).

A transmissão não-sexual ou indireta do HPV tem provocado controvérsia em vários estudos. Este tipo de transmissão está associado a transmissão vertical (mãe pro feto ou no trabalho de parto) ou por objetos como: roupas, lençóis, toalhas, instrumentos médicos, objetos de utilização sexual compartilhados, assim como pela frequência de piscinas ou saunas (36).

A prevalência da infecção pelo HPV na população masculina não é bem definida, geralmente por não apresentar sintomas clínicos, além de levar em consideração a região afetada, o tipo de amostra analisada e o método de detecção do vírus (6). Quando as lesões surgem podem se apresentar em diferentes aspectos como verrugas genitais, verrugas plantares dolorosas, papilomas orais, laríngeos e cânceres (7).

RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HPV

O sistema imunológico tem um papel importante no controle da infecção por HPV. Contudo, os mecanismos que controlam essa resposta contra o vírus não são

bem esclarecidos. A persistência da infecção decorrente de uma resposta ineficiente pode implicar no desenvolvimento de lesões neoplásicas (11-12).

O HPV evita o seu reconhecimento pelo sistema imunológico, por não causar lise celular e não induzir uma inflamação local (11). Em seu ciclo infeccioso, não há viremia, uma quantidade muito baixa de proteína viral é expressa, e o vírus não é citolítico. Dessa forma, não ocorre uma sinalização do sistema imunológico para ativar a resposta imune inata, que é mediada pela ação de algumas citocinas (Interferon, Fator de Necrose Tumoral TNF e interleucinas), tendo um atraso na resposta imune adaptativa (13). Dessa forma, ocorre uma disfunção imune, com uma diminuição das células apresentadoras de antígenos (APC's) e dos linfócitos T. Assim, o mecanismo de vigilância imune sofre interferência, tanto na apresentação desses antígenos, como na fase efetora de ativação dos linfócitos T e produção de anticorpos (14).

Em indivíduos imunocompetentes, as infecções virais causam uma elevada produção de várias citocinas dentre elas células NK, linfócitos, fibroblastos e queratinócitos (42). Os Linfócitos T CD4⁺ produzem secreções de citocinas que regulam outras células (45). A expressão dessas citocinas são definidas por linfócitos TCD4⁺ denominados como T helper 1 e T helper 2) determina a magnitude e as consequências de uma resposta inflamatória, sendo importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções (47).

O período de incubação do vírus é bastante variável, de 3-4 semanas a meses ou anos, e está relacionado com a quantidade de vírus no organismo e a competência imunológica de cada indivíduo (41).

Alguns estudos evidenciam a vulnerabilidade de indivíduos imunossuprimidos portadores do HIV-1 à neoplasias benignas ou malignas quando expostos ao vírus HPV ou a outras co-infecções devido ao comprometimento do sistema imunológico presentes nesses casos (43). Poucos estudos sobre HPV em homens tem sido reportado, mas uma alta prevalência em homens vulneráveis foi observada (63% a 84%) em clínica da doença sexualmente transmissível (42).

Em indivíduos com imunodeficiência, iatrogênica ou adquirida, a prevalência de lesões associadas ao HPV é maior (32). Pacientes soropositivos para HIV sofrem alta taxa de infecção com um número maior de reinfecção pelo HPV após o tratamento

(15-17). Em homens infectados pelo HIV, a prevalência do HPV na região do pênis é de 18,2% e na região anal de 59,3% (17-18).

VACINAS

O desenvolvimento de vacinas antimicrobianas é um dos maiores triunfos dentro da pesquisa biomédica, pois tem mostrado uma contribuição no sentido de minimizar mortes causadas por agentes infecciosos (19).

Após anos de estudos foi desenvolvida a vacina contra o HPV, sendo estas vacinas profiláticas baseadas em *Virus-like-Particles* (VLPs), morfologicamente similares aos vírions nativos, sem o genoma viral e capazes de induzir resposta de anticorpos neutralizantes. Após anos de ensaios experimentais e duplos cego a vacina mostrou ser extremamente eficaz na prevenção da infecção pelo vírus e doenças neoplásicas induzidas por ele (20). A experiência com a vacina de Hepatite B foi de grande valia para o desenvolvimento das vacinas contra o HPV, pois, ambas as vacinas têm desenho similar, auxiliando assim sobre doses de reforços e tempo de imunidade (38).

Os níveis elevados de anticorpos induzidos pela VLP podem impedir a infecção por ocluir os locais de ligação na célula. A VLP pode também evitar o escape imunológico do HPV que diminui a expressão de proteínas do capsídeo para retardar a produção dos vírions até que a diferenciação celular esteja completa (29).

A primeira vacina a ser licenciada pela *US Food and Drugs Administration* (FDA) dos EUA foi a vacina quadrivalente Gardasil® da Merck, aprovada em 2006 apenas em mulheres de 9 a 26 anos de idade. A vacina foi liberada em diversos países do mundo, no intuito de prevenir o desenvolvimento do câncer do colo do útero e de outras doenças associadas ao HPV (21-23).

Hoje existem dois tipos de vacinas comercialmente disponíveis: a Cervarix® (Glaxo SmithKline Biologicals, local) que contém VLPs (*Virus Like Particle*) dos tipos 16 e 18 e a Gardasil® (Merck Shape Dohme, local) que contém VLPs dos tipos 6, 11, 16 e 18. Ambas as vacinas (Gardasil® e Cervarix®) contém um alumínio adjuvante de sal que precipita a VLP permitindo a liberação do antígeno de forma mais lenta (24).

Quadro 2 : Vacinas Profiláticas baseadas em VLPs de HPV. (Lepique *et al.*, 2009)

Vacinas	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	20/20µg
Células Produtoras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressando L1	Linhagem celular de <i>Trichoplusiani</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

A vacina Cervarix apresenta em sua composição um lipossacarídeo que ativa a resposta imune inata através do TLR4, aumentando a resposta de anticorpos anti-VLP (25). O estudo da vacina comprovou eficácia de 100% na prevenção dos tipos 16 e 18 associados às lesões intraepiteliais grau III em mulheres que não tinham evidência de infecção por HPV e que receberam pelo menos uma dose, e também protegeu contra lesões de graus menores. Após os ensaios clínicos de fase três, as vacinas foram licenciadas mundialmente e ficou decidido que a população alvo seriam meninas e mulheres com idade entre 9 e 26 anos, em outubro de 2010 a vacina Gardasil foi aprovada na população masculina na mesma faixa etária da população feminina (22, 26).

Os tipos de HPVs 16 e 18 foram adicionados a vacina por apresentarem maior frequência nos casos de desenvolvimento de câncer cervical no mundo, sendo responsáveis por 70% dos casos de cânceres de colo do útero e neoplasia intraepiteliais de alto grau e os HPVs de baixo risco 6 e 11 por ser mais encontrados em 90% das verrugas anogenitais(34).

Diversos fatores contribuem para a imunogenicidade intrínseca das VLPs, pois mantém um arranjo ordenado e repetitivo de seu epítipo e isso permite um reconhecimento específico das células B (27). A produção das vacinas profiláticas tem como alvo a região L1, a produção da vacina consiste em expressar os monômeros de L1 *in vitro* que se ligam as VLP, e não contém informação genética, assim a vacina

induz uma ampla resposta de anticorpos neutralizantes, característica esta que permite o reconhecimento de um tipo de HPV e suas variantes por meio de suas sequências de aminoácidos (28).

As vacinas para HPV não apresentam ação terapêutica em câncer ou lesões já existentes. Alguns estudos têm demonstrado reações cruzadas dos genótipos existentes na vacina com outros genótipos causadores de câncer, sendo estes (HPV 16, 18, 33 e 45), não prevenindo a infecção com todos os genótipos de alto risco (37).

Apesar do licenciamento da vacina e novos tratamentos para as lesões, inclusive na população masculina, há poucos dados informando sobre a infecção por HPV em homens, principalmente, infectados pelo HIV-1. Dessa forma, o mais importante entendimento sobre o sucesso da vacina, é sua real eficácia na prevenção da infecção genital e isso deve ser considerado um incentivo para o desenvolvimento de vacinas para outras doenças sexualmente transmissíveis como HIV e HBV. Nosso estudo avaliou a resposta da vacina anti-HPV bivalente em pacientes masculinos infectados com HIV-1.

Ainda é muito discutível a relação do HPV em pacientes masculinos HIV-1+, com o crescente aumento da infecção pelo HPV e casos de cânceres na população masculina, sugerimos neste estudo a avaliação da imunogenicidade da vacina nessa população de alto risco.

Além da resposta específica aos antígenos da vacina, analisamos a resposta imune anti-HPV em homens, pois há uma escassez dados sobre esta resposta em pacientes imunossuprimidos pelo HIV-1, em seus diversos estratos de deficiência imunológica. A hipótese foi testada através da estratificação pela contagem de linfócitos T CD4⁺, na tentativa de avaliar a faixa da contagem com maior possibilidade de resposta vacinal. Assim, o conhecimento da resposta vacinal em pacientes infectados pelo HIV, indicará quais pacientes terão maior potencial de resposta vacinal *in vivo*.

OBJETIVOS

OBJETIVO

Avaliar a resposta específica aos antígenos da vacina bivalente anti-HPV em pacientes homens infectados pelo HIV-1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Avaliação da titulação de anticorpos anti-HPV pós-vacinal (primeira dose após 30 dias, 60 dias e 180 dias) em pacientes homens infectados com HIV-1;
- 2) Avaliação a resposta imune celular, pela mensuração de citocinas INF- γ , e TNF- α , IL-17, IL-6 e IL-10 no sobrenadante de cultura de linfócitos TCD4+.

MÉTODOS

MÉTODOS

LOCAL DE ESTUDO

Serviço de Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias ADEE 3002, do HC/FMUSP e LIM56.

DESENHO DO ESTUDO

Estudo clínico, prospectivo, aberto, não randomizado e sem controle com placebo.

POPULAÇÃO ALVO

No total, 450 indivíduos portadores de HIV estão em acompanhamento no ambulatório de Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias ADEE3002, do HC/FMUSP. Desses, 300 indivíduos são do sexo masculino, sendo que 56 na faixa etária de 18 – 45 anos. Esses pacientes passaram por uma triagem para verificar se havia a presença de HPV no lavado oral (Oliveira et al. 2013). Desses indivíduos, oito apresentaram HPV+ na saliva e 23 apresentaram outros fatores de exclusão e não foram vacinados. Portanto, neste estudo, 25 pacientes estavam de acordo com os critérios de inclusão, e foram convidados e aceitaram participar do estudo, onde foram encaminhados para realização do teste (lavado oral) antes da vacinação. Os cinco indivíduos controles foram convidados a fazer sorologia pra HIV-1 e lavado oral antes da vacinação, os controles (colegas e funcionários do laboratório) que aceitaram e assinaram o Termo de Consentimento livre e esclarecido do estudo. A pesquisa foi realizada no período de outubro de 2012 a fevereiro de 2013.

VACINA

Vacina Cervarix® Bivalente VLP 16 e 18 (Glaxo SmithKline Biologicals, - Rixensart, Bélgica) Lote AHPV176AA 10/201, administração via Intramuscular.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Somente indivíduos adultos com idade entre 18 a 45 anos, do sexo masculino com sorologia positiva para HIV-1 e resultado molecular negativo para HPV oral. Receberam as três doses nos tempos de 0, 3 e 6 meses, a aplicação foi feita por administração intramuscular seguida de um profissional da área da saúde.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Pacientes em uso de imunossupressores, portadores de insuficiência renal ou hepática, neoplasias, doenças autoimunes, coinfectados com hepatite C, e relatos de recente vacinação.

GRUPOS ESTUDADOS

Um total de 25 pacientes infectados pelo HIV que preencheram os critérios de inclusão durante o período de coleta foram analisados e classificados: A partir de 25 vacinados, porém seis (30%) apresentaram anticorpos anti-HPV no momento basal, e não foram considerados na análise. Portanto, 19 indivíduos infectados pelo HIV-1 e cinco controles (indivíduos saudáveis, com sorologia negativa para HIV) fizeram parte da análise.

Grupo Controle: Cinco indivíduos saudáveis, com sorologia negativa para HIV.

Grupo A: Nove pacientes com $CD4 < 500 \text{ cells mm}^3$

Grupo B: 10 pacientes com $CD4 \geq 500 \text{ cells mm}^3$

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Rotineiramente, os testes sorológicos foram realizados na Divisão do Laboratório Central (DLC) laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP- HCFMUSP.

COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS:

As amostras de sangue dos pacientes foram colhidas por punção venosa e as identificações realizadas com auxílio de um agente de saúde, colocando-se o nome e o número conforme o prontuário médico em cinco tubos contendo Heparina Sódica e um tubo seco com gel, cada tubo comporta aproximadamente 10 ml de sangue venoso periférico. Os tubos foram centrifugados a 2500 RPM por 15 minutos. Armazenou-se as alíquotas de soro – 80°C para o processamento posterior da triagem sorológica e testes confirmatórios. Obtivemos as células mononucleares do sangue periférico pela separação do gradiente de concentração de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemicals, St Louis, MO USA).

CONGELAMENTO

Após a contagem das células, centrifugou-se as amostras, o sobrenadante foi dispensado, ressuspendeu-se em soro fetal bovino (SFB) e DMSO 10%, a uma concentração 20×10^6 células em tubo 500 µl de soro fetal puro, em seguida foi pipetado o conteúdo celular no criotubo e mantido na geladeira. Pipetando gota a gota o meio de congelamento DMSO. Os criotubos foram acondicionados a um “freezer-inbox” (mantido a 4°C) e depois de 30 minutos transferido ao freezer -80°C foram armazenados para a realização de experimentos do estudo e experimentos posteriores. Para o descongelamento, foram colocadas as amostras em banho Maria a 37°C sob agitação constante, sendo observado sempre o floco de gelo. Foram transferidos a suspensão celular em 10 mLs de meio RPMI contendo 10% de SFB. Logo após foram centrifugados por cinco minutos a 1500 rpm, repetir o processo duas vezes até retirar todo DMSO.

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HPV (TÉCNICA PADRONIZADA OLIVIA WHITE, 2004)

No ensaio de ELISA foram utilizadas microplacas Nunc. Utilizou-se a VLP 16, partícula esta que ajudou no desenvolvimento da vacina. Foi diluído com PBS 1x 50 µl de 0,03 mg/ml de VLP, foram distribuídos 50µl em cada orifício da placa, sendo que para cada 2 poços de VLP foi preparado um com PBS (para termos um controle da reação). Em seguida as placas foram agitadas por dois minutos e incubadas a 4°C

por 17 horas. A solução foi descartada e posteriormente a placa foi lavada cinco vezes com PBS Tween, e secada com movimentos repetitivos em posição invertida em papel absorvente para a remoção do excesso de tampão. Após esse processo, foi feito bloqueio utilizando 1,5% BSA em PBS 1x e adicionado 100 µl de solução de bloqueio e encubado por 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente por duas vezes e seguindo o mesmo processo de secagem descrito anteriormente. Foram adicionados 50 µl de soros teste e controles diluídos em tampão de diluição (leite desnatado, BSA e PBS-T) 1:50 e incubados por 1 hora a 37°C. Em todos os ensaios foram utilizados soros controles positivos, obtidos de indivíduos infectados pelo HPV, cedido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT-HPV). Foi realizado o processo de lavagem e secagem por cinco vezes.

Adicionou-se 50 µl de anti-IgG humana conjugada diluída em leite desnatado, BSA e PBS-T e distribuídos nos poços, em seguida a placa foi incubada por 45 minutos a 37°C. A placa foi lavada por cinco vezes e invertida para tirar todo o excesso de tampão. Novamente foram adicionados 50 µl de solução reveladora ABTS, e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente sob abrigo de luz. Após esse período foi feita uma interrupção da reação adicionando 50 µl de SDS 1%.

O leitor óptico automático para microplaca (Immunowash 1250 da Biorad), ajustou-se no comprimento de onda a 415nm, onde a média dos valores das absorbâncias obtidas de cada soro foi subtraída do valor da absorbância obtida pelo branco (PBS), em seguida foram utilizados a média e desvio padrão (SD), resultando assim o valor do cut-off.

Para o cálculo de normalização (NAR), foram utilizados dos títulos de anticorpos anti-HPV obtidos em cada placa avaliada (média da DO/ controle positivo). Para avaliar a soro-conversão à vacinação, foram considerados os títulos com valores acima da absorbância de 208nm. Segundo o NAR, quando esses valores se forem menores que essa absorbância serão considerados não soro-conversão vacinal (30).

ENSAIO CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

Para as análises da expressão de citocinas, foi utilizado o kit BD *CytometricBeadArray (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine*. O Kit *BD CBA Human Th1/Th2/Th17 cytokine* é utilizado para medir os níveis de proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17 por 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 desde que a mesma esteja em uma boa conservação (*Becton& Dickinson, NJ, USA*). O kit de CBA fornece um método de captura de um analito solúvel ou set de analitos com *beads* fluorescentes, tornando possível a detecção de analitos através da citometria de fluxo.

A *bead* de captura é conjugada com anticorpos específicos de detecção, fornecido pelo próprio kit, ficoeritina (PE), que proporciona um sinal fluorescente proporcional à quantidade de analito ligado.

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

O kit CBA utiliza a tecnologia de *bead array* para detectar múltiplas citocinas em amostras de pesquisa. Esses kits de CBA contem populações de *beads* com intensidades fluorescentes diferentes revestidos com anticorpos específicos para citocinas IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e Th17. As sete populações de esferas são misturadas em conjunto para formar a matriz do grânulo, o que é lida por um laser vermelho de um citômetro de fluxo.

A técnica consiste em transferir as *beads* da curva padrão para um tubo de 15 mL de polipropileno e ressuspender em 2 mL de tampão diluente, fornecido pelo kit. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. 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 tubos individuais identificados. Adicionou-se uma alíquota de 10 μ L de cada *bead* de captura para cada tubo a ser analisado, dentro de um único tubo marcado com *Mixed Capture Beads*.

Em cada tubo devidamente identificado, foi adicionado 50 μ L de sobrenadante de cultura, descongelado. Adicionou-se 50 μ L do reagente de detecção *Mouse Th1/Th2/Th17 PE* em cada um dos tubos. Realizou-se incubação de 3 horas, em temperatura ambiente.

No final da incubação, realizou-se uma lavagem, adicionando 1 mL de tampão de lavagem *Wash Buffer*, centrifugando-se a 200g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 μ L do *wash buffer*. Os sobrenadantes foram analisados em seguida pelo citômetro de fluxo *BD LSR Fortessa cell analyzer*

(Becton& Dickinson, NJ, USA). A tabela 03 mostra os limites de detecção com base no próprio kit para saber o limiar que pode ser usado as amostras.

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

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

CONTROLE DE QUALIDADE DOS DADOS

A coleta de dados foi realizada pelo pesquisador principal, assim como a entrada dos dados e posteriormente esses dados foram conferidos. Os resultados foram tabulados em planilhas elaboradas no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) e os dados coletados exportados para o programa estatístico SPSS versão 19.0 (IBM).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise das titulações por ELISA e das citocinas foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foi utilizado para análise de variância “ANOVA” e test T. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de de Wilcoxon, comprando as citocinas em diferentes tempos. Man Witney foi utilizado para comparar a diferenças entre os grupos de indivíduos, Valores de $p < 0.05$ foram considerados como significativos.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ Cappesq N° 0562/011, pelo CEP do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo IMT-USP N° 2011/112, registrado no Clinical Trials,

somente os pacientes, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, fizeram parte desta pesquisa.

RESULTADOS

Os pacientes infectados pelo HIV-1 foram subdivididos em grupos, de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ no momento da vacinação: Grupo A: CD4 >500; grupo B: CD4 <500; e o grupo controle (indivíduos sadios, com sorologia negativa para HIV).

A média de idade do grupo A (contagem de linfócitos T CD4> 500) de nove pacientes infectados com HIV-1 foi de 30,44% anos, sendo que a maioria dos pacientes relatou ter ensino superior completo (66,7%) ser solteiro (78%) (Tabela 4).

A idade média do grupo B (contagem de linfócitos T CD4< 500) de 10 pacientes infectados pelo HIV-1 foi de 34, 30% anos, em relação à escolaridade, 50% relataram ter segundo grau completo e 80% eram solteiros.

Tabela 4. Média dos Grupos baseados pelo questionário Sócio demográfico/Comportamental.

	GRUPO A CD4 <500 (n=9)	GRUPO B CD4 >500 (n=10)	GRUPO Controle sadio (n=5)
<u>Idade (média\anos)</u>	30.44	34.30	32,4
<u>Início da relação sexual (média/anos)</u>	15.44	16.6	16.6
<u>Escolaridade</u>			
1° grau	NA*	2 (20%)	NA*
2° grau	3 (33,3%)	5 (50%)	2 (40%)
Superior	6 (66.7%)	3(30%)	3 (60%)
<u>Situação Marital</u>			
Casado	2 (22,2%)	2 (20%)	NA*
Solteiro	7 (77,8%)	8 (80%)	5 (100%)

*NA: não se aplica

Figura 3a. Avaliação sorológica pela técnica de Elisa, com VLP 16 em 25 pacientes infectados com HIV-1 e 5 controles.

Observou-se que na figura 3a, seis pacientes apresentaram anticorpos anti-HPV previamente detectados no soro momento basal, este grupo foi classificado como (VLP positiva), sendo assim excluídos da análise. Os 19 pacientes HIV e 5 controles ficaram abaixo do *cut-off* = 0.209.

Figura 3b. Mensuração de anticorpos, após a vacinação de 30 dias da vacina Bivalente Cervarix HPV 16-18.

A figura 3b, refere-se ao tempo 0 (1ª dose), após quatro semanas da imunização pela vacina anti-HPV bivalente. Foi realizada uma coleta sanguínea, onde

observou-se um aumento dos títulos de anticorpos circulante nos soros dos pacientes. Três pacientes do grupo controle obtiveram soroconversão (60%), cinco pacientes do grupo A (55,6%), e três pacientes do grupo B (30%), obtiveram aumento dos títulos de anticorpos mensurados pela técnica de ELISA utilizando a VLP 16 do HPV, classificados por títulos normalizados.

Figura 3c . Mensuração de anticorpos, após a vacinação de 4 semanas da segunda imunização (30 dias) da vacina Bivalente Cervarix.

A figura 3c refere-se a 2ª dose (30 dias). Após quatro semanas da segunda imunização, houve um aumento dos títulos de anticorpos circulante nos soros dos pacientes. Quatro pacientes do grupo controle obtiveram soroconversão (80%), oito pacientes do grupo A (88,8%), e oito pacientes do grupo B (80,0%), obtiveram aumento dos títulos de anticorpos anti-HPV, classificados por títulos normalizados.

Gráfico 3d . Mensuração de anticorpos, após a vacinação de 4 semanas da segunda imunização (180 dias) da vacina Bivalente Cervarix HPV 16 e 18.

O gráfico 3d, refere-se a 3ª dose (180 dias), Após quatro semanas da imunização, foi realizada uma coleta sanguínea, onde observou-se um aumento dos títulos de anticorpos circulante nos soros dos pacientes, 5 pacientes do grupo controle obtiveram (100%) soroconversão, oito pacientes do grupo A (88,8%), e nove pacientes do grupo B (90%), obtiveram soroconversão, classificados por títulos normalizados.

IL-17

Foi observada elevada produção de IL-17 nos grupos estudados. Ainda no tempo basal os pacientes infectados com HIV apresentaram níveis mais elevados em comparação ao grupo controle (HIV-), porém não foi considerado estatisticamente significante ($p > 0.401^*$) [Figura 4a]. Após a primeira dose da vacinação foi possível observar uma elevada produção da citocina IL17 no grupo controle, quando comparados o grupo controle com o grupo A foi encontrada significância estatística ($p < 0.0034$).

Figura 4a Produção de IL-17 no tempo Basal e **Figura 4b** Produção de IL 17 na 1ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A linfócitos T CD4< 500 e Grupo B linfócitos T CD4>500).

Figura 4c. Produção de IL-17 na 2ª dose da vacinação; e Figura 4d. Produção de IL 17 na 3ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A CD4< 500 e Grupo B CD4>500).

Após a segunda dose observou-se um aumento dos níveis de citocinas de IL 17, o grupo controle permaneceu com os níveis de citocinas iguais os da 1ª dose, e o grupo A teve uma pequena queda do nível de IL17, o grupo B teve um discreto aumento, porém sem significância estatística. Na 3ª dose da imunização, os pacientes HIV positivos apresentaram uma baixa produção de IL17 comparado com as demais doses. Quando comparados os níveis de IL-17 entre os grupos controle x A, controle x B, encontrou-se significância estatística respectivamente $p<0.0137$ e $p<0.001$.

IL 6

A citocina IL-6, é pertencente ao perfil Th2, apresentou maior título entre as citocinas descritas do nosso estudo. Observou-se elevada produção da IL-6 em todos os grupos, desde o basal a 3ª dose da vacinação. No período Basal, o grupo A linfócitos T CD4< 500 foi observada elevada produção de IL-6 em comparação ao grupo B linfócitos T CD4> 500, observou-se uma diferença significativa ($p<0.0001$) [Figura 5a].

Na figura 5b, os níveis de IL6 do grupo controle foi bem superior em comparação com demais grupos de pacientes HIV+, comparados o grupo controle com o grupo A, controle e grupo B, foi possível observar uma significância estatística ($p < 0.0001$).

Figura 5ª. Produção de IL-6 no tempo Basal; e Figura 5b. Produção de IL 6 na 1ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A linfócitos T CD4< 500 e Grupo B linfócitos T CD4>500).

Na segunda dose da vacinação foi possível observar uma pequena elevação do grupo B quando comparado aos demais grupos de estudo, porém sem significância estatística; o grupo controle comparado com o grupo A obteve significância com o valor de $p < 0.001$, quando comparados os grupos HIV entre si, observou-se significância com o $p < 0.0023$ [figura 5c]. Foi observada uma elevada produção de IL6 do grupo A comparado aos demais grupos na [figura 5 d] referente a 3 dose da vacinação, porém sem significância estatística ($p > 0.246$).

Figura 5c. Produção de IL-6 na 2ª dose da vacinação; e Figura 5d. Produção de IL 6 na 3ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A CD4< 500 e Grupo B CD4>500).

Os níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de linfócitos T CD4+ no momento basal foram semelhantes entre os grupos HIV+ e controle; quando comparado o grupo controle com o grupo B foi observado uma significância $p > 0.0467$, comparando os grupos HIV+ com linfócitos T CD4 >500 e CD4 < 500 entre si, também foi demonstrado significância $p < 0.0221$ [figura 6^a]. Quando comparados os níveis de IL-10 entre os grupos encontrou-se significância estatística entre a produção de IL-10 no grupo controle com o grupo B, observando significância estatística, $p < 0.0361$.

Figura 6^a. Produção de IL-10 no tempo Basal e Figura 6b Produção de IL 10 na 1^a dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A com linfócitos T CD4 < 500 e Grupo B com linfócitos T CD4 >500).

Observou-se que na figura 6c baixos níveis de IL-10 em relação à dose anterior, sendo destacado o grupo A com maior elevação dos níveis de IL-10, mostrando estatisticamente significativo ($p < 0.001$). Na 3^a dose de vacinação, foi observado pela figura 6d uma maior produção de IL-10 entre os pacientes HIV+ em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$).

Figura 6c. Produção de IL-10 na 2^a dose da vacinação; e Figura 6d Produção de IL 10 na 3^a dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A linfócitos T CD4 < 500 e Grupo B linfócitos T CD4 >500).

FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

Observou-se no momento basal [figura 7a] que os níveis de TNF- α em ambos os grupos A e B (correspondentes aos pacientes HIV+) apresentaram uma elevada produção na mensuração feita a partir do sobrenadante da cultura celular. Quando comparado o grupo controle com o grupo B foi possível observar significância estatística ($p < 0.0210$). Foram encontrados altos níveis de TNF- α na figura 7b correspondente a 1ª dose da vacinação, observou-se que o grupo controle e o grupo B apresentaram elevada produção dessas citocinas (TNF), foi possível observar significância entre os grupos controle e grupo A $p < 0.0002$, entre os grupos HIV+ (A e B), $p < 0.0001$.

Figura 7a. Produção de TNF- α no tempo Basal e Figura 7b Produção de TNF- α na 1ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A CD4 < 500 e Grupo B CD4 > 500).

Foi possível observar que após a segunda dose da vacinação os níveis de de TNF mensurados pelo sobrenadante da cultura de linfócitos, foi estatisticamente significativa entre os grupos controle e grupo A com o valor de $p < 0.003$, o grupo controle comparado ao grupo B $p < 0.0001$. Após a 3ª dose da vacinação, observamos uma baixa produção níveis de TNF, os grupos infectados pelo HIV quando comparado com o Grupo controle vs grupo A ($p < 0.004$), B vs A ($p < 0.001$) e controle vs B ($p < 0.0018$).

Figura 7c. Produção de TNF na 2ª dose da vacinação; e Figura 7d Produção de TNF 6 na 3ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A linfócitos T CD4 < 500 e Grupo B linfócitos T CD4 > 500).

Interferon (IFN- γ)

Os níveis de IFN- γ foram medidos a partir do sobrenadante de cultura de linfócitos T CD4+. Na figura 8a, observamos que no momento basal uma elevada produção do Grupo controle comparado ao grupo A linfócitos T CD4<500 ($p = 0.24$) em comparação controle com grupo B linfócitos T CD4>500 ($p < 0.021$). Após um mês da vacinação, foi observada uma elevada produção de IFN- γ , o grupo A comparado ao controle observou-se uma diferença significativa estatística com o $p < 0.0002$, comparados os grupos HIV+ A e B ($p < 0.0001$), o grupo controle comparado ao grupo B não foi demonstrado significância estatística.

Figura 8a. Produção de IFN- γ no tempo Basal; e Figura 8b Produção de IFN- γ na 1ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A CD4< 500 e Grupo B CD4>500).

Na figura 8c, observou-se que na segunda dose da resposta a vacinação níveis de IFN- γ foram elevados entre os grupos controles e o Grupo B com o valor de $p > 0.677$, o grupo A obteve níveis mais discretos $p > 0.075$; quando realizada a comparação entre

os grupos A e B foi observado significância estatística com o valor de $p < 0.001$. A mensuração da citocinas INF- γ da 3ª dose da imunização é mostrado pelo gráfico 8d, observamos que os grupos A e B pacientes HIV positivos obtiveram uma maior produção de citocinas $p < 0.0006$, em quanto o controle nota-se um discreta produção, comparando os grupos controle e A, controle e B os valores foram considerados estatisticamente significante com o p ($p < 0.001$) respectivamente.

Figura 8c. Produção de INF- γ na 2ª dose da vacinação; e Figura 8d Produção de INF γ na 3ª dose da vacinação nos três grupos estudados (Grupo controle, Grupo A CD4< 500 e Grupo B CD4>500).

DISCUSSÃO

Um total de 30 pacientes infectados pelo HIV-1 foi imunizado contra HPV-16 e HPV-18. Entretanto, devido à presença de anticorpos anti-HPV previamente detectados no soro, seis pacientes foram excluídos da análise. Portanto 24 indivíduos, 19 pacientes portadores infectados pelo HIV-1 e cinco controles (indivíduos sadios) foram incluídos no estudo.

Este trabalho analisou a mensuração dos anticorpos previamente detectados no soro, na quarta semana após cada dose de vacinação (1ª dose, 2ª dose -após 30 dias e 3ª dose após 180 dias) foram coletadas amostras. Após todo o processo de separação do soro foi realizado o teste imunoenzimático para mensuração da titulação de anticorpos, em seguida congelamento e posteriormente cultura celular de linfócitos T, onde foi analisado perfil T *help* (Th) através de citometria de fluxo. As amostras dos pacientes foram classificadas em 3 grupos: **Grupo Controle:** indivíduos sadios, com sorologia negativa para HIV, **Grupo A:** pacientes infectados pelo HIV e com contagem de linfócitos T CD4+ <500 cells/ mm³, **Grupo B:** pacientes infectados pelo HIV e com contagem de linfócitos T CD4 ≥500 cells/ mm³.

Neste estudo, os resultados demonstraram que a vacina bivalente (Cervarix) é segura e eficaz, pois houve indução de anticorpos anti-HPV em uma proporção elevada nos pacientes HIV+ e no grupo controle que responderam a vacina contra o HPV, independente da faixa de linfócitos T CD4+. Além disso, foi observado 91,6% de soroconversão dessa população, corroborando com outros estudos. Wilkin et., al 2010, realizou um estudo utilizando população masculina portadores do HIV-1 onde foi administrada a vacina da Merck sendo comparando com grupo placebo, os valores de soroconversão foi de 95% (32). Em 2010, Levin e colaboradores imunizaram crianças com idade de 7 a 12 anos portadoras do HIV-1, verificaram uma resposta à vacina quadrivalente da Merck 93% de soroconversão (33).

A administração da vacina bivalente baseada em VLP estudada em indivíduos HIV positivos não alterou a contagem de linfócitos T CD4, nadir e carga viral de HIV desses pacientes, isso também foi observado em outros dois estudos com população imunossuprimidos (33-34).

Diversos fatores contribuem para tal feito como a imunogenicidade intrínseca das VLPs, pois mantém um arranjo ordenado e repetitivo de seu epítomos e isso permite um reconhecimento específico das células B (27). Outro fator seriam as

características dos epítomos da região L1 que induzem uma ampla resposta de anticorpos neutralizantes, característica esta que permite o reconhecimento de um tipo de HPV e suas variantes por meio de suas sequências de aminoácidos (28).

Os níveis elevados de anticorpos induzidos pela VLP podem impedir a infecção por ocluir os locais de ligação na célula. A VLP pode também evitar o escape imunológico do HPV que diminui a expressão de proteínas do capsídeo para retardar a produção dos virions até que a diferenciação celular esteja completa (29).

Os pacientes não mencionaram nenhum evento adverso sério atribuível a vacinação. Somente foi mencionada dores por um curto período no local da aplicação e dores de cabeça, sendo atribuídos como leves ou moderados e foram semelhantes a outras vacinas administradas em indivíduos portadores do vírus HIV (24,32,34).

A eficácia da vacina bivalente contra HPV 16 e 18 foi demonstrada por vários estudos mostrando-as consistente e comparável entre as duas vacinas anti-HPV. Ainda não se sabe por quanto tempo a vacina é eficaz, estando ainda em fase de acompanhamento, para uma possível dose de reforço após alguns anos (44).

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, Veiga et al., 2006, demonstraram que a carga viral em pacientes portadores do HIV foi fator determinante para não soroconversão vacinal da Hepatite B (31). Nossos dados corroboraram com outros dois estudos que utilizaram a vacina anti-HPV quadrivalente da Merck em indivíduos HIV-1, onde foi demonstrado que a carga viral não estava ligada à soroconversão vacinal desses pacientes (32-33).

A infecção pelo HPV pelos tipos oncogênicos está associada a praticamente todos os casos de câncer cervical, 90% dos casos de câncer anal, 50% dos casos de câncer peniano, vaginal, vulvar e 12% dos casos estão relacionados ao câncer de orofaringe/cabeça pescoço, portanto a eficácia da vacina nessa população alvo seria necessária para uma maior prevenção (20,24,46).

Foi analisado, neste estudo, 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 infectados pelo HIV-1, quando comparados com o grupo controle. Outros estudos demonstraram que a infecção pelo HIV pode ocasionar uma desregulação na produção destas citocinas (49). A resposta TH1 esta relacionada com a imunidade mediada por células e com perfil de citocinas/interleucinas INF- γ (Interferon gama) (47- 52). A resposta TH2 está associada ao perfil humoral (IL4, IL6, e IL10), essas citocinas tem um grande papel em auxiliar os linfócitos B a secretar anticorpos, que são moléculas do sistema

humoral. As células do tipo Th1 secretam interferon, ativando as células efectoras citotóxicas (macrófagos, células NK e linfócitos T CD8+), estimulando a imunidade celular (48).

Nesse estudo, também foi analisada a produção da IL-17, sendo que no momento basal os pacientes infectados com HIV apresentaram níveis mais elevados em comparação ao grupo controle (HIV-). Na 3ª dose da imunização, os pacientes HIV positivos apresentaram uma baixa produção de IL17 comparado com as demais doses. A citocina IL-17 é produzida pelos linfócitos TCD4, e alguns estudos apontam o papel patogênico dessa citocinas quando elevadas com associação do desenvolvimento de alguns tipos de câncer e crescimento de tumores, dentre eles câncer de próstata e de ovário (57).

A IL-6 foi que a apresentou maiores títulos entre todas as citocinas descritas do nosso estudo. Observou-se elevada produção da IL-6 em todos os grupos, desde do momento da vacinação (basal) até a 3ª dose pós-vacinação. A citocina IL-6, é pertencente ao perfil Th2, considerada uma citocina pró inflamatória que promove maturação e ativação dos neutrófilos, maturação dos macrófagos e diferenciação dos linfócitos T citotóxicos (45). Alguns estudos demonstram a associação da IL-6 com os desenvolvimento dos casos de câncer cervical, onde através de biópsias mensuradas foram encontrados níveis elevados dessa citocina, embora sua função ainda continue indefinida(49).

A citocina IL-10 é um polipeptídio, sendo considerada pró-inflamatória, produzida pelos macrófagos e monócitos ativados que induzem a estimulação endógena das citocinas anti-inflamatórias(45). No nosso estudo podemos observar uma maior produção de IL- 10 após a segunda dose da vacinação, nas outras doses da vacinação observamos níveis baixos comparados a outras citocinas estudadas neste estudo. Nossos dados corroboram com um estudo realizado em mulheres HIV – a partir de secreções vaginais onde foi observada menores concentrações de IL-10 (59). Os Níveis de IL-10 elevados estão associados a biópsias de tumores cervicais que demonstraram a presença de níveis elevados IL-10 nas amostras, explicando o estado imunossupressivo dos pacientes com câncer cervical (60).

Os interferons são proteínas produzidas por células envolvidas na resposta imune, os linfócitos T CD4+ e T CD8+ são as principais fontes de interferons (42-54) tem propriedades antivirais, imunopotencializadoras e atividades antiproliferativas, (41, 48, 52) o interferon é sugerido por alguns estudos como tratamento alternativo para

infecções pelo HPV (49). Os níveis de IFN- γ foram medidos a partir do sobrenadante de cultura de linfócitos T CD4+, no momento basal obtivemos uma elevada produção do Grupo controle e do grupo A em comparação ao grupo B. Outros estudos demonstraram aumentos nos níveis de produção de citocinas por PBMC em resposta ao HPV VLP-16 após a vacinação, uma tendência de respostas ao IFN- γ após dois meses a primeira vacinação foi demonstrada(57). Corroborando com os dados do nosso estudo onde obteve significância entre os grupos CD4< 500 versus CD4> 500 $p < 0.001$.

O TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), é considerado um dos principais mediadores da inflamação na pele e mucosa (57), e possui um efeito anti-proliferativo nas células epiteliais normais (45- 47). Os resultados de nosso estudo demonstraram uma produção elevada de TNF- α após a primeira dose da vacinação. Alguns estudos relataram altos níveis de TNF- α em pacientes quando associados com lesão de alto grau por HPV(57). Não há dados que demonstrem níveis de TNF pós vacinação.

O nosso estudo apresentou limitações como: número pequeno de pacientes e controles, pouco tempo de acompanhamento, não permitindo uma maior comparação com a população HIV negativa. Outro fator não estudado foi se houve alguma reação cruzada da vacina, podendo assim proteger outros tipos de HPV, não presentes na vacina, além de analisar por mais tempo por um maior período as titulações no soro desses pacientes.

Existem poucos estudos na literatura mostrando os níveis de citocinas, ligada à história natural da infecção pelo HPV. Nosso trabalho apresenta informações muito relevantes que estimulam a realização de mais estudos nessa população para um melhor entendimento da regulação da resposta imune antiviral mediada por linfócitos T. É esperado que os dados do nosso estudos possa corroborar para a vacinação nessa população, diminuindo assim o risco de uma infecção, mortalidade e morbidade das doenças causadas pelo HPV em homens (48).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Foi observada soroconversão da vacina bivalente anti-HPV em torno de 92% nos pacientes infectados pelo HIV, em um vírus semelhante ao grupo não infectado pelo HIV (100%);
2. A contagem de linfócitos T CD4+ em pacientes infectados pelo HIV não foi um fator determinante, independente da contagem de linfócitos os pacientes foram respondedores a vacinação anti-HPV;
3. Na população estudada observou-se resposta TH1 e Th2, através das presenças de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias:
4. Foi observada uma elevada produção de interferon nessa população, demonstrando o Interferon INF como uma forte resposta antiviral, indicativo de uma maior resposta de TH1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zur Hausen H, Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infection and Human genital cancer, *Gynecol Oncol*. 1981; 12:S124 .
2. Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug;127(8):935-9.
3. Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9311-6.
4. Betiol J, Villa LL, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Mar 15;46(3):217-26.
5. Vargas LOS, Hernández, C. D., Martínez, A. M. Detection of Human papillomavirus (HPV) in oral mucosa of women with cervical lesions and their relation to oral sex practices. *Infect Agents Cancer*. 2010;5:25
6. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010 Jan-Feb;76(1):78-84.
7. Cutts FT, Franceschi, S. , Goldie, S. , Castellsague, X. , Sanjose, S. , Garnett, G , Edmunds, W. J., Claeys, P. , Goldenthal, K. L. , Harper, D. M. , Markowitz, L. . Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletim - WHO*. 2013;91.
8. Seifi S, Asvadi Kermani I, Dolatkah R, Asvadi Kermani A, Sakhinia E, Asgarzadeh M, et al. Prevalence of oral human papilloma virus in healthy individuals in East azerbaijan province of iran. *Iran J Public Health*. 2013;42(1):79-85.
9. Nurena CR, Brown B, Galea JT, Sanchez H, Blas MM. HPV and genital warts among Peruvian men who have sex with men and transgender people: knowledge, attitudes and treatment experiences. *PLoS One*. 2013;8(3):e58684.
10. Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer*. 2009 May 15;124(10):2375-83.
11. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:16.
12. Alves DB, Tozetti, I. A., Gatto, F. A., Cassandri, F., Ferreira, A. M. T., Fernandes, C. E. S. , et. al. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):425-9.
13. Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*. 2010;5:19.
14. Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct;10(10):681-92.
15. Ciavarra G, Ho AT, Cobrinik D, Zacksenhaus E. Critical role of the Rb family in myoblast survival and fusion. *PLoS One*. 2011;6(3):e17682.
16. Smith-McCune KK, Shiboski S, Chirenje MZ, Magure T, Tuveson J, Ma Y, et al. Type-specific cervico-vaginal human papillomavirus infection increases risk of HIV acquisition independent of other sexually transmitted infections. *PLoS One*. 2010;5(4):e10094.
17. Figliuolo G, Maia J, Jalkh AP, Miranda AE, Ferreira LC. Clinical and laboratorial study of HPV infection in men infected with HIV. *Int Braz J Urol*. 2012 May-Jun;38(3):411-8.
18. Kreuter A, Brockmeyer NH, Weissenborn SJ, Gambichler T, Stucker M, Altmeyer P, et al. Penile intraepithelial neoplasia is frequent in HIV-positive men with anal dysplasia. *J Invest Dermatol*. 2008 Sep;128(9):2316-24.
19. Fauci AS, Morens DM. The perpetual challenge of infectious diseases. *N Engl J Med*. 2012 Feb 2;366(5):454-61.
20. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira ED, Jr., Penny ME, Aranda C, et al. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males. *N Engl J Med*. 2011 Feb 3;364(5):401-11.
21. Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Gonzalez P, Kreimer AR, et al. Prevention of persistent human papillomavirus infection by an HPV16/18 vaccine: a

- community-based randomized clinical trial in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer Discov.* 2011 Oct;1(5):408-19.
22. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsague X, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jan;13(1):89-99.
  23. Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Mar 3;102(5):325-39.
  24. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira ED, Jr., Aranda C, Jessen H, et al. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 2011 Oct 27;365(17):1576-85.
  25. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 1993 Jan;67(1):315-22.
  26. Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, et al. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009 Oct;2(10):868-78.
  27. Rose RC, Bonnez W, Reichman RC, Garcea RL. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol.* 1993 Apr;67(4):1936-44.
  28. Longet S, Schiller JT, Bobst M, Jichlinski P, Nardelli-Haeffliger D. A murine genital-challenge model is a sensitive measure of protective antibodies against human papillomavirus infection. *J Virol.* 2011 Dec;85(24):13253-9.
  29. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer.* 2006 Mar 1;118(5):1071-6.
  30. Ramanakumar AV, Thomann P, Candeias JM, Ferreira S, Villa LL, Franco EL. Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human papillomavirus infection. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):791-6.
  31. Veiga AR, Casseb J, Duarte A.J.S, Humoral response to hepatitis B vaccination and its relationship with T CD45 + (naive) and CD4RO+ (memory) subset in HIV-1 infected subjects. *J Vaccine.* 2006 Jun; (24) 7124-7128.
  32. Wilkin T, Lee JY, Lensing SY, Stier EA, Goldstone SE, Berry JM, Jay N, Aboulafia D, Cohn DL, Einstein MH, Saah A, Mitsuyasu RT, Palefsky JM. Safety and immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in HIV-1-infected men *J Infect Dis* 2010;202(8):1246-53.
  33. Levin MJ, Moscicki AB, Song LY, et al. Safety and immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine in HIV-infected children 7 to 12 years old. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;55:197-204.
  34. Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo- controlled multicenter phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005;6:271-278.
  35. Staprans SI, Hamilton BL, Follansbee SE, et al. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1995;182:1727-1737
  36. BOSCH, F. Xavier; QIAO, You-Lin; CASTELLSAGUÉ, Xavier – The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer - *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, Chapter 2, nº94. (2006).
  37. 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.
  38. 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.

39. 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.
40. PALEVSKY, Joel M.; GIULIANO, Anna R.; GOLDSTONE, Stephen; et al – HPV Vaccine against Anal HPV Infection and Anal Intraepithelial Neoplasia. The New England Journal of Medicine. Nº365. (2011) p.1576-1585.
41. STANLEY MARGARET. HPV - immune response to infection and vaccination. Infectious Agents and Cancer. Department of Pathology, University of Cambridge,. Vaccine, v.24 Suppl 1, Mar 30, p.S16-22. 2006.
42. Stanley, M. A. Immune responses to human papilloma viruses. Indian J Med Res, v.130, n.3, Sep, p.266-76. 2009.
43. 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.
44. Michels KB, zur Hausen H. HPV vaccine for all. Lancet. 2009 Jul 25;374(9686):268-70. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61247-2. Epub 2009 Jul 6.
45. Caio Marcio Barros de Oliveira, Riako Kimiko Sakata, TSA, Adriana Machado Issy, Luiz Roberto Gerola, Reynaldo Salomao. **Citocinas e Dor**. Revista Brasileira de Anestesiologia 2011;61(2):255-265 Elsevier.
46. R.J.C. Silva, J Casseb, M.A.Andreoli and L.L.Villa. Persistence and Clearance of HPV From the Penis of Men Infected and Non-infected with HIV. Journal of Medical Virology 83:127-131(2011).
47. Paulo R. L Machado, Lucas Carvalho, Maria Ilma, A.S ARaujo, Edgar M. Carvalho. Mecanismo de resposta imune à infecções. Na Brasileira de Dermatologia, Rio de Janeiro, 79 (6): 647-664/2004.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
- 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.
- 55.** 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.
- 56.** 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
- 57.** Deshpande, A; Nolan, JP; White, P.S; Valdez, Y.E.; Hunt, W.C.; Peyton, C.L.; Wheeler, C.M. TNF- α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16-Associated Cervical Cancer. The Journal of Infectious Diseases; 2005; 191:969-76
- 58.** Pinto, L.A., Edwards, J., Castle, P.E., Harro, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Wallace, D., Kopp, W., Adelsberger, J.W., Baseler, M.W., Berzofsky, J.A., Hildesheim, A., 2003. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. J. Infect. Dis. 188 (2), 327-338.
- 59.** Garcia-Pineros, A. J., A. Hildesheim, M. Trivett, M. Williams, L. Wu, V. N. Kewalramani, and L. A. Pinto. 2006. Role of DC-SIGN in the activation of dendritic cells by HPV-16 L1 virus-like particle vaccine. Eur. J. Immunol. 36:437-445.
- 60.** 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.
- 61.** Collier B, Goobar-Larsson L, Sokolowski M, Schwartz S. Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. J Biol Chem. 1998 Aug 28; 273(35):22648-56

Anexo A TCLE

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE .....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: RESPOSTA ESPECÍFICA AOS ANTÍGENOS DA VACINA ANTI-HPV EM HOMENS INFECTADOS PELO HIV-1

PESQUISADOR : Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

CARGO/FUNÇÃO: Médico-Pesquisador

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : CRM/SP 67217

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de São Paulo

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☒	RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

- 1- Objetivo: O senhor está sendo convidado a participar de um estudo sobre “Análise da resposta específica aos antígenos da vacina anti-HPV, e a detecção produção de resposta usando a vacina nos pacientes homens infectados pelo HIV-1”.

As possibilidades a serem testadas, serão fundamentais para aprofundar o conhecimento da resposta da vacina em pessoas com HIV, assim, colaborando para o desenho de novas vacinas contra o HPV em nosso meio.

2- Descrição dos procedimentos: Para participar do estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço e outros). Estas informações serão mantidas em sigilo, ou seja, o seu nome não será divulgado e as amostras receberão um código para a identificação. Em nosso grupo de pesquisa há outras pesquisas relacionada com HPV na saliva e urina, que serão fundamentais para detecção de HPV positivos e negativos, serão coletas 20 mL (a partir de uma solução salina) do bochecho, os resultados HPV negativos serão encaminhados para receber as dosagens da vacinas. Após esta etapa, será coletado do senhor 10 mL, através de punção venosa do sangue periférico, para dosar anticorpos, depois será aplicado a vacina anti-(HPV) Gardasil® (Merck & Co., Inc., Hitehouse Station, NJ, EUA), contando de 0, 2 e 6 meses, a aplicação será realizada por enfermeiras do Hospital das Clínicas, em cada dose aplicada da vacina serão coletados 10 mL amostras sanguíneas, equivalente a duas colheres de sopa.

3- Relação dos procedimentos: Esta coleta será realizada com uma agulha esterilizada conectada em um tubo de vidro contendo anticoagulante (EDTA) e será introduzida em uma veia do seu antebraço, retirando o sangue para dentro do tubo por um processo a vácuo.

4- Desconfortos e riscos: A coleta pode acarretar em baixo risco a sua saúde e o desconforto gerado consiste em uma picada durante a introdução da agulha no antebraço, idêntica ao procedimento normal de coleta de sangue. Isso às vezes pode acarretar um pequeno sangramento e/ou uma mancha (hematoma) na pele que desaparecerá em pouco tempo.

A vacina será aplicada com uma agulha esterilizada, descartável, e será aplicada no seu braço. A aplicação da vacina pode acarretar alguns desconfortos como dor, febre, vermelhidão e edema no local da aplicação.

5- Benefícios: O senhor não receberá nenhum benefício direto por fazer parte deste estudo. As informações obtidas poderão ajudar a outras pessoas que tenham o HIV e na prevenção do HPV.

6- Garantia de Liberdade: O senhor também tem o direito de optar por não participar do estudo. Caso o senhor decida não participar, isto em nada afetará o seu direito a receber tratamento na rede pública de saúde, incluindo nosso serviço.

7- Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Os documentos contendo suas informações serão guardados em local seguro e somente o pesquisador responsável e o executante terão acesso.

8-Direito de ser Atualizado: Nós lhe comunicaremos sobre novas informações deste ou de outros estudos que possam afetar sua saúde, bem-estar ou vontade de continuar participando deste estudo. Quando o estudo terminar, nós lhe informaremos os resultados.

9- Despesas e compensações: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal relacionado com os procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

11- Garantia de Acesso: Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Jorge Casseb e a executante Adriele Souza Fontes que podem ser encontrados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental - LIM/56 Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 / prédio IMT II / 3º andar ou pelos telefones: (11) 3061-7193 / 7457. Se o(a) senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

12- Todos os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Reforçamos que participar do estudo é um ato inteiramente voluntário. O(A) senhor(a) pode preferir não participar do estudo ou abandoná-lo a qualquer momento. O(A) senhor(a) será tratado da mesma forma, independentemente de sua decisão. Nós prestaremos todos os serviços clínicos e profissionais de diagnóstico e de laboratório que fizerem parte do estudo, sem que isso incorra em custo algum para o(a) senhor(a).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo : Análise da resposta específica aos antígenos da vacina anti-HPV, e a detecção produção de resposta imune nos pacientes homens infectados pelo HIV-1.

Eu discuti com o Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal   Data   ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo B Questionário Sócio/ comportamental

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA: Resposta Específica aos antígenos da vacina anti-hpv em homens infectados pelo HIV-1.

A-Dados Pessoais

Identificação: _____

Telefone: _____

Data da entrevista _____/_____/_____

Data de Nascimento: _____/_____/_____

Escolaridade:

- 1 ( ) nenhuma.
- 2 ( ) de 1ª a 4ª série.
- 3 ( ) de 5ª a 8ª série.
- 4 ( ) 2º grau.
- 5 ( ) superior.
- 6 ( ) não quero responder.

Renda familiar em salários mínimos:

- 1 ( ) < 2.
- 2 ( ) de 2 a 4.
- 3 ( ) de 5 a 10.
- 4 ( ) maior que 10.
- 5 ( ) não sabe.
- 6 ( ) não quero responder.

Situação marital:

- 1 ( ) casado/amigado
- 2 ( ) solteiro
- 3 ( ) separado
- 4 ( ) viúvo
- 5 ( ) não quero responder.

Raça/cor (auto-referida) que você se considera :

- 1( ) branca
- 2( ) preta
- 3( ) amarela
- 4( ) parda
- 5( ) indígena
- 6( ) não quero responder.

B – Hábitos de vida**Faz ingestão de bebida alcoólica**

- 1( ) não
- 2( ) sim, as vezes
- 3( ) sim, uma vez por dia
- 4( ) sim, mais de uma vez por dia

Fuma

- 1( ) não
- 2( ) sim as vezes
- 3( ) sim uma vez por dia
- 4( ) sim mais de uma vez por dia

Já fumou

- 1( ) não
- 2( ) alguns meses
- 3( ) entre 1 e 5 anos
- 4( ) entre 5 e 10 anos
- 5( ) entre 10 e 15 anos
- 6( ) mais de 15 anos

Quanto tempo parou de fumar

- 1( ) nunca fumei
- 2( ) alguns dias
- 3( ) alguns meses

4( ) anos

C- Dados comportamentais

Idade da 1ª relação sexual:(   )

Relação sexual nos últimos 12 meses:

1 ( ) não teve

2 ( ) só com mulheres

3( ) com homens e mulheres

4( ) só com homens

5( ) não quero responder.

Usa preservativo com parceira (o) eventual:

1( ) não tem parceira (o) eventual

2( ) sempre

3( ) às vezes usa

4( ) nunca usa

5( ) não quero responder.

Usa preservativo com parceira (o) fixa (o):

1( ) não tem parceira fixa (o).

2( ) sempre.

3( ) às vezes usa.

4( ) nunca usa.

5( ) não quero responder.

Pratica relações anais como ativo? (Você colocando o seu pênis no ânus do (a) parceiro (a))

( ) não pratico

( ) sim e sempre uso preservativo

( ) sim e, às vezes uso preservativo

( ) sim e nunca uso preservativo

Pratica relações anais como passivo ? (Você recebendo o pênis do seu parceiro no seu ânus)

- 1( ) não pratico
- 2( ) sim e sempre uso preservativo
- 3( ) sim e, às vezes uso preservativo
- 4( ) sim e nunca uso preservativo

Pratica relação oral como ativo(a)? (você chupando o pênis ou vagina do seu parceiro/a)

- 1( ) não pratico
- 2( ) sim e sempre uso preservativo
- 3( ) sim e, às vezes uso preservativo
- 4( ) sim e nunca uso preservativo

Pratica relação oral como passivo (a)?(você sendo chupado pelo seu (sua) companheiro(a))

- 1( ) não pratico.
- 2( ) sim e sempre uso preservativo.
- 3( ) sim e, às vezes uso preservativo.
- 4( ) sim e nunca uso preservativo.

Número de mulheres com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses:

- 1( ) nenhum.
- 2( ) só uma.
- 3( ) duas a quatro.
- 4( ) cinco a dez.
- 5( ) mais de dez.
- 6( ) não quero responder.

Número de homens com quem teve relações sexuais nos últimos 12 meses:

- 1( ) nenhum.
- 2( ) só um.
- 3( ) dois a quatro.
- 4( ) cinco a dez.

5( ) mais de dez.

6( ) não quero responder.

Já usou ou usa algumas das drogas abaixo:

1( ) maconha.

2 ( ) cocaína.

3( ) craque.

4( ) LSD.

5( ) ecstasy.

6( ) cola

7( ) mais de uma anterior.

8( ) nenhuma.

Já teve nos órgãos genitais, alguma vez na vida:

Corrimento

1( ) sim

2( ) não

verruga (s)

1( ) sim

2( ) não

Ferida (s)

1( ) sim

2( ) não

Vesículas

1( ) sim

2( ) não

D-EXAMES LABORATORIAIS

DATA DO TESTE HIV: ____/____/____

Forma de contaminação:

1( ) prática HSM (homem faz sexo com mulher)

2 ( ) prática HSH (Homem que

faz sexo com homem)

3( ) UDI(usuário de drogas injetável)

4( ) Hemotransfusão

5( ) não sei

6( ) não quero responder.

Carga viral do HIV inicial:_____Log:_____

Carga viral do HIV atual: _____Log:_____

CD4inicial_____21CD8inicial_____22CD4/CD8inicial_____

CD4atual_____24-CD8atual_____25-CD4/CD8atual_____

Uso de medicação para HIV atualmente?

1 ( ) sim

2( ) não

Se sim,quais?_____

Tem queimação a urinar?

1( ) sim

2 ( ) não

E-Exame físico

Tem corrimento na uretra?

1( ) sim

2( ) não

Outras lesões?_____

Resultado da PCR:_____

Anexo C Aprovação comitê de Ética HC/FMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0562/11
Título: "ANÁLISE DA RESPOSTA ESPECÍFICA AOS ANTÍGENOS DA VACINA ANTI-HPV EM HOMENS INFECTADOS PELO HIV-1".
Pesquisador Responsável: DR. JORGE SIMÃO DO ROSÁRIO CASSEB
Pesquisador Executante: ADRIELE SOUZA FONTES
Co-autores: FERNANDO COSTA, KAREN OLIVEIRA
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Departamento: DERMATOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU ad-referendum** o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 20 de Setembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo D Registro Clinical Trials

Protocol Registration Receipt
04/17/2014

Immune Response to HPV Vaccine Among HIV-1-infected Subjects in Brazil

This study has been completed.

Sponsor:	University of Sao Paulo
Collaborators:	University of Sao Paulo
Information provided by (Responsible Party):	Jorge Casseb, University of Sao Paulo
ClinicalTrials.gov Identifier:	

► Purpose

The study was divided into three groups. Patients infected with HIV - 1 were subdivided into groups according to T CD4 + lymphocytes at the time of vaccination : Group 1 : CD4 > 500 ; Group 2 : CD4 < 500 , and the control group was classified as group 3 .

In general , eight participants (40 %) had levels consistent with seroconversion 30 days after the first dose . The control group presented three (60 %) individuals with titles such as seroconversion (p =) .

Six HIV-infected individuals were not included in the analysis at this stage of the project , due to the positivity in the basal sample detected in ELISA (possible indication of HPV infection)

Condition	Intervention	Phase
Infection	Biological/Vaccine: HPV vaccine	Phase 4

Study Type: Interventional

Study Design: Prevention, Single Group Assignment, Open Label, N/A, Efficacy Study

Official Title: Immune Response to HPV Vaccine Among HIV-1-infected Subjects in Brazil

Further study details as provided by Jorge Casseb, University of Sao Paulo:

Primary Outcome Measure:

- Antibodies HPV titers [Time Frame: every month] [Designated as safety issue: Yes]

Secondary Outcome Measures:

- HIV viral load [Time Frame: every 30 days] [Designated as safety issue: Yes]

Other Pre-specified Outcome Measures:

- cluster of differentiation 4 [Time Frame: monthly] [Designated as safety issue: Yes]

Enrollment: 40

Study Start Date: January 2012

Study Completion Date: January 2014

Primary Completion Date: January 2013

Arms	Assigned Interventions
Experimental: Vaccine one group with HPV vaccine	Biological/Vaccine: HPV vaccine Other Names: cervix

The study was divided into three groups. Patients infected with HIV - 1 were subdivided into groups according to T CD4 + lymphocytes at the time of vaccination : The mean age of group 1 was 30.44 years, with most patients reported having completed higher education (66.7 %) and single (77.8 %) . In relation to sexual risk exposure , most reported not having sexual intercourse in the last year (50 %) had used condoms with steady and casual partner (77.8 %) , performed oral sex as assets and liabilities (77.7 %) , and anal sex as assets and liabilities (66.7 % and 55.5 %).

Of the nine patients , three (30 %- 55.6 %) seroconverted after the first dose of vaccine , and 55.6 % had undetectable viral load (< 50 copies) and 66.7 % make use of HAART .

In group 2 , the mean age was 34.5 years , with 80 % on HAART , 100 % with undetectable viral load and 30% seroconverted after the first dose of vaccine (Table 1) . Most patients reported having the 2nd degree such as education level , had relationship with several female partners (60 %) and said condom use with both steady partner with as possible (80 %) . Most reported not having had anal intercourse active and passive (70 %) , and oral intercourse as assets and liabilities (50 %) . In the control group , the mean age was 32.4 years and 60% seroconversion . Most claimed to have full and single top . 60 % reported having had sex with multiple female partners , and condom use with occasional and regular partner (80 % and 60 %) . (Table 1).

► Eligibility

Ages Eligible for Study: 35 Years to 45 Years

Genders Eligible for Study: Male

Accepts healthy volunteers.

Inclusion Criteria: HIV

-

Exclusion Criteria:

- HPV

► **Contacts and Locations**

Investigators

Principal Investigator: jorge casseb, PhD USP

► **More Information**

Responsible Party: Jorge Casseb, PI, University of Sao Paulo

Study ID Numbers: 2010/07076-4

FAPESP [Grant/Funding Number: 2010/07076-4]

Health Authority: Brazil: National Committee of Ethics in Research