

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

CAETANO GALVÃO PETRINI

**Perfil intralesional de citocinas em lesões intraepiteliais de baixo e alto grau do
colo uterino**

RIBEIRÃO PRETO

2020

CAETANO GALVÃO PETRINI

Perfil intralesional de citocinas em lesões intraepiteliais de baixo e alto grau do colo uterino

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Tocoginecologia.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Profa. Dra. Silvana Maria Quintana

RIBEIRÃO PRETO

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Petrini, Caetano Galvão

Perfil intralesional de citocinas em lesões intraepiteliais de baixo e alto grau do colo uterino. Ribeirão Preto, 2020.

99p. :il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia
Orientador: Quintana, Silvana M.

1. Papiloma Vírus Humano.
2. Citocinas.
3. Colo uterino.
4. Lesão intraepitelial cervical.

RESUMO

PETRINI, C. G. **Perfil intralesional de citocinas em lesões intraepiteliais de baixo e alto grau do colo uterino.** 2020. 99. f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A infecção persistente pelo HPV está relacionada ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e carcinoma invasor do colo uterino. A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental na eliminação ou persistência do HPV. A maioria dos estudos sobre a resposta imune local ao HPV realizou a coleta de muco cervical para a análise quantitativa de citocinas secretadas; no entanto, essa amostragem pode refletir apenas a resposta das células no epitélio da superfície, enquanto as células localizadas no interior do tecido podem liberar citocinas diferentes associadas à infecção pelo HPV. Este estudo teve como objetivo quantificar as citocinas: interleucina (IL-) 2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e INF- γ em amostras de biópsias de colo uterino de mulheres com achados colposcópicos anormais e comparar suas concentrações entre amostras com laudo anatomopatológico de Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LIEBG), Lesão Intraepitelial de Alto Grau (LIEAG) e amostras de biópsias que não revelaram lesão intraepitelial (Ausência de Lesão Intraepitelial – ALIE). Para cumprir este objetivo foi realizado um estudo observacional analítico quantificando estas citocinas através do método Elisa Luminex em amostras de lesões de colo uterino de 141 pacientes. Para verificar se houve diferença nos níveis de citocinas entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As 141 amostras incluíram 90 LIEAG, 22 LIEBG e 29 ALIE. Os níveis de IL-2 foram significativamente maiores no grupo ALIE do que no LIEBG ou no LIEAG ($p = 0,0001$) e os níveis de IL-23 foram significativamente maiores no ALIE do que no LIEAG ($p = 0,003$). Nosso estudo mostrou que citocinas pró-inflamatórias importantes, IL-2 e IL-23, são reguladas negativamente em lesões por HPV. Coletando amostras do ponto do local da lesão, fornecemos uma compreensão do mecanismo de resposta imune no microambiente das lesões intraepiteliais cervicais.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano. Citocinas. Colo Uterino. Lesão intraepitelial cervical.

ABSTRACT

PETRINI, C. G. **Intralesional cytokine profile in low and high grade cervix intraepithelial lesions.** 2020. 99. f. Thesis (doctorate degree) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Infection with persistent high-risk HPV types is associated with high-grade intraepithelial lesions and invasive cervical cancer. The host immune response plays a key role in whether HPV clears or persists. Most studies on local immune response to HPV collect cervical mucus in order to quantify secreted cytokines; however, this sampling may reflect only the response from cells on the surface epithelium, whereas cells located inside the tissue can release different cytokines associated with HPV infection. This study aimed to measure cervical levels of cytokines interleukin (IL-) 2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 and IL-23, and interferon- γ (INF- γ), in biopsy specimens from women with abnormal colposcopic findings and compare their concentrations in histologically confirmed LSIL (low-grade intraepithelial lesion), HSIL (high-grade intraepithelial lesion), and specimens negative for intraepithelial lesion (no intraepithelial lesion, NSIL). A cross-sectional study of cervical biopsy specimens from 141 women with cervical lesions examined the cytokine profile, using the Luminex/Elisa assay. Differences in cytokine levels among the cervical lesion groups were assessed using the Kruskal-Wallis test. The 141 specimens included 90 HSIL, 22 LSIL, and 29 NSIL. IL-2 levels were significantly higher in NSIL than in LSIL or in HSIL ($p=0.0001$) and IL-23 levels were significantly higher in NSIL than in HSIL ($p=0.003$). Our study showed that important pro-inflammatory cytokines, IL-2 and IL-23, are downregulated in HPV lesions. By collecting samples from the lesion site point, we provide an understanding of immune response mechanism in microenvironment of cervical intraepithelial lesions.

Keywords: Human Papilloma Virus. Cytocines. Cervix. Intraepithelial lesions.

Nome: PETRINI, Caetano Galvão

Título: Perfil intralesional de citocinas em lesões intraepiteliais de baixo e alto grau do colo uterino

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Tocoginecologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedico esta Tese às pacientes,

**Que permitiram que este estudo fosse realizado e são a razão para que
continuemos em busca de novas descobertas e avanços para a saúde da
mulher.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. **Silvana Maria Quintana**, que além de ser um exemplo de competência, sabedoria e profissionalismo, tornou a convivência durante a realização deste trabalho extremamente agradável, pois por onde passa transmite sua alegria e bom humor.

À minha mãe **Ana Maria Galvão Petrini**, pela dedicação e esforço em minha criação, por ter lutado muito para que eu tivesse sempre a melhor educação e por estar sempre preparada para aplaudir minhas conquistas e me incentivar a superar meus momentos de dificuldades.

Ao meu pai **Bruno Petrini Neto**, pelo exemplo de dedicação e superação para alcançar o sucesso profissional que fez com que eu seguisse seus passos, pelo esforço em me proporcionar as melhores oportunidades de estudo e por me incentivar a estar sempre buscando mais conhecimentos.

À minha esposa **Laura Penna Rocha**, por me dar o apoio e incentivo para enfrentar este desafio que é a pós-graduação, por ser uma mãe tão dedicada à nossa filha, muitas vezes tendo que cuidar dela sozinha para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

À minha filha **Isadora Rocha Petrini**, por ser a motivação para que eu atinja o sucesso e possa ser um motivo de orgulho para ela.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, que me permitiu crescer profissionalmente e por ser minha casa durante minha residência em Ginecologia e Obstetrícia, residência em Medicina Fetal e durante a realização deste Doutorado.

À **Universidade Federal Do Triângulo Mineiro** e todos seus professores, por terem participado não só da minha formação como médico, mas também de minha formação com ser humano.

Aos colegas do Ambulatório de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia (AMIG), **Dra Patrícia Pereira dos Santos Melli, Dr. Ênio Damaso e**

Dra Tatiana Roberti Rocha, pela amizade e ótima convivência durante o período de coleta das amostras e por todos os ensinamentos passados durante e este período.

Às funcionárias do AMIG, **Ingrid Cotrim, Tânia Maria, Maria do Carmo, Elica Silveira, Juliana Angélica, Maria Aparecida (Cida), Rita Cardoso, Tatiana Oliveira e Maria Helena** por serem sempre prestativas e pela ajuda durante a coleta das amostras.

À funcionária **Giuliana Bertozi**, pela imprescindível e excelente assistência técnica para a quantificação de citocinas, sem a qual este trabalho jamais seria realizado.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (DGO – FMRP/USP)** e todos seus funcionários pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da FMRP/USP à época de minha aprovação, **Prof.Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli**, pela oportunidade e confiança.

A todos meus **familiares e amigos** que sempre torceram pelo meu sucesso.

Agradeço, enfim, a **Deus** que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

— *Claude Lévi-Strauss*

Este trabalho contou com os seguintes apoios financeiros:

- **Fundação de Assistência ao Ensino e Pesquisa (FAEPA)** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

- **Pró-Reitoria de Pós-Graduação** da Universidade de São Paulo.

- **Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia** da FMRP/USP

- **Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES)**.

- **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**.

- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	-	Atipias de células glandulares
ALIE	-	Ausência de Lesão Intraepitelial
AMIG	-	Ambulatório de Moléstias Infecto-contagiosas em Ginecologia
AR-HPV	-	Papilomavírus Humano de Alto Risco
APC	-	Células Apresentadoras de Antígenos
ASC-H	-	Atipias de células escamosas, não podendo afastar lesão de alto grau
ASC-US	-	Atipias de células escamosas de significado indeterminado
BR-HPV	-	Papilomavírus Humano de Baixo Risco
°C	-	Graus Celsius
CAF	-	Cirurgia de Alta Frequência
CEC	-	Carcinoma Espinocelular
CD	-	Cluster of differentiation
cm	-	Centímetros
DC	-	Células Dendríticas
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DP	-	Desvio Padrão
E	-	Early genes
EUA	-	Estados Unidos da América
EZT	-	Excisão da Zona de Transformação
G	-	Gravidade (força)
HC/FMRP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto

HCL - Ácido Clorídrico

HPV - Papilomavírus Humano

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IFCPC - Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia

IL - Interleucina

INCA - Instituto Nacional de Câncer

INF - Interferon

JEC - Junção Escamo-Colunar

KCL - Cloreto de Potássio

L - Late genes

LC - Células de Langerhans

LIE - Lesão Intraepitelial

LIEAG - Lesão Intraepitelial de Alto Grau

LIEBG - Lesão Intraepitelial de Baixo Grau

mg - Miligrama

mM - Milimolar

μ M - Micromolar

μ L - Microlitro

mL - Mililitro

MV - Mirobioma Vaginal

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical

NK - Natural Killers

pb	-	Pares de Base
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	-	Picrograma
RRP	-	Receptores de Reconhecimento de Padrão
SEMIGO	-	Setor de Moléstias Infecto-contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia
T/A	-	Temperatura Ambiente
TBE	-	Tris-ácido Bórico-EDTA
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEMED	-	Tetrametiletilenodiamina
TGF	-	Transforming growth factor
Th	-	T helper
TLR	-	Receptores Toll-Like
Tris	-	Aminometano (hidroximetil)
USP	-	Universidade de São Paulo
V	-	Volt
χ^2	-	Qui-Quadrado
ZT	-	Zona de Transformação

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequências dos iniciadores utilizados para detecção e tipificação do HPV através da técnica de PCR.....38

Quadro 2 - Condições da reação utilizada para detecção do HPV, utilizando os iniciadores consensuais GP5+/6+.....39

Quadro 3 - Condições da reação utilizada para tipificação do HPV.....39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma demonstrando a coleta de amostras.....	43
Figura 2 - Comparação da detecção do DNA HPV entre os grupos.....	46
Figura 3 - Comparação dos achados colposcópicos entre os grupos.....	47
Figura 4 - Nível de IL-2 (pg/ml) e IL-23 (pg/ml) entre os grupos, dados mostrados na forma de Box-plots (mediana, 25 ^o - 75 ^o percentis).....	49
Figura 5 - Nível de IL-2 (pg/ml/mg) e IL-23 (pg/ml/mg) entre os grupos, dados mostrados na forma de Box-plots (mediana, 25 ^o - 75 ^o percentis).....	52
Figura 6 - Mediana em pg/ml do nível das citocinas em cada grupo.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das 141 amostras submetidas à análise histológica de acordo com o grupo. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.....44

Tabela 2 - Distribuição das 141 mulheres com achados colposcópicos anormais submetidas à biópsia cervical de acordo com o diagnóstico histológico e os parâmetros clínicos epidemiológicos. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.....45

Tabela 3 – Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml) de acordo com os grupos. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.....49

Tabela 4 - Comparação entre pares para as citocinas IL-2 e IL-23, avaliação em pg/ml.....50

Tabela 5 - Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml/mg) de acordo com os grupos. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.....51

Tabela 6 - Comparação entre pares para as citocinas IL-2 e IL-23, avaliação em pg/ml/mg.....51

Tabela 7 - Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml) de acordo com PCR-HPV. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.....53

Tabela 8 - Mediana (intervalo interquartil) dos níveis de citocinas (pg/ml/mg) de acordo com o PCR-HPV. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.....54

Tabela 9 - Comparação entre pares de citocinas para cada grupo.....56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O SISTEMA IMUNE.....	23
2.2 A RESPOSTA IMUNE AO HPV.....	25
2.3 O CICLO DE VIDA DO HPV.....	25
2.4 RESPOSTA IMUNE INATA AO HPV.....	26
2.5 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA AO HPV.....	27
2.6 RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO HPV.....	28
2.7 INFECÇÃO PELO HPV DE ALTO RISCO.....	28
2.8 MICROBIOMA E A INFECÇÃO PELO HPV.....	29
2.9 OUTROS FATORES QUE INFLUENCIAM A RESPOSTA IMUNE AO HPV.....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	32
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	32
4 MÉTODOS	33
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	33
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.3 PARTICIPANTES.....	34
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	34
4.5 VARIÁVEIS.....	34
4.6 AVALIAÇÃO COLPOSCÓPICA.....	35
4.7 COLETA DAS AMOSTRAS.....	35
4.8 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS.....	36
4.9 AVALIAÇÃO QUALITATIVA PARA PCR-HPV.....	37
4.10 TAMANHO DA AMOSTRA.....	41

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS.....	43
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	43
5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA.....	44
5.3 DETECÇÃO DO DNA HPV.....	46
5.4 ACHADOS COLPOSCÓPICOS.....	47
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.....	48
5.5.1 TAXA DE DETECÇÃO DE CITOCINAS NAS AMOSTRAS.....	48
5.5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS E OS GRUPOS.....	48
5.5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS E PCR-HPV.....	52
5.5.4 DISTRIBUIÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS EM CADA GRUPO.....	54
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	86
ANEXO A: PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	86
ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	90
ANEXO C: TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	93
ANEXO D: PROTOCOLO DE PESQUISA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS SEMIGO.....	95

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) tem elevada prevalência na população sexualmente ativa e estima-se que em torno de 80% dessas pessoas irão adquirir esta infecção durante a vida (EINSTEIN et al., 2009). Existem mais de 200 genótipos de papiloma vírus conhecidos, subdivididos em 5 gêneros (α , β , γ , μ , ν), sendo o gênero α o de maior relevância para o desenvolvimento de doenças em humanos (VAN DOORSLAER, 2013). Este vírus possui tropismo por superfícies cutaneomucosas de diversas regiões corporais e está relacionado a um grande espectro de manifestações clínicas, sendo correlacionado ao surgimento de verrugas benignas e lesões malignas como câncer de colo uterino, câncer anorretal e alguns tipos de câncer de cabeça e pescoço (FORMAN et al., 2012).

Alguns tipos de HPVs estão mais associados ao aparecimento de lesões benignas como as verrugas genitais e/ou a Neoplasia Intraepitelial Cervical de baixo grau (NIC I), e por isso, são chamados de HPVs de baixo risco (BR-HPV). Os HPV 6 e 11 são os mais frequentemente associados a este tipo de lesão (LACEY; LOWNDES; SHAH, 2006; FORMAN et al., 2012). Outros tipos estão mais relacionados ao desenvolvimento de neoplasias malignas e por este motivo são chamados de HPVs de alto risco (AR-HPV). Estes vírus estão intensamente relacionados a cânceres ano-genitais, lesões pré-neoplásicas cervicais (Neoplasia Intraepitelial de alto grau - NIC II e NIC III) e ao câncer de colo do útero (PARKIN; BRAY, 2006). Foram descritos 15 tipos de HPV de alto risco, sendo que os dois mais prevalentes são o HPV16 e o HPV18 (BOSCH et al., 2008).

O HPV é o segundo agente infeccioso mais associado a neoplasias no mundo, perdendo apenas para o *Helicobacter pylori*. Sendo que o HPV foi responsável pelo surgimento de 530.000 novos casos de câncer de colo uterino no ano de 2012 no mundo todo (PLUMMER et al., 2016). No ano de 2018 foi estimada uma incidência em torno de 570.000 novos casos de câncer de colo uterino no mundo, com aproximadamente 300.000 mortes associadas a esta neoplasia (BRAY et al., 2018). Porém, este câncer se desenvolve após o curso de vários anos da infecção pelo HPV, sendo que as lesões pré-cancerígenas se desenvolvem antes, tendo então

uma lenta progressão de lesões pré-malignas para o câncer que dura em torno de 10-20 anos (SCHIFFMAN; KJAER, 2003).

As lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) também denominadas de neoplasia intraepiteliais cervicais grau I (NIC I) geralmente desaparecem espontaneamente, sendo consideradas alterações transitórias da infecção pelo HPV, porém infecções persistentes pelos AR-HPVs estão associadas ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau (NIC II e III) que podem progredir para carcinoma (BOSCH et al., 2002).

Embora a infecção pelo HPV seja assintomática e transitória para a maioria das mulheres, um pequeno percentual de pacientes torna-se permanentemente infectadas por este vírus. Que pesem fatores virais que influenciam na persistência, certamente a resposta imune local, isto é, os fatores dependentes do hospedeiro são fundamentais para esta persistência. As citocinas produzidas pelas células de defesa estão envolvidas nesta resposta e nem sempre os níveis plasmáticos destas substâncias se correlacionam com nível de citocinas na mucosa cervical (CASTLE et al., 2002). Além disso, o HPV tem grande capacidade de gerar infecções crônicas sem gerar sequelas sistêmicas (DOORBAR, 2005), por isso, estudos que avaliam a resposta imune local tornam-se importantes para a completa compreensão da resposta imune ao HPV (CASTLE; GIULIANO, 2003).

A deficiência qualitativa da resposta imunológica pode ser o motivo primário para o desenvolvimento de doenças e quando os esforços terapêuticos são focados exclusivamente para tratar as consequências dessas deficiências imunológicas resultam, no melhor dos casos, no controle limitado das doenças (CLERICI; SHEARER; CLERICI, 1998). Assim, a melhor compreensão dos fatores envolvidos na imunidade ao HPV pode trazer grandes contribuições para o entendimento das lesões intraepiteliais cervicais e fatores que levam à progressão destas lesões.

A avaliação de marcadores imunológicos tem sido cada vez mais estudada em várias áreas da medicina e as terapias imunológicas têm apresentado cada vez mais avanços, sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças como doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas ou cânceres diversos (DURCAN; PETRI, 2016; KJELDSSEN; DONIA; SVANE, 2018; MURER; NERI, 2019).

Atualmente o tratamento padrão para lesões intraepiteliais cervicais de alto grau é a excisão cirúrgica da zona de transformação anormal (EZT), que é um procedimento invasivo apresentando complicações a curto e em longo prazo, como aumento de subfertilidade e aumento do risco de parto pré-termo em uma gravidez subsequente (CRANE, 2003; KYRGIU et al., 2006; SPRACKLEN et al., 2013). A compreensão da imunidade local em lesões intraepiteliais cervicais pode contribuir para a descoberta de novos marcadores imunológicos, possibilitando no futuro, alternativas mais conservadoras para seu tratamento ou mesmo a descoberta de marcadores biológicos de prognóstico, influenciando na conduta clínica e no seguimento de nossas pacientes (KOENEMAN et al., 2015).

A maioria dos estudos que avaliou a imunidade no colo uterino em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais induzidas pelo HPV realizou a quantificação de citocinas no muco cervical ou lavado cervicovaginal (CASTLE et al., 2002; MARKS et al., 2011; TELESHEVA et al., 2012; SCOTT et al., 2013; EKALAKSANANAN et al., 2014; IWATA et al., 2015; DANILIDIS et al., 2016; LI et al., 2019; OTANI et al., 2019). No entanto, muitas citocinas são expressas a partir de células específicas que não estão localizadas na superfície do epitélio e a avaliação da secreção cervicovaginal estaria medindo apenas o transbordamento destas substâncias para o lúmen vaginal. (MARKS et al., 2012). Além disso, o perfil de citocinas nas secreções cervicovaginais pode sofrer influência de vários fatores como idade, status hormonal, infecções bacteriana, o que poderia influenciar nesta quantificação (KOSHIOL et al., 2014; MARKS et al., 2011, 2012).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de citocinas em biópsias cervicais, comparando amostras com diagnósticos histopatológicos de lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG), lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG) e amostras de biópsias que não revelaram lesão intraepitelial (Ausência de Lesão Intraepitelial – ALIE).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O SISTEMA IMUNE

O sistema imune pode ser dividido entre sistema imune inato e adaptativo sendo que as células T helper (Th) CD4+, após terem sido ativadas e diferenciadas em diferentes subtipos, desempenham um importante papel para mediar a resposta imune através de citocinas específicas (LUCKHEERAM et al., 2012). As células T helper podem ser subdivididas em vários grupos, com funções distintas: T helper tipo 1 (Th₁), T helper tipo 2 (Th₂), T helper produtoras de IL 17 (Th₁₇), células T regulatórias (Treg) e ainda novos tipos recém-descobertos como T helper produtoras de IL-9 (Th₉) e T helper folicular (Tfh). A diferenciação de cada linhagem depende de fatores específicos de transcrição para cada subtipo e de uma rede complexa de citocinas sinalizadoras (LUCKHEERAM et al., 2012).

Para diferenciação de células Th₁, as citocinas IL-12 e INF γ desempenham um papel crítico. As células apresentadoras de antígenos (APC) secretam IL-2 em grande quantidade após sua ativação por receptores de reconhecimento de padrão (RRP), como por exemplo, os receptores Toll-like. Além disso, a citocina IL-12 estimula células Natural killers (NK) a produzirem INF- γ (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003). Vários fatores de transcrição em coordenação levam a uma diferenciação de células Th₁ sendo o fator de transcrição T-box (T-bet) o mais importante. Além de ativar genes que promovem a diferenciação das células Th₁, ele também tem a capacidade de suprimir o desenvolvimento de linhagens opostas. O fator de transcrição T-bet aumenta significativamente a produção de INF γ e possui importante papel na supressão da resposta Th₂ e Th₁₇ (LUGO-VILLARINO et al., 2003).

As citocinas IL-4 e IL-2 possuem grande importância para a diferenciação de células Th₂ e um dos principais fatores de transcrição envolvido para esta diferenciação é o STAT6, que aumenta a expressão do regulador GATA3, considerado indispensável para a diferenciação das células Th₂ (ZHU et al., 2001).

As principais citocinas envolvidas na diferenciação das células Th₁₇ são a IL-23, IL-21, IL-6 e TGFβ, sendo o fator de transcrição RORγt o principal regulador desta linhagem celular (VOLPE et al., 2008). As citocinas que caracterizam as células Th₁₇ são IL-7A, IL-17F e IL-22. Estas citocinas induzem a expressão de quimiocinas e peptídeos antimicrobianos na superfície de células epiteliais e de fibroblastos, importante para as reações imunes mediadas por neutrófilos, que atuam, principalmente, no combate a germes extracelulares (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). No entanto, (LIN et al., 2009) demonstraram que na infecção pela bactéria intracelular *Francisella tularensis* a citocina IL-17A possui importante papel na imunidade mediada Th₁, ativando diretamente macrófagos e células dendríticas para produzir diversas citocinas, incluindo IL-12.

As células Treg são células CD4⁺ CD25⁺ e a principal citocina responsável pela diferenciação desta linhagem é a TGFβ. O principal marcador para células Treg é a expressão do fator de transcrição Forkhead box P3 (Foxp3) (CHEN et al., 2003). Essas células, que produzem principalmente IL-10, são importantes na supressão da inflamação e em processos autoimunes (APETOH et al., 2010).

Os queratinócitos possuem um importante papel como mediadores da resposta imune inata (NESTLE et al., 2009). Estas células possuem receptores de reconhecimento de padrão de patógenos (RRP), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997). Os mais estudados destes receptores são os receptores Toll-like, e a ativação destes receptores leva a uma resposta predominantemente Th₁ (MILLER; MODLIN, 2007). Os receptores Toll-like possuem grande importância para a regulação entre a imunidade inata e adaptativa pelas células epiteliais e estão presentes em vários tipos de células como no trato respiratório, trato gastrointestinal, pele e mucosa geniturinária (SATO et al., 2009). Receptores Toll-like podem ter sua função inibida diretamente pelo HPV (DAUD et al., 2011).

Já foram descritos dez tipos de receptores Toll-like e muitos tem se mostrado importantes para detecção viral. Os Toll-like 3, Toll-like 7, Toll-like 8 e Toll-like 9 são importantes para o reconhecimento de ácidos nucléicos virais pois se localizam na região intracelular. Já os receptores Toll-like 2 e Toll-like 4 são encontrados na

superfície celular e suas implicações para o hospedeiro ainda são incertas (BARTON, 2007).

2.2 A RESPOSTA IMUNE AO HPV

Das infecções genitais por HPV, cerca de 80 a 90 % se curam espontaneamente (MOSCICKI et al., 2006). As infecções persistentes podem levar ao aparecimento de lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (LIEAG) e a um aumento do risco de desenvolvimento de câncer do colo uterino (ZUR HAUSEN, 2009).

Alguns estudos indicam que a regressão de lesões associadas à infecção por HPV estão relacionadas a uma resposta imune celular, geralmente acompanhada por maior expressão de citocinas relacionadas à resposta imune Th₁ (STANLEY, 2006; SCOTT et al., 2013; LAZARENKO et al., 2014). Já a ativação de uma resposta imune predominantemente Th₂ está relacionada à progressão para lesões intraepiteliais de alto grau e câncer cervical (DE JONG et al., 2004; BAIS et al., 2007; TORRES-POVEDA et al., 2016).

Outro fator que indica que a imunidade celular representa grande importância para o clareamento de infecções pelo HPV é o fato que mulheres co-infectadas pelo HIV apresentam maior risco de infecção persistente pelo HPV e conseqüentemente progressão das lesões cervicais (KRIEK et al., 2016).

2.3 O CICLO DE VIDA DO HPV

Os HPVs são agentes infecciosos bem sucedidos na capacidade de induzir infecções crônicas sem que se tenham manifestações sistêmicas. Para isso eles possuem mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, a começar pelo próprio ciclo de replicação do vírus (DOORBAR, 2005; ISAACSON WECHSLER et al., 2012). A entrada do HPV no epitélio ocorre através de micro abrasões, que

permitem que o vírus infecte as células basais primitivas, assim como o processo de cicatrização dos queratinócitos feridos promove a ativação da divisão celular e permite a entrada do genoma viral no núcleo da célula hospedeira (STANLEY, 2009; SCHILLER; DAY; KINES, 2010; STANLEY; STERLING, 2014). No entanto, a montagem viral e a maior expressão de genes virais ocorrem nos queratinócitos maduros (CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010), que são células descamativas destinadas a morrer, portanto, longe de locais de maior atividade imunológica. Desta maneira o HPV não produz viremia, ficando pouco exposto ao sistema imune e permanecendo oculto às defesas do hospedeiro por longos períodos (STANLEY; STERLING, 2014; SCHIFFMAN et al., 2016).

A infecção pelo HPV é adaptada ao programa de diferenciação dos queratinócitos, o que leva a dificuldades para o reconhecimento imunológico. O ciclo infeccioso completo do HPV dura em torno de três semanas, que é o tempo necessário que o queratinócito da camada basal leva para diferenciar-se completamente e alcançar as camadas mais superficiais do epitélio para descamar-se. Portanto, não existe citólise ou morte citopática ocasionadas pela replicação e montagem viral, pois estes eventos ocorrem no queratinócito completamente diferenciado, que são células descamativas (STANLEY, 2012; STANLEY; STERLING, 2014).

Além do mais, a infecção viral ocorre através de micro abrasões da mucosa, não ultrapassando a camada basal, ficando assim longe dos vasos capilares. Desta maneira a chegada do vírus aos nódulos linfáticos fica dificultada, não dando início à resposta imune adaptativa (STANLEY, 2009).

2.4 RESPOSTA IMUNE INATA AO HPV

A resposta imune se inicia no próprio epitélio, através dos queratinócitos, que são considerados como células sentinelas do sistema imune inato (NESTLE et al., 2009).

Os queratinócitos do trato genital inferior feminino expressam receptores capazes de reconhecer padrões moleculares comuns a patógenos, chamados receptores de reconhecimento de padrão de patógenos (RRP) (MEDZHITOV, 2007). O mais importante grupo destes receptores são os receptores Toll-like (TLR), localizados na superfície celular (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6) ou na membrana endossômica (TLR-3, TLR-9) (NASU; NARAHARA, 2010). Após sua ativação, este receptor inicia a cascata de sinalização que conecta a resposta imune inata à adaptativa (SATO et al., 2009), promovendo a produção de citocinas INF tipo 1 e uma resposta predominantemente Th1, criando um micro-ambiente pró-inflamatório (MILLER; MODLIN, 2007; KAWAI; AKIRA, 2011).

Por se tratar de uma infecção exclusivamente intraepitelial, é necessário que haja a captura, processamento e apresentação de antígenos virais por células apresentadoras de antígenos (APCs), para que se ative a resposta imune mediada por células T. E, no epitélio pavimentoso, a APC responsável por esta função é a célula de Langherhans (LC) (STANLEY; STERLING, 2014). No entanto, as LC não são capazes de serem ativadas pela entrada do capsídio do HPV (FAUSCH et al., 2002). Já as células dendríticas(DC) do estroma ou da derme são ativadas pela captação de partículas virais do HPV, iniciando a resposta específica por células T (DA SILVA et al., 2007). Por tanto, para que se tenha uma resposta imune celular efetiva, é necessária uma comunicação entre as LC e as DC (AMADOR-MOLINA et al., 2013).

Em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) relacionadas à infecção pelo HPV-16 o número de LC está significativamente reduzido, o que pode estar relacionado à mecanismos virais de evasão da resposta imune inata (MATTHEWS et al., 2003; LEONG et al., 2010).

2.5 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA AO HPV

Após o estímulo das células do sistema imune inato ocorre a formação de uma resposta imune adaptativa. A ativação das células T helper (Th) CD4+ é essencial para que ocorra uma resposta imune celular e humoral adequada

(LUCKHEERAM et al., 2012). O microambiente local de citocinas pode influenciar diretamente no direcionamento por parte das células T CD4 para o padrão de resposta Th₁ ou Th₂. As células Th₁ promovem uma resposta imune predominantemente celular, enquanto as células Th₂ promovem uma resposta predominantemente humoral (EINSTEIN et al., 2009). Sabemos que uma resposta celular adequada, envolvendo resposta antígeno específica às proteínas de replicação viral E2, E6 e E7, é essencial para que haja o clareamento da infecção pelo HPV (WOO et al., 2010).

2.6 RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO HPV

O papel da resposta imune humoral contra o HPV ainda deve ser mais bem estudado, porém uma forte resposta humoral induzida é capaz de gerar proteção contra a infecção (SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

Enquanto a resposta imune celular é antígeno específica para as proteínas precoces do HPV (*early proteins*), a resposta imune humoral que segue esta resposta celular leva a uma soroconversão e produção de anticorpos específicos contra a proteína de capsídeo viral L1, não sendo capaz de eliminar a infecção intracelular. Devido aos mecanismos de evasão da resposta imune pelo HPV, a soroconversão demora a ocorrer, levando em torno de nove meses após a primeira detecção do vírus (STANLEY; STERLING, 2014). E quando esta resposta ocorre, ela é geralmente fraca, sendo que muitas mulheres não apresentam anticorpos após uma infecção natural pelo HPV (STANLEY, 2012).

2.7 INFECÇÃO PELO HPV DE ALTO RISCO

Estudos indicam que o HPV 16 é mais eficaz em provocar infecções persistentes, por isso, é mais prevalente em casos de câncer de colo uterino (SCHIFFMAN et al., 2005).

O HPV é um vírus de DNA que possui um genoma circular de aproximadamente 8000 pb, que contém uma região inicial (early region), que codifica as proteínas de replicação viral E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e uma região tardia (late region), que codifica as proteínas de capsídio viral L1 e L2 (DOORBAR, 2007). As proteínas de replicação viral E6 e E7 dos AR-HPVs possuem importante função para a entrada no ciclo celular assim como no estímulo à proliferação celular nas camadas basais e parabasais da mucosa (STANLEY, 2009; ISAACSON WECHSLER et al., 2012).

Um dos principais mecanismos de evasão da resposta imune é a capacidade do HPV, principalmente os AR-HPVs, de comprometer a função dos queratinócitos como células sentinelas do sistema imune inato (NESTLE et al., 2009). A infecção pelo HPV de alto risco regula negativamente a expressão de genes para produção de INF α e as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 afetam diretamente os componentes da via de sinalização de interferons (ARANY; GOEL; TYRING, 1995), sendo esta resposta essencial para a ativação da resposta imune inata e adaptativa contra infecções virais (DIAMOND; FARZAN, 2013). Os HPVs 16 e 18 são capazes de reduzir os mecanismos relacionados à imunidade celular nos queratinócitos, inibindo a via de sinalização por receptores de reconhecimento de padrão de patógenos, interrompendo as vias ativadas por receptores interferons (KARIM et al., 2011; TUMMERS; BURG, 2015). Além disso, as proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco possuem um papel fundamental para desregular o sistema imune inato, interferindo na expressão de receptores Toll-Like (KAWAI; AKIRA, 2009; DAUD et al., 2011).

2.8 MICROBIOMA E A INFECÇÃO PELO HPV

Novos fatores que influenciam na infecção pelo HPV, como o papel do ambiente da mucosa na modulação da resposta imune à infecção estão sendo estudados (SCHIFFMAN et al., 2016). As secreções, os hormônios e a microbiota são diferentes nas diversas mucosas do organismo, o que pode influenciar na persistência ou eliminação de uma infecção. As bactérias comensais da vagina, chamadas de microbioma vaginal (MV), podem interferir na resposta imune inata e

adaptativa. Desta maneira, o risco da persistência por uma infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau podem estar associados às alterações do MV (BROTMAN et al., 2014).

Existem evidências que sugerem que o tipo de MV desempenha um importante papel na persistência da infecção pelo HPV e conseqüentemente no desenvolvimento de LIEAG e de lesões invasivas (KYRGIU; MITRA; MOSCICKI, 2017). Alterações do padrão normal de MV (disbioses) estão significativamente relacionadas a lesões cervicais mais graves (MITRA et al., 2015).

Existem diferenças no perfil de citocinas no colo uterino de acordo com o MV encontrado e a presença de algumas bactérias como a *Fusobacterium spp.* pode contribuir para uma mudança do padrão de resposta imune Th₁ para o padrão Th₂ e, desta maneira, tornando a resposta imune ao HPV menos eficaz (AUDIRAC-CHALIFOUR et al., 2016).

Por outro lado, um MV com predominância de *Lactobacillus spp.* pode ter um efeito protetor. Além de inibir o crescimento de floras patogênicas, estas bactérias produzem menos aminas e nitrosaminas do que floras disbióticas (NELSON et al., 2015), que são substâncias diretamente carcinogênicas (PAVIĆ, 1984). Mas algumas espécies de *Lactobacillus*, como o *L.inners*, também podem estar associadas ao desenvolvimento de lesões. Elas podem levar a uma depleção de glutathiona reduzida, resultando em níveis mais elevados de estresse oxidativo, que pode gerar mais dano de DNA e assim influenciar na história natural do HPV e sua oncogenicidade (PIYATHILAKE et al., 2016).

2.9 OUTROS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A RESPOSTA IMUNE AO HPV

Existem outros fatores que podem interferir na resposta imune local e assim na persistência de uma infecção HPV. O tabagismo, por exemplo, é um fator que pode influenciar diretamente na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (BAUER et al., 2016). Mulheres tabagistas tem probabilidade de regressão de

LIEBG significativamente menor que não fumantes e um risco maior que duas vezes de uma infecção persistente pelo HPV (MATSUMOTO et al., 2010). A exposição ao tabaco pode aumentar a expressão das oncoproteínas E6 e E7 dos AR-HPVs, além de aumentar os danos de DNA e mutações celulares, desta maneira, influenciando diretamente na oncogenicidade do HPV (WEI et al., 2014).

O uso de anticoncepcionais hormonais tem sido associado ao aumento do risco de câncer cervical (SMITH et al., 2003; INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al., 2007). Um mecanismo possível para este aumento de risco seria as alterações que estes hormônios promovem no muco cervical, tornando-o escasso, espesso e altamente viscoso, o que poderia modular e prolongar os efeitos de agentes carcinogênicos (GUVEN et al., 2007). Outro estudo mostrou que o uso de contraceptivos orais tem um importante impacto na expressão de genes em pacientes com câncer de colo uterino, desta maneira, podendo estar relacionado à patogênese do câncer de colo uterino (GAO et al., 2014).

A produção de hormônios esteroides também pode modular o sistema imune inato e adaptativo no trato genital das mulheres, e desta maneira, a imunidade pode variar de acordo com a fase do ciclo menstrual. Na fase secretória a imunidade está reduzida para aumentar a chance de sucesso para fertilização e gravidez, porém esta imunodepleção pode facilitar a entrada de patógenos no trato genital feminino. (WIRA; RODRIGUEZ-GARCIA; PATEL, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Comparar a concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e INF- γ entre amostras de biópsias de colo uterino com laudo anatomopatológico de LIEBG, LIEAG e amostras de biópsias que não revelaram lesão intraepitelial (ALIE).

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Comparar as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e INF- γ entre as amostras de biópsias cervicais com laudo anatomopatológico de LIEBG e LIEAG e ALIE, de acordo com o resultado da reação em cadeia da polimerase para o HPV (PCR-HPV positivo e PCR-HPV negativo).
- Avaliar a distribuição do nível das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e INF- γ em cada grupo anatomopatológico (LIEBG, LIEAG e ALIE) e avaliar as diferenças entre as concentrações destas citocinas em cada grupo.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo analítico observacional transversal.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) e enquadrado na categoria APROVADO, de acordo com o processo (parecer nº: 1.071.278 - ANEXO A).

O estudo foi desenvolvido no Setor de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (SEMIGO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil, entre 2015 e 2018. Após o recrutamento das participantes, todos os dados foram coletados no mesmo dia, não fazendo parte do projeto o acompanhamento das mulheres incluídas. Esta pesquisa não interferiu na conduta clínica a ser adotada para as participantes do estudo.

Todas as voluntárias incluídas neste estudo foram informadas, de forma clara e objetiva, sobre o propósito do estudo e o protocolo de pesquisa a ser executado, com adesão espontânea ao projeto sendo obtida por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B) e estavam cientes que o material biológico armazenado poderá ser utilizado em pesquisas futuras por meio da assinatura do termo de consentimento de biorrepositório (ANEXO C).

4.3 PARTICIPANTES

As participantes deste estudo foram selecionadas de forma consecutiva, não aleatória, do Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia (AMIG) do HCFMRP-USP, que preencheram os seguintes critérios:

- Idade entre 18 e 65 anos.
- Colposcopia com achados colposcópicos anormais.
- Avaliação anatomopatológica da biópsia cervical com resultado de LIEAG, LIEBG ou amostras que não revelaram lesão intraepitelial. (DARRAGH et al., 2012)

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Gestantes
- Sorologia reagente para HIV
- Presença de outra doença imunossupressora
- Uso de medicação imunossupressora
- Uso de cremes vaginais nos últimos 7 dias anteriores ao exame
- Atividade sexual há menos de 48 horas do exame
- Avaliação anatomopatológica da biópsia cervical com resultado de neoplasia invasiva
- Diagnóstico de vulvovaginite pela clínica e bacterioscopia

4.5 VARIÁVEIS

- Dados pessoais da paciente: Idade, cor, escolaridade, tabagismo.

- Antecedentes ginecológicos e obstétricos: Paridade, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais durante a vida e durante o último ano, método anticoncepcional utilizado.
- Resultados de exames: Colposcopia, PCR-HPV.

Para a coleta dos dados clínicos e epidemiológicos, as informações pertinentes às variáveis foram obtidas através do preenchimento do questionário padronizado do SEMIGO (ANEXO D) e de informações contidas no prontuário eletrônico.

4.6 AVALIAÇÃO COLPOSCÓPICA

Todas as pacientes incluídas no estudo realizaram colposcopia por indicação clínica: presença de atipias citológicas de acordo com a classificação do Sistema Bethesda, 2001 (LIEBG, LIEAG, ASC-US, ASC-H, AGC) ou por seguimento pós-tratamento excisional de lesão de alto grau com cirurgia de alta frequência (CAF) (SOLOMON et al., 2002).

Conforme protocolo seguido pelo SEMIGO, as pacientes foram submetidas à colposcopia, utilizando colposcópio da marca DF Vasconcelos, modelo CPM7, com aumento de 6, 10, 16, 24 e 40 vezes. Inicialmente, foi realizada a inspeção direta da vulva, vagina e colo com a luz branca. Foi retirado, quando necessário, o excesso de conteúdo vaginal com aplicação de soro fisiológico a 0,9% e visualização sob luz branca e filtro verde para evidenciar a angioarquitetura cervical (Teste de Kraatz). Em seguida, foi aplicado ácido acético a 3% para a identificação da junção escamocolunar (JEC) e da zona de transformação (ZT). Os achados colposcópicos foram descritos seguindo a terminologia colposcópica definida pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (IFCPC) de 2011 (BORNSTEIN et al., 2012).

4.7 COLETA DAS AMOSTRAS

Todas pacientes que apresentaram achados colposcópicos anormais foram submetidas à biópsia. As biópsias foram realizadas utilizando a pinça de Gaylor-Medina de 3 mm, na zona de transformação anormal de colo uterino de pacientes que apresentaram alterações colposcópicas maiores ou menores, sendo coletadas duas amostras: uma para avaliação diagnóstica anatomopatológica e outra para análise deste estudo. As amostras encaminhadas para anatomopatológico foram classificadas em Ausência de Lesão Intraepitelial (ALIE), LIEBG (NIC I), LIEAG (NIC II e NIC III) ou carcinoma invasor (DARRAGH et al., 2012). As amostras teciduais coletadas para análise do estudo foram armazenadas em um microtubo de polipropileno tipo Eppendorf e após identificação adequada, as amostras ficaram estocadas em freezer a -80°C , sem adição de solução fisiológica ou formol.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

O painel de citocinas para realização deste estudo foi escolhido de acordo com sua importância para a diferenciação de cada linhagem celular ou por representarem importante papel para cada padrão de resposta imune. Para resposta Th_1 foram escolhidas IL-12 e $\text{INF-}\gamma$, Th_2 (IL-2 e IL-4) e Treg (IL-10) e Th_{17} (IL-23 e IL-17A) (ZHU et al., 2001; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003; OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008; ZHU; PAUL, 2008; APETOH et al., 2010).

Foi realizada a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e $\text{INF-}\gamma$, através do método Elisa Luminex, de 141 amostras de biópsia de colo uterino.

As amostras foram processadas utilizando-se um micromorcelador para homogeneização e diluição, ficando padronizado a diluição do fragmento morcelado em 1 mL de solução tampão e realizado centrifugação do material para remoção de debris.

Para a realização do ensaio multiplex, foram utilizados kits da Millipore® (Milliplex® HTH17MAG-14K). O filtro da placa foi pré-umedecido com 100 μl do

Tampão do Ensaio Millipore. 50 µl das beads foram adicionados e submetidos ao vácuo. Em seguida, foram feitas duas lavagens de 100 µl cada com o Tampão de Lavagem Millipore. 50 µl dos padrões foram adicionados e incubados por 30 min em temperatura ambiente (T/A) em agitação. As placas foram então lavadas 3 vezes e foram adicionados os anticorpos de detecção (25 µl/poço). A placa foi então coberta e foi feita a incubação de 30 min T/A em agitação. Novamente foram feitas 3 lavagens e adicionada a estreptavidina e mais uma incubação de 10 min T/A em agitação. Mais 3 lavagens foram realizadas e as beads foram ressuspensas em 125 µl do Tampão do Ensaio Millipore. Por fim os dados foram adquiridos e analisados em uma plataforma Luminex (Bioplex Magpix) e os resultados foram expressos em pg/ml.

Para verificação da homogeneidade das amostras, os valores quantificados em pg/ml foram divididos pela concentração de proteínas total em cada amostra, com resultados expressos em pg/ml de citocina / mg de proteína total (MARKS et al., 2012).

4.9 AVALIAÇÃO QUALITATIVA PARA PCR-HPV

Para extração do DNA procedeu-se com centrifugação a 6000 x G por 1 minuto para que as células precipitassem, retirando-se cuidadosamente a escova endocervical de dentro do microtubo. O DNA das amostras foi obtido por extração com o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, EUA), conforme as orientações do fabricante.

Para detecção da presença do material genético do HPV, foi utilizada a técnica convencional da PCR com utilização dos primers consensuais GP5+ e GP6+, que amplificam um fragmento de 150 pares de bases (bp), conforme descrito por de Roda Husman et al. (DE RODA HUSMAN et al., 1995). Para a tipificação do HPV, realizou-se a técnica de PCR multiplex, na qual são utilizados simultaneamente primers específicos para os HPV 6, 11, 16, 18, 31 e 33 (BERNARD et al., 1994; MANT et al., 1997). Os iniciadores específicos amplificam fragmentos de

tamanhos e regiões diferentes do genoma viral (Quadro 1). Todos os primers foram sintetizados pela Invitrogen Inc. (EUA).

Como controle interno da amplificação e para avaliar a qualidade do DNA, a amplificação do HPV foi realizada conjuntamente com iniciadores do gene humano β -globina, quais sejam: S-GH20, pCO3 e pCO4 (MANT et al., 1997). A fim de evitar resultados falsos positivos, um controle negativo contendo apenas os reagentes da reação, sem DNA, foi incluído em cada amplificação. Os controles positivos foram amostras HPV-DNA positivas oriundas de coletas cervicais prévias.

Quadro 1 - Sequências dos iniciadores utilizados para detecção e tipificação do HPV através da técnica de PCR.

Sistema	ORF [#]	Tamanho [§]	Sequências Iniciadoras
HPV GP5+ ⁽¹⁾	L1	150	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'
HPV GP6+ ⁽¹⁾	L1		5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'
vdB6 U ⁽²⁾	L2	280	5'-TAG TGG GCC TAT GGC TCG TC-3'
vdB6 D ⁽²⁾	L2		5'-TCC ATT AGC CTC CAC GGG TG-3'
vdB11 U ⁽²⁾	L1	360	5'-GGA ATA CAT GCG CCA TGT GC-3'
vdB11 D ⁽²⁾	L1		5'-GGA GCA GAC GTC CGT CCT CG-3'
vdB16 U ⁽²⁾	L1	152	5'-TGC TAG TGC TTA TGC AGC AA-3'
vdB16 D ⁽²⁾	L1		5'-ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC-3'
vdB18 U ⁽²⁾	L1	216	5'-AAG GAT GCT GCA CCG GCT GA-3'
vdB18 D ⁽²⁾	L1		5'-CAC GCA CAC GCT TGG CAG GT-3'
vdB31 U ⁽²⁾	E2	514	5'-ATG GTG ATG TAC ACA ACA CC-3'
vdB31 D ⁽²⁾	E2		5'-GTA GTT GCA GGA CAA CTG AC-3'
vdB33 U ⁽²⁾	E1	455	5'-ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC-3'
vdB33 D ⁽²⁾	E2		5'-GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG-3'
S-GH20 ⁽²⁾	NA	286	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'
pCO3 ⁽³⁾	NA		5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'
pCO4 ⁽³⁾	NA		5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

[#]Open Reading Frame ou Fase de leitura aberta; [§]Em pares de bases; NA: Não se aplica. 1. de Roda Husman et al., 1995b; 2. Mant et al., 1997; 3. Bernard et al., 1994.

A amplificação foi realizada utilizando-se 1 μ L do DNA previamente extraído em microtubos de 200 μ L devidamente numerados. As amplificações foram efetuadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems; Foster City, Califórnia, EUA). As condições de amplificação e concentrações finais para cada par de iniciadores estão descritos nos quadros 2 e 3.

Para as reações, foi utilizado o tampão que acompanha a Taq Polimerase (Invitrogen, EUA), composto de 200 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM de KCl.

Quadro 2 - Condições da reação utilizada para detecção do HPV, utilizando os iniciadores consensuais GP5+/6+.

Reagentes	Concentração		Ciclagem
	Inicial	Final	
H₂O	Ultra pura	q.s.p 25 µL	94°C – 1'
Tampão	10 X	1,4 X	94°C – 30''
MgCl₂	50 mM	3,0 mM	45°C – 45''
dNTP	20 mM ¹	200 µM	72°C – 1'
Iniciador 1	10 µM	0,4 mM	37x 72°C – 10'
Iniciador 2	10 µM	0,3 mM	
Enzima (Taq)	5 U/µL	1,25 U	
Volume do Mix	-	24,00 µL	
DNA	0,5 ng/µL	1,0 ng	
Volume Total	-	25 µL	

Quadro 3 - Condições da reação utilizada para tipificação do HPV.

Reagentes	Concentração		Ciclagem
	Inicial	Final	
H₂O	Ultra pura	q.s.p 25 µL	94°C – 7'
Tampão	10 X	1,4 X	94°C – 45''
MgCl₂	50 mM	2,5 mM	57°C – 30''
dNTP	20 mM	200 µM	72°C – 1'
Iniciador 1S	10 µM	0,4 mM	10x 72°C – 10'
Iniciador 1^a	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 2S	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 2^a	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 3S	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 3^a	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 4S	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 4^a	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 5S	10 µM	0,4 mM	
Iniciador 5^a	10 µM	0,4 mM	
Enzima (Taq)	5 U/µL	1,25 U	
Volume do Mix	-	24,00 µL	
DNA	0,5 ng/µL	1,0 ng	
Volume Total	-	25 µL	

Para análise dos produtos amplificados foi utilizado gel não desnaturante 10%, com tamanho de 10 cm, foi utilizado para diagnosticar e/ou confirmar a presença do HPV-DNA nas amostras. Para a preparação deste gel, foram utilizados os seguintes componentes:

- 9,8 ml de água deionizada;
- 6,7 ml de acrilamida + bis-acrilamida (29:1);
- 1,4 ml de glicerol;
- 2,0 ml de tampão TBE 10X;
- 15 μ L de TEMED;
- 300 μ L de solução saturada de potássio.

Em seguida à preparação da mistura, fazia-se a aplicação imediata do gel a um cassete de tamanho determinado previamente montado. Esse cassete era composto por duas placas de vidro colocadas sobre um suporte, separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos de aço. Logo após a aplicação do gel entre as placas, colocava-se um pente de teflon na borda superior para formar sulcos, nos quais eram aplicadas as amostras posteriormente. O tempo de polimerização era de aproximadamente 30 minutos.

Após a polimerização do gel, era feita a retirada do pente e montava-se o cassete em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE (o mesmo utilizado na preparação do gel diluído mais 10 vezes) em ambos os polos.

Para a eletroforese dos sistemas analisados, 5 μ L do produto amplificado eram misturados a 5 μ L do tampão da amostra. Após a mistura com o corante, as amostras e o controle negativo de cada reação eram aplicados diretamente nos géis. O equipamento era ligado a uma fonte de alta voltagem e submetido à voltagem constante de 220 V por 01 hora e 30 minutos.

Após o término da eletroforese, o gel era retirado da placa, colocado em 100 mL de solução fixadora com 1 mL de nitrato de prata a 20% e agitado por 5 minutos.

Depois de descartada a solução fixadora com a prata, o gel era lavado em água abundante. Após desprezar a água, colocava-se o gel em 100 mL de solução reveladora com 1 mL de formaldeído e mantinha-se em agitação até o aparecimento das bandas.

Após o aparecimento das bandas, o gel era imerso em 200 mL de solução fixadora, sem o nitrato de prata, para interromper o efeito do revelador. Após a leitura, os géis de poliacrilamida eram secos e arquivados. A secagem era realizada colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane embebidas em água sobre uma placa de vidro à temperatura ambiente por 24 horas.

A amostra foi considerada positiva para o HPV quando havia presença de banda de aproximadamente 150 bp nas reações com o par de primers GP5+/6+, indicando a presença de DNA viral de um dos genótipos testados (HPV 6, 11, 16, 18, 31 e 33). A ausência de bandas indicava que a amostra era negativa para o vírus.

4.10 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi definido de forma não probabilística. As amostras foram colhidas de pacientes submetidas à colposcopia que apresentaram achados colposcópicos anormais de forma consecutiva, não aleatória, no Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil, entre 09/06/2015 a 04/12/2018.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados em uma planilha eletrônica no Microsoft Excel® (Microsoft Corp, Redmond, WA, EUA) e as informações foram analisadas utilizando-

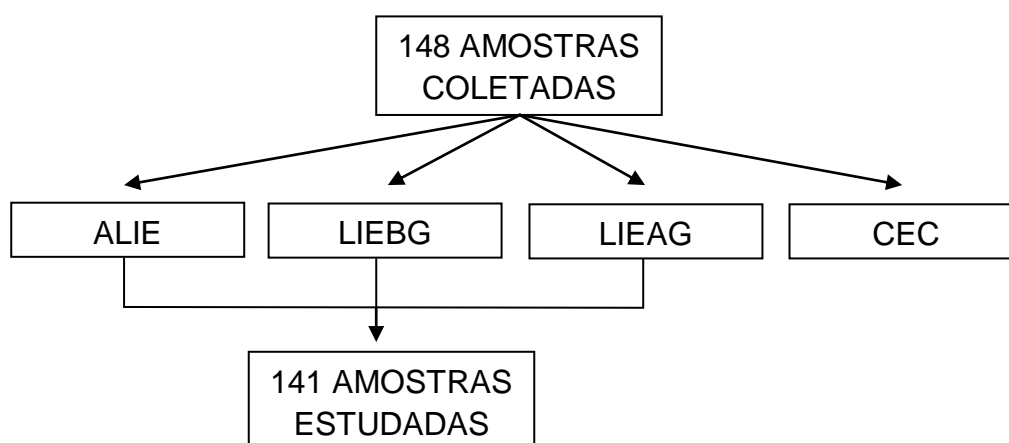
se o programa IBM® SPSS® statistics 23 (ver. 23; SPSS). As variáveis quantitativas foram testadas para verificar a distribuição normal, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se houve diferença dos níveis de citocinas entre os grupos (ALIE, LIEBG e LIEAG) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, aplicado para cada citocina, verificando se existiu diferença estatística entre os grupos e verificando-se diferença entre os grupos, foi realizado pós-teste de Dunn-Bonferroni para comparação entre pares. A associação entre o nível de citocinas e a presença de DNA-HPV foi avaliada através do teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos em pg/ml e em pg/ml/mg e realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão, expressos em mediana e valor mínimo e valor máximo. Para determinar se existem diferenças entre os níveis detectados de citocinas para cada um dos grupos de estudo foi utilizado o teste para amostras dependentes Two-Way ANOVA de Friedman e após o teste de Dunn-Bonferroni para comparação entre os pares de citocinas. Para avaliação da associação entre as variáveis categóricas e os grupos (ALIE, LIEBG, LIEAG) foi utilizado o teste estatístico χ^2 . Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) for menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Foram coletadas 148 amostras de biópsia de colo uterino de pacientes com achados colposcópicos anormais entre 09/06/2015 a 04/12/2018. Após avaliação anatomopatológica 29 tiveram resultado de ausência de lesão intraepitelial (ALIE), 22 tiveram resultado LIEBG, 90 LIEAG (NIC II e NIC III) e 7 casos com resultado de carcinoma espinocelular (CEC). Todos os casos de CEC foram excluídos. Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma demonstrando a coleta de amostras.



Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, CEC: Carcinoma espinocelular.

A partir do estudo anatomopatológico das amostras de biópsia cervical as pacientes foram divididas em três grupos:

GRUPO 1: Ausência de lesão intraepitelial (ALIE)

GRUPO 2: Lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG)

GRUPO 3: Lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG)

Conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das 141 amostras submetidas à análise histológica de acordo com o grupo. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.

LESÃO CERVICAL	N	%
Grupo 1: ALIE	29	20,6%
Grupo 2: LIEBG	22	15,6%
Grupo 3: LIEAG	90	63,8%
TOTAL	141	100%

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau.

A idade média das participantes do estudo foi 34,9 anos \pm 9,8 DP (desvio padrão), com idade mínima de 18 anos e idade máxima de 65 anos.

A idade média por grupo foi 31,1 anos (\pm 8,5 DP) para o grupo LIEBG, 36,1 anos (\pm 10,2 DP) para o grupo LIEAG e 33,9 anos (\pm 10,2 DP) para o grupo ALIE, não havendo diferença estatística da distribuição da idade entre os grupos ($p=0,089$).

5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Os parâmetros clínicos e epidemiológicos das 141 pacientes avaliadas em nosso estudo estão apresentados na tabela 2.

Observa-se que os grupos são homogêneos em relação à maioria das variáveis analisadas. Entretanto, a escolaridade e o número de partos apresentaram associação estatisticamente significativa entre os grupos estudados (χ^2 $p=0,029$ e $p=0,038$ respectivamente).

Tabela 2 - Distribuição das 141 mulheres com achados colposcópicos anormais submetidas à biópsia cervical de acordo com o diagnóstico histológico e os parâmetros clínicos epidemiológicos. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.

		N(%)			Total	P
		ALIE	LIEBG	LIEAG		
COR	Branca	22(81,5%)	14(63,6%)	61(67,8%)	97(69,8%)	0,546
	Preta	3(11,1%)	4(18,2%)	19(21,1%)	26(18,7%)	
	Parda	2(7,4%)	4(18,2%)	10(11,1%)	16(11,5%)	
	TOTAL	27(100%)	22(100%)	90(100%)	139(100%)	
ESCOLARIDADE	Analfabeta	0(0%)	0(0%)	4(5,3%)	4(3,7%)	0,029*
	Até 9 anos	6(37,5%)	4(25%)	38(50,7%)	48(44,9%)	
	9 a 12 anos	7(43,8%)	6(37,5%)	28(37,3%)	41(38,3%)	
	> 12 anos	3(18,7%)	6(37,5%)	5(6,7%)	14(13,1%)	
	TOTAL	16(100%)	16(100%)	75(100%)	107(100%)	
IDADE 1ª RELAÇÃO SEXUAL	<16	5(83,3%)	5(45,5%)	31(60,8%)	41(60,3%)	0,309
	≥16	1(16,7%)	6(54,5%)	20(39,2%)	27(39,7%)	
	TOTAL	6(100%)	11(100%)	51(100%)	68(100%)	
NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS	1 a 5	9(52,9%)	9(69,2%)	44(64,7%)	62(63,3%)	0,595
	>5	8(47,1%)	4(30,8%)	24(35,3%)	36(36,7%)	
	TOTAL	17(100%)	13(100%)	68(100%)	98(100%)	
NÚMERO DE PARCEIROS NO ÚLTIMO ANO	<3	18(100%)	14(93,3%)	70(95,9%)	102(96,2%)	0,584
	≥3	0(0%)	1(6,7%)	3(4,1%)	4(3,8%)	
	TOTAL	18(100%)	15(100%)	73(100%)	106(100%)	
NÚMERO DE PARTOS	Nulíparas	8(27,6%)	8(36,4%)	12(13,3%)	28(19,9%)	0,038*
	1-2	16(55,2%)	8(36,4%)	43(47,8%)	67(47,5%)	
	≥3	5(17,2%)	6(27,2%)	35(38,9%)	42(32,6%)	
	TOTAL	29(100%)	22(100%)	90(100%)	141(100%)	
TABAGISMO	NÃO	24(82,8%)	17(77,7%)	55(62,5%)	96(69,1%)	0,082
	SIM	5(17,2%)	5(22,7%)	33(37,5%)	43(30,9%)	
	TOTAL	29(100%)	22(100%)	88(100%)	139(100%)	
ANTICONCEPÇÃO	Não hormonal	12(42,9%)	10(45,5%)	40(44,9)	62(44,6%)	0,978
	Hormonal	16(57,1%)	12(54,5%)	49(55,1%)	77(55,4%)	
	TOTAL	28(100%)	22(100%)	89(100%)	139(100%)	

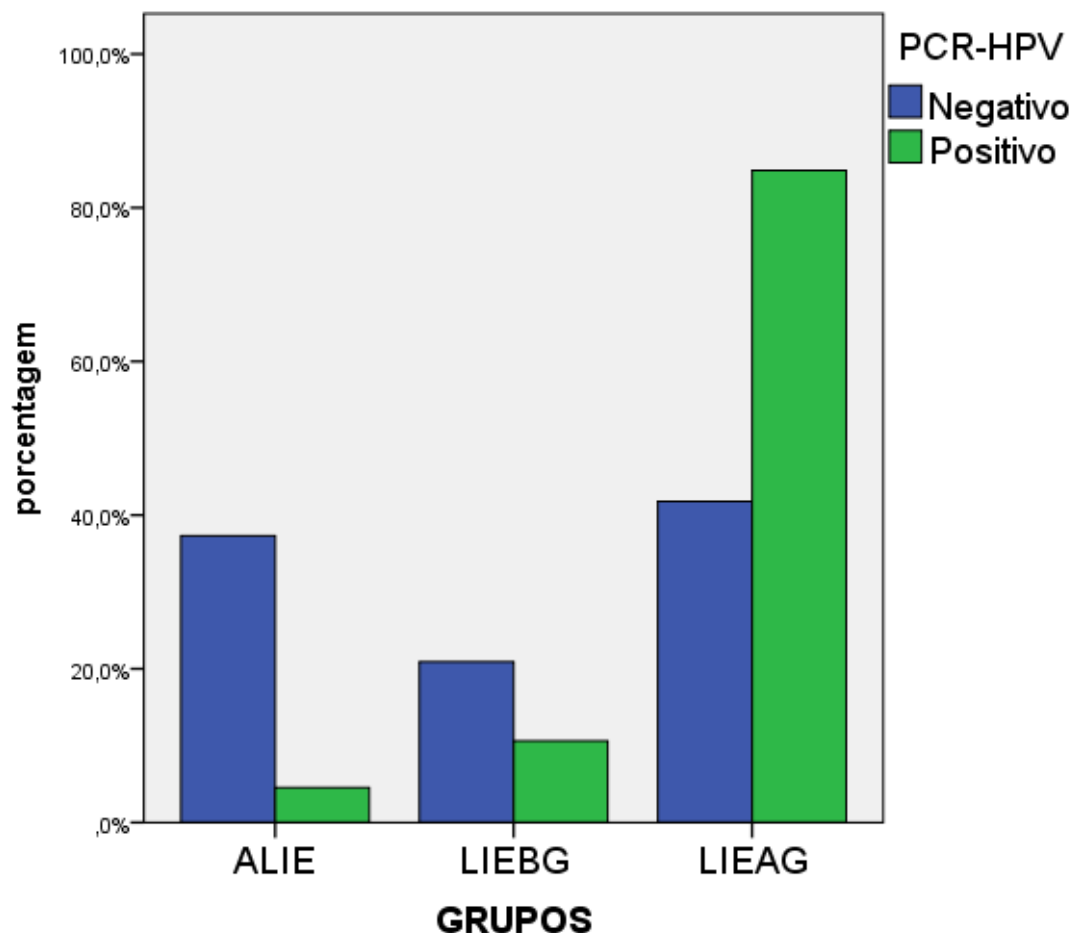
*P com significância estatística (teste $\chi^2 < 0,05$)

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau.

5.3 DETECÇÃO DO DNA HPV

Foi observada positividade no teste de PCR-HPV em 66,7% (56/84) das amostras do grupo 3 - LIEAG, 33,3% (7/21) das amostras do grupo 2 - LIEBG e 10,7% (3/28) das amostras do grupo 1- ALIE, havendo associação estatisticamente significativa entre a positividade do teste PCR-HPV e a gravidade do diagnóstico anatomopatológico (χ^2 , $p < 0,0001$). Estes resultados estão expostos na figura 2.

Figura 2 - Comparação da detecção do DNA HPV entre os grupos.

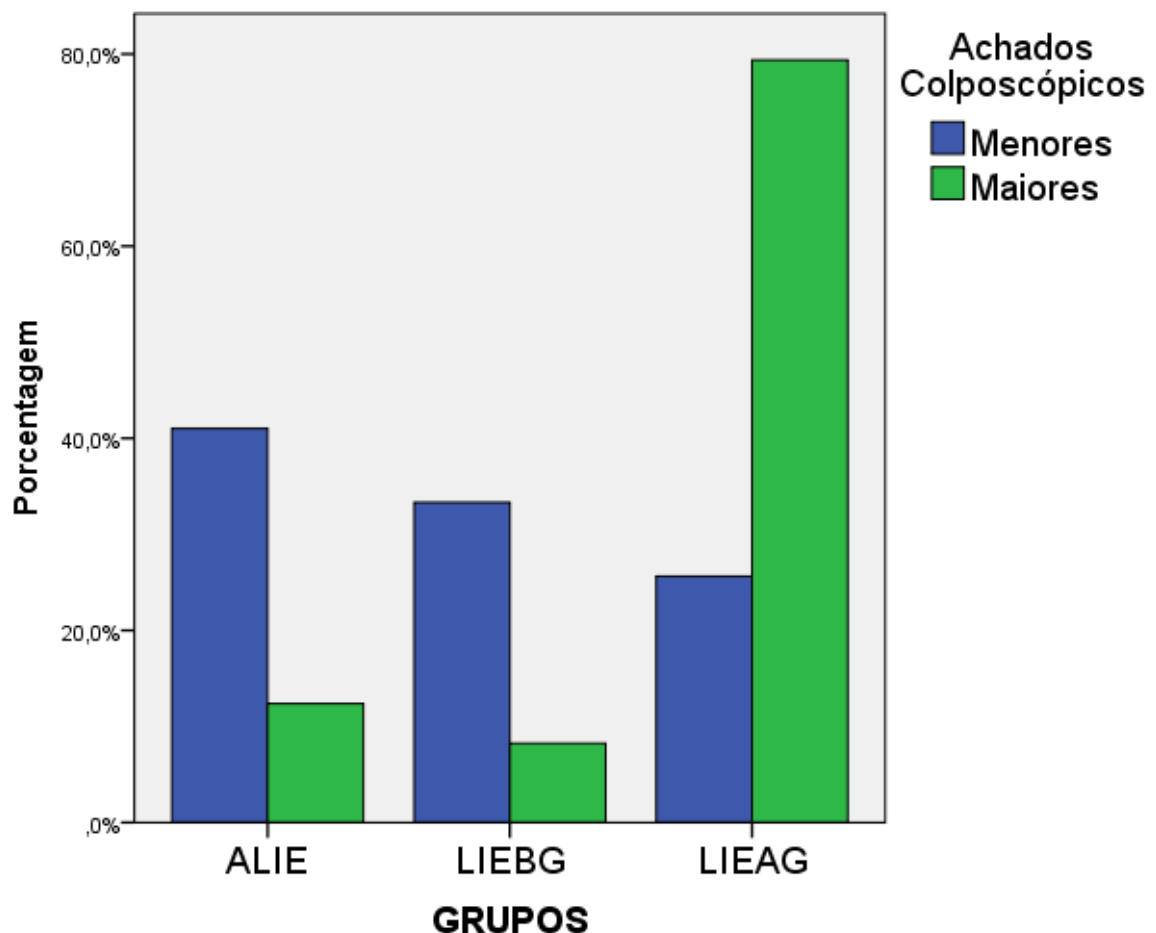


Fonte: Produção do próprio autor. PCR: Reação em cadeia da Polimerase, HPV: Papilomavírus Humano, ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau.

5.4 ACHADOS COLPOSCÓPICOS

Foram observados achados colposcópicos anormais maiores em 88,5% (77/87) das pacientes do grupo 3 - LIEAG, 42,9% (12/28) das pacientes do grupo 1 - ALIE e 38,1% (8/21) das pacientes do grupo 2 - LIEBG, havendo associação estatisticamente significativa entre os achados colposcópicos e os grupos anatomopatológicos (χ^2 , $p=0,0001$). Estes resultados estão expostos na figura 3.

Figura 3 - Comparação dos achados colposcópicos entre os grupos.



Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

5.5.1 TAXA DE DETECÇÃO DE CITOCINAS NAS AMOSTRAS

Das 141 amostras avaliadas, foi possível quantificar 131 (92,9%) das amostras para a citocina IL-2, 125 (88,6%) das amostras para IL-4, 132 (93,6%) das amostras para IL-10, 132 (93,6%) das amostras para IL-12, 132 (93,6%) das amostras para IL-17a, 130 (92,2%) das amostras para IL-23 e 133 (94,3%) das amostras para IFN- γ .

5.5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS E OS GRUPOS

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na concentração das citocinas IL-2 e IL-23 entre ALIE, LIEBG e LIEAG ($p=0,0001$, $p=0,003$ respectivamente). Estes dados estão expostos na figura 4.

As quantificações das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17a e INF- γ não apresentaram diferença com significância estatística entre os grupos de estudo ($p=0,158$, $p=0,072$, $p=0,065$, $0,327$ e $p=0,065$ respectivamente).

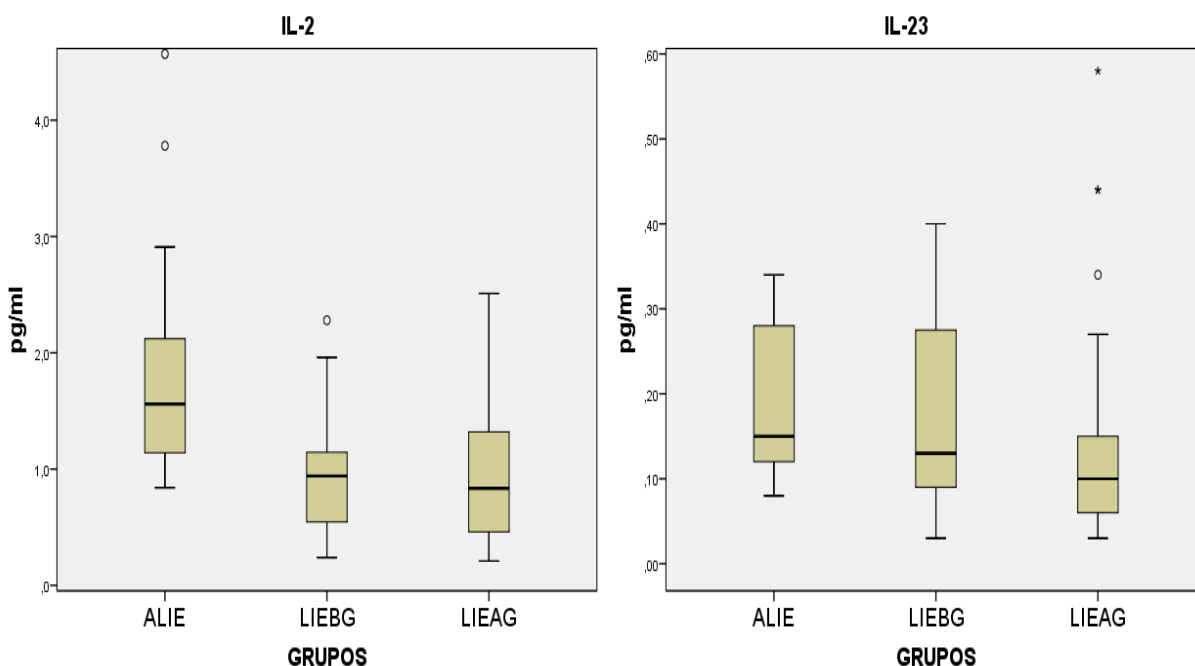
Tabela 3 – Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml) de acordo com os grupos. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.

CITOCINA	ALIE	LIEBG	LIEAG	N	Valor p
IL-2	1,56 (0,84-4,57)	0,94 (0,24-2,28)	0,93 (0,28-2,51)	131	0,0001*
IL-4	0,01 (0,01-0,05)	0,01 (0,001-0,03)	0,01 (0,01-0,44)	125	0,158
IL-10	1,23 (0,27-13,94)	2,10 (0,35-8,37)	1,18 (0,27-13,37)	132	0,072
IL-12	1,51 (1,09-4,61)	2,10 (0,06-7,61)	1,51 (0,62-8,75)	132	0,065
IL-17A	3,48 (2,19-80,63)	4,30 (2,66-16,10)	3,91 (1,83-39,78)	132	0,327
IL-23	0,15 (0,08-3,53)	0,13 (0,03-0,40)	0,12 (0,03-2,25)	130	0,003*
INF- γ	2,47(1,63-14,42)	3,45 (1,83-10,23)	2,69 (0,83-6,62)	133	0,065

*p com significância estatística (teste de Kruskal-Wallis < 0,05)

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina, INF: Interferon.

Figura 4 - Nível de IL-2 (pg/ml) e IL-23 (pg/ml) entre os grupos, dados mostrados na forma de Box-plots (mediana, 25^o - 75^o percentis).



Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina.

Para as citocinas que tiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ALIE, LIEBG e LIEAG (IL-2 e IL-23) foi realizado o pós-teste de Dunn-Bonferroni para a comparação entre pares.

Tabela 4 - Comparação entre pares para as citocinas IL-2 e IL-23, avaliação em pg/ml.

Comparação entre Pares	IL-2	IL-23
	Valor p	Valor p
LIEBG vs. LIEAG	1,0	0,446
LIEBG vs. ALIE	0,001*	0,659
LIEAG vs. ALIE	0,0001*	0,003*

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina.* p com significância estatística (pós-teste de Dunn-Bonferroni < 0,05).

Após a divisão da concentração de citocina pela quantificação de proteínas de cada amostra também foi observada diferença estatisticamente significativa para as citocinas IL-2 e IL-23 entre os grupos ALIE, LIEBG e LIEAG ($p=0,001$, $p=0,007$ respectivamente), figura 5, e ausência de diferença para as citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17a e INF- γ ($p=0,994$, $p=0,194$, $p=0,963$, $0,413$ e $p=0,563$ respectivamente). Tabela 5.

Tabela 5 - Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml/mg) de acordo com os grupos. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.

CITOCINA	ALIE	LIEBG	LIEAG	Valor p
IL-2	0,046 (0,014-0,21)	0,031 (0,007-0,112)	0,028 (0,007-0,089)	0,001*
IL-4	0,0003 (0,0001-0,001)	0,0003 (0,0002-0,001)	0,0003 (0,0001-0,014)	0,994
IL-10	0,038 (0,007-0,296)	0,079 (0,01-0,18)	0,041 (0,005-0,70)	0,194
IL-12	0,051 (0,027-0,17)	0,046 (0,002-0,24)	0,051 (0,015-0,35)	0,963
IL-17 ^a	0,112(0,053-1,36)	0,118 (0,049-0,48)	0,143 (0,028-1,62)	0,413
IL-23	0,005 (0,002-0,088)	0,005 (0,0009-0,027)	0,004 (0,0008-0,072)	0,007*
INF- γ	0,079(0,043-0,51)	0,097 (0,047-0,389)	0,082 (0,035-0,398)	0,563

*p com significância estatística (teste de Kruskal-Wallis < 0,05)

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina, INF: Interferon.

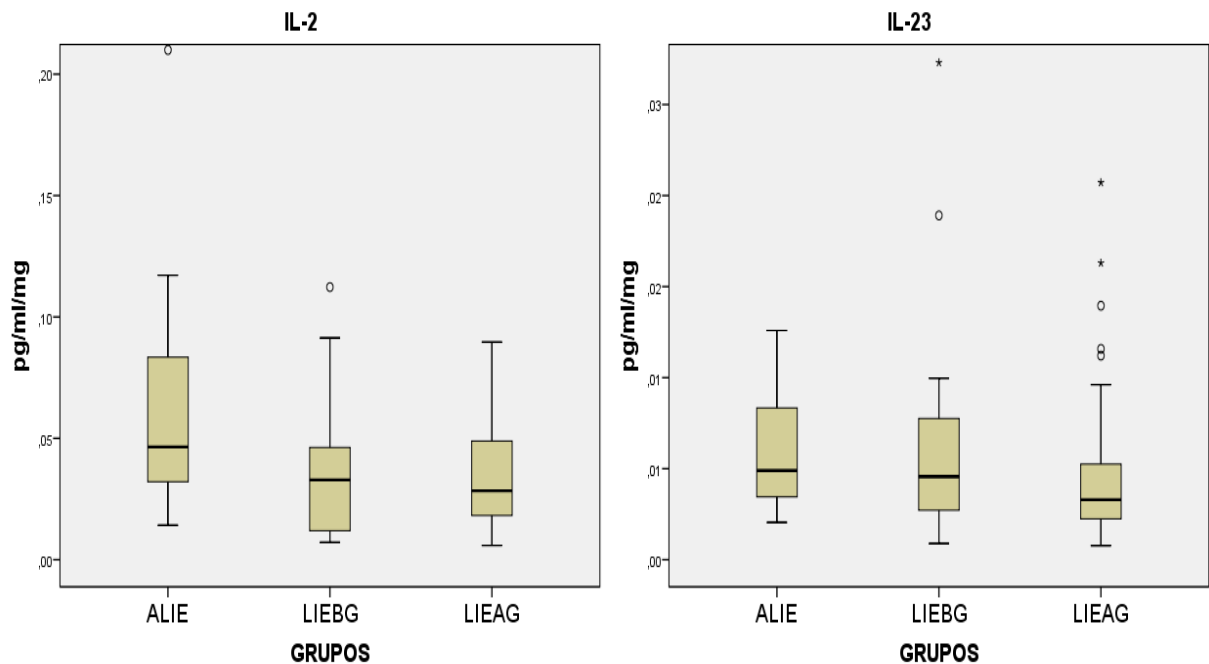
Para as citocinas que tiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (IL-2 e IL-23) foi realizado o pós-teste de Dunn-Bonferroni para a comparação entre pares.

Tabela 6 - Comparação entre pares para as citocinas IL-2 e IL-23, avaliação em pg/ml/mg

Comparação entre Pares	IL-2	IL-23
	Valor p	Valor p
LIEBG vs. LIEAG	1,0	0,679
LIEBG vs. ALIE	0,016*	0,592
LIEAG vs. ALIE	0,001*	0,006*

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina. * p com significância estatística (pós-teste de Dunn-Bonferroni < 0,05).

Figura 5 - Nível de IL-2 (pg/ml/mg) e IL-23 (pg/ml/mg) entre os grupos, dados mostrados na forma de Box-plots (mediana, 25^o - 75^o percentis).



Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina.

5.5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS E PCR-HPV

As concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e INF- γ não apresentaram diferença com significância estatística entre as pacientes com PCR-HPV positivo e pacientes com PCR-HPV negativo ($p=0,182$, $p=0,346$, $p=0,376$, $p=0,528$, $p=0,842$, $p=0,073$ e $p=0,612$ respectivamente).

Tabela 7 - Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml) de acordo com PCR-HPV. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.

CITOCINA	HPV-POSITIVO	HPV-NEGATIVO	N	Valor p
IL-2	0,94 (0,24-2,57)	1,12 (0,28-4,57)	123	0,182
IL-4	0,01 (0,001-0,05)	0,01 (0,01-0,44)	119	0,346
IL-10	1,23 (0,27-6,29)	1,23 (0,27-13,94)	124	0,376
IL-12	1,51 (0,62-7,61)	1,51 (0,06-8,75)	124	0,528
IL-17 ^a	3,74 (1,83-39,78)	4,04 (2,19-80,63)	124	0,842
IL-23	0,11 (0,03-3,53)	0,15 (0,03-2,25)	122	0,073
INF- γ	2,69 (1,54-14,42)	2,69 (0,83-13,83)	125	0,612

Fonte: Produção do próprio autor. PCR: Reação em cadeia da polimerase, HPV: Papiloma Vírus Humano, ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina, INF: Interferon.

Após a divisão da concentração de citocina pela quantificação de proteínas de cada amostra as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17^a, IL-23 e INF- γ também não apresentaram diferença com significância estatística entre as pacientes com PCR-HPV positivo e pacientes com PCR-HPV negativo ($p=0,632$, $p=0,566$, $p=0,542$, $p=0,376$, $p=0,559$, $p=0,154$ e $p=0,134$ respectivamente).

Tabela 8 - Mediana (valor mínimo e valor máximo) dos níveis de citocinas (pg/ml/mg) de acordo com o PCR-HPV. SEMIGO-HCFMRPUSP, 2015-2018.

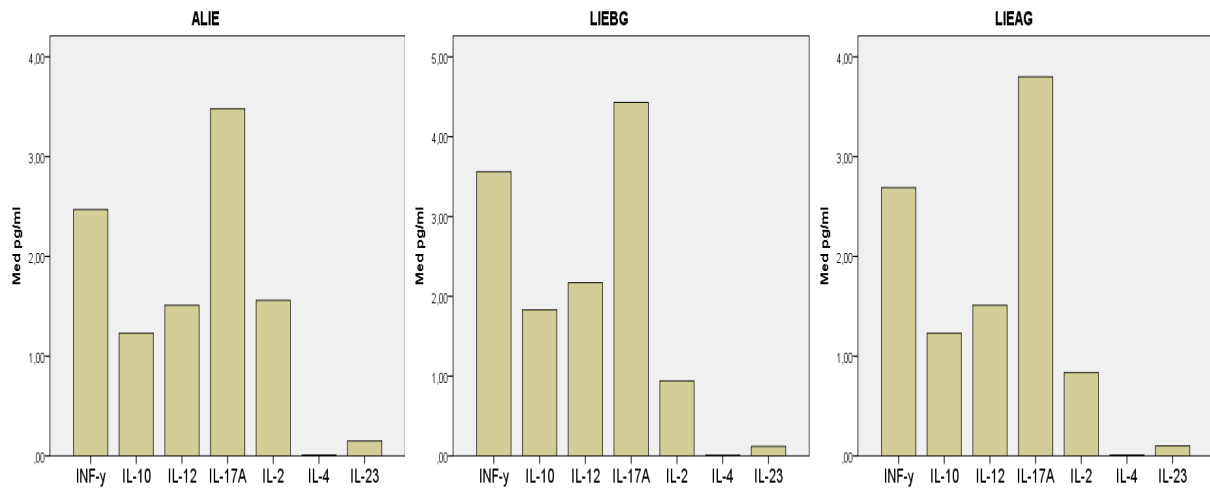
CITOCINA	HPV-POSITIVO	HPV-NEGATIVO	N	Valor p
IL-2	0,034 (0,007-0,09)	0,033 (0,007-0,21)	121	0,632
IL-4	0,0003 (0,0001-0,001)	0,0003 (0,0001-0,014)	115	0,566
IL-10	0,041 (0,005-0,224)	0,041 (0,007-0,7)	122	0,542
IL-12	0,052 (0,015-0,24)	0,046 (0,002-0,359)	122	0,376
IL-17A	0,127 (0,028-1,24)	0,12 (0,049-1,62)	122	0,559
IL-23	0,004 (0,0009-0,09)	0,004 (0,0009-0,072)	120	0,154
INF- γ	0,094 (0,036-0,365)	0,078 (0,036-0,512)	123	0,134

Fonte: Produção do próprio autor. PCR: Reação em cadeia da polimerase, HPV: Papiloma Vírus Humano, ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina, INF: Interferon.

5.5.4 DISTRIBUIÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS EM CADA GRUPO

As citocinas apresentaram níveis de detecção com diferença estatisticamente significativa nos três grupos de estudo, com $p < 0,0001$ para todos os grupos (figura 6).

Figura 6 – Mediana em pg/ml do nível das citocinas em cada grupo.



Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina.

A comparação entre os pares mostrou-se diferente entre cada grupo de estudo. (tabela 9)

Tabela 9 - Comparação entre pares de citocinas para cada grupo.

Comparação entre Pares	Valor p		
	ALIE	LIEBG	LIEAG
IL-4 vs. IL-23	1,000	1,000	,091
IL-4 vs. IL-10	,000	,012	,000
IL-4 vs. IL-12	,000	,000	,000
IL-4 vs. IL-2	,000	,000	,000
IL-4 vs. INF- γ	,000	,000	,000
IL-4 vs. IL-17A	,000	,000	,000
IL-23 vs. IL-10	,007	1,000	,001
IL-23 vs. IL-12	,002	,007	,000
IL-23 vs. IL-2	,002	,005	,000
IL-23 vs. INF- γ	,000	,000	,000
IL-23 vs. IL-17A	,000	,000	,000
IL-10 vs. IL-12	1,000	1,000	1,000
IL-10 vs. IL-2	1,000	1,000	,013
IL-10 vs. INF- γ	,050	,007	,000
IL-10 vs. IL-17A	,000	,000	,000
IL-12 vs. INF- γ	,131	1,000	1,000
IL-2 vs. INF- γ	,131	1,000	,000
IL-12 vs. IL-2	1,000	,021	,000
IL-12 vs. IL-17A	,001	1,000	,006
IL-2 vs. IL-17A	,001	,027	,000
INF- γ vs.IL-17A	1,000	1,000	,347

Negrito: pós-teste de Dunn-Bonferroni $p < 0,05$

Fonte: Produção do próprio autor. ALIE: Ausência de Lesão Intraepitelial, LIEBG: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, LIEAG: Lesão Intraepitelial de Alto grau, IL: Interleucina, INF: Interferon.

Para o grupo ALIE só não apresentaram diferença estatisticamente significativa as citocinas IL-4 com IL-23, IL-10 com IL-12, IL-10 com IL-2, IL-12 com INF-y, IL-2 com INF-y e INF-y com IL-17A. As demais comparações entre pares de citocinas apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Para o grupo LIEBG só não apresentaram diferença estatisticamente significativa as citocinas IL-4 com IL-23, IL-23 com IL-10, IL-10 com IL-12, IL-10 com IL-2, IL-12 com INF-y, IL-2 com INF-y, IL-12 com IL17 e INF-y com IL-17A. As demais comparações entre pares de citocinas apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Para o grupo LIEAG só não apresentaram diferença estatisticamente significativa as citocinas IL-4 com IL-23, IL-10 com IL-12, IL-12 com INF-y e INF-y com IL-17A. As demais comparações entre pares de citocinas apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

6 DISCUSSÃO

Apesar de todos os esforços, o câncer de colo uterino mantém elevada prevalência, sendo o quarto câncer mais frequente entre as mulheres. Além disso, é a quarta causa de morte por câncer no mundo e a segunda causa de óbito de mulheres entre 15 e 44 anos (PLUMMER et al., 2016). No Brasil esta neoplasia fica em terceiro lugar no ranking entre as mulheres, com uma estimativa de aproximadamente 16.000 novos casos por ano para o biênio 2018-2019 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018). Destaca-se que 84% dos novos casos de câncer de colo do útero são diagnosticados em regiões menos desenvolvidas do mundo (SERRANO et al., 2018).

A prevenção secundária é uma importante intervenção para redução das taxas de câncer de colo uterino e consiste em uma estratégia de rastreio para diagnóstico e posterior seguimento e tratamento de pacientes com lesões pré-neoplásicas como as LIEAG (BASU et al., 2018). Nosso estudo teve como objetivo a avaliação imunológica no microambiente tecidual de lesões intraepiteliais cervicais, desta maneira contribuindo para melhor entendimento da fisiopatologia destas lesões, possibilitando no futuro, novas alternativas eficazes para seu tratamento ou a descoberta de novos marcadores biológicos de prognóstico.

A prevalência das lesões intraepiteliais cervicais e a idade em que elas mais incidem variam de acordo com a população estudada, devido a diferenças nos programas de rastreamento como idade de início do rastreio, frequência, cobertura e acompanhamento de mulheres com atipias citológicas (TING; KRUIKAS; SMITH, 2010). Em um estudo realizado na cidade de Campinas, SP, Brasil, a idade média de mulheres com diagnóstico de NIC I, NIC II e NIC III foi 28, 29,3 e 38,1 anos respectivamente (D'OTTAVIANO-MORELLI et al., 2007). Em nosso estudo a idade média para o grupo de pacientes com LIEBG (NIC I) foi de 31,1 anos enquanto para o grupo de pacientes com LIEAG (NIC II/NIC III) foi de 36,1 anos. A idade média das pacientes com LIEAG está de acordo com o encontrado em estudos prévios, onde o pico de incidência destas lesões ocorre em mulheres com mais que 30 anos (TING; KRUIKAS; SMITH, 2010; BASU et al., 2013). Entretanto, a idade média das pacientes com LIEBG do nosso estudo foi maior que a encontrada na literatura, que

apresenta pico de incidência entre mulheres com menos que 30 anos. Isto pode ser em decorrência de nosso serviço ser referência para encaminhamento de pacientes que necessitam de tratamento, sendo que para pacientes com LIEBG que apresentam lesões persistentes a prevalência é maior em mulheres com mais de 30 anos (TING et al., 2015).

Infecções persistentes por HPV de alto risco levam ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e podem progredir para câncer do colo do útero (ZUR HAUSEN, 2009). Desta maneira, os fatores de risco para o desenvolvimento destas lesões são aqueles associados à aquisição do HPV ou ao comprometimento da resposta imune a este vírus (COHEN et al., 2019). Existem vários fatores de risco conhecidos, que impactam no aumento da probabilidade de desenvolvimento destas doenças, sendo o tabagismo, história de múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, uso de contraceptivos hormonais, baixo nível socioeconômico e idade precoce da primeira relação sexual os que mais se destacam (STUMBAR; STEVENS; FELD, 2019).

Em nossa casuística importantes fatores de risco como tabagismo, história de múltiplos parceiros sexuais, idade precoce de primeira relação sexual e uso de contraceptivos hormonais não tiveram associação estatisticamente significativa com o grau da lesão cervical. Isto se deve principalmente devido a nossa amostra de pacientes ser pequena e não aleatória. Além disso, todas as pacientes de nosso estudo foram encaminhadas para realização de colposcopia por alguma indicação clínica seja por presença de alteração no exame citopatológico (LIEBG, LIEAG, ASC-US, ASC-H, AGC) ou por seguimento pós-tratamento excisional da lesão de alto grau com cirurgia de alta frequência (CAF), apresentando assim fatores de risco comuns para aquisição do HPV.

O grau de escolaridade entre as pacientes deste estudo teve associação estatisticamente significativa entre os grupos de lesão cervical, sendo que o grupo de pacientes com lesão de alto grau apresentou maior porcentagem de analfabetismo e baixa escolaridade, o que está intimamente relacionado com o baixo nível socioeconômico, sendo este, um fator de risco associado ao câncer de colo uterino (BERRINGTON DE GONZÁLEZ; GREEN; INTERNATIONAL

COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2007).

O número de partos teve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de lesão cervical, sendo o grupo de pacientes com lesão de alto grau o que apresentou a menor taxa de pacientes nulíparas e maior taxa de pacientes com 3 ou mais partos. O mecanismo que faz com que a multiparidade esteja associada a maior risco de câncer de colo uterino não é claro, mas possíveis explicações seriam as mudanças hormonais proporcionadas pela gravidez que poderiam deixar a mulher mais suscetível à infecção pelo HPV, ou pela imunodepressão causada pela gestação que poderia permitir uma janela de oportunidade para o desenvolvimento tumoral (STUMBAR; STEVENS; FELD, 2019).

Dentre todos estes fatores de risco o mecanismo comum para o surgimento do câncer de colo de útero é a infecção pelo HPV, que tem quase 100% dos novos casos desta neoplasia atribuídos a esta infecção (PLUMMER et al., 2016). Desta maneira, a prevalência da infecção pelo HPV aumenta de acordo com a severidade da lesão cervical, que está presente em 74,8 % das lesões cervicais de baixo grau (LIEBG/NIC I) e 88,9% das lesões cervicais de alto grau (LIEAG/ NIC II e III), sendo o HPV16 o mais prevalente nas lesões de alto grau, estando presente em 19,3% das lesões de baixo grau enquanto nas lesões de alto grau sua prevalência é de 45,1% (GUAN et al., 2012). Já na população geral, sem alterações na citologia, a prevalência global do HPV é de 11,7% (SERRANO et al., 2018).

Em nosso estudo também pudemos observar a correlação entre a severidade da lesão intraepitelial e infecção pelo HPV, com 10,7% de positividade para DNA-HPV nas pacientes do grupo ALIE, 33,3% das pacientes do grupo LIEBG e 66,7% das pacientes do grupo LIEAG ($p < 0,0001$). Figura 2. A sensibilidade do método laboratorial utilizado e diferenças na metodologia da coleta e armazenagem do material podem ter influenciado nas menores taxas de prevalência de infecção pelo HPV nas pacientes com lesão intraepitelial de nosso estudo comparando-se com estudos prévios.

A colposcopia é um exame que envolve a avaliação do colo uterino, da vagina e da vulva sob uma lente de aumento após aplicação de solução de ácido acético a 3 - 5%, cujo objetivo é direcionar a biópsia para o ponto de maior gravidade da

lesão. O diagnóstico final da lesão observada à colposcopia só é estabelecido após avaliação histopatológica da amostra (STUMBAR; STEVENS; FELD, 2019). Apesar de ser um importante pilar para prevenção do câncer de colo uterino, tendo um papel fundamental para redução da incidência e mortalidade desta neoplasia, a colposcopia possui acurácia e reprodutibilidade limitadas (KHAN et al., 2017). Em uma metanálise foi verificada que a colposcopia tem boa sensibilidade para detecção de lesões de alto grau, mas possui baixa especificidade, com taxas de sensibilidade de 95% e de especificidade de 42% (MUSTAFA et al., 2016). A alta taxa de falsos positivos, que levou à baixa especificidade da colposcopia verificada neste estudo, justifica o grande número de pacientes com achados colposcópicos maiores (sugestivos de lesão de alto grau) nas pacientes do grupo ALIE e do grupo LIEBG (42,9% e 38,1% respectivamente), porém o número de pacientes com achados colposcópicos maiores foi significativamente maior no grupo de paciente com LIEAG (88,5%).

As citocinas são peptídeos ou proteínas secretadas por vários tipos de células em diversos tecidos, sendo importantes para o desencadeamento e eficácia da resposta imune, pois agem no crescimento, diferenciação ou ativação de diferentes tipos de células (PARADKAR et al., 2014). Dependendo do tipo de resposta imune gerada estas substâncias irão desempenhar papel fundamental na história natural da infecção pelo HPV, sendo que a falha em gerar uma resposta imune celular eficaz e a imunotolerância a este vírus são considerados fatores essenciais para a persistência da infecção viral levando ao aumento do risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e câncer de colo do útero (EINSTEIN et al., 2009).

Para avaliar se a variabilidade interindividual da quantidade de amostra coletada poderia interferir no resultado do estudo realizou-se a análise dos valores de cada citocina quantificados em pg/ml comparando-se com os valores ajustados pela concentração total de proteínas em pg/ml/mg de proteína. Os resultados encontrados neste estudo pelos dois métodos foram consistentes, encontrando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as mesmas citocinas (IL-2 e IL-23) em ambas as análises (Tabelas 3 e 5), o que demonstra grande homogeneidade entre as amostras. Comparativamente a outras técnicas de quantificação de citocinas, este estudo mostrou boa capacidade de detecção destas substâncias, sendo possível detectar a citocina IL-2 em 92,9% das amostras, IL-4

em 88,6% das amostras, IL-10 em 93,6% das amostras, IL-12 em 93,6% das amostras, IL-17A em 93,6% das amostras, IL-23 em 92,2% das amostras e INF- γ em 94,3% das amostras, sendo que a taxa de detecção considerada aceitável para estudos epidemiológicos seria acima de 25% (KOSHIOL et al., 2014).

Presume-se que a ativação de citocinas antivirais se inicie logo após o estabelecimento da infecção pelo HPV (SCOTT et al., 2013). No entanto, a associação entre a quantificação de citocinas e a gravidade da lesão cervical é pouco compreendida, pois existem vários fatores que podem influenciar na ativação destas substâncias que precisam ser mais bem conhecidos, como a história natural da infecção pelo HPV e a resposta imune específica do hospedeiro (OTANI et al., 2019).

Vários estudos correlacionaram o nível de citocinas com lesões cervicais e infecção pelo HPV (BAIS et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2008; PEGHINI et al., 2012; KOSHIOL et al., 2014; HARDIKAR et al., 2015; IWATA et al., 2015; DANIILIDIS et al., 2016; OTANI et al., 2019). Neste estudo, avaliou-se citocinas que são importantes para a diferenciação de cada linhagem celular ou que representem importante papel para cada padrão de resposta imune, Th₁ (IL-12 e INF- γ), Th₂ (IL-2 e IL-4) e Treg (IL-10) e Th₁₇ (IL-23 e IL-17A) (ZHU et al., 2001; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003; OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008; ZHU; PAUL, 2008; APETOH et al., 2010), comparando os níveis destas citocinas entre os grupos histopatológicos: ALIE, LIEBG e LIEAG.

Para a avaliação da via Th₁ neste estudo, foram quantificadas INF- γ e IL-12, sendo observados níveis mais elevados destas citocinas em tecidos com LIEBG em comparação com LIEAG e tecidos sem atipias (ALIE), mas sem significância estatística para ambas citocinas. Porém, como os valores p ficaram muito próximos ao limite de significância ($p=0,065$ para IL-12 e INF- γ), um tamanho amostral maior talvez pudesse levar a um resultado estatisticamente significativo.

Estas citocinas são importantes para iniciação da resposta imune adaptativa celular pela via Th₁. Este padrão de resposta é crucial para induzir uma resposta imune antitumoral e se considerarmos a LIEBG como o processo inicial de infecção pelo HPV espera-se que o hospedeiro promova aumento destas citocinas pró-inflamatórias desencadeando uma resposta imune celular efetiva contra esta

infecção viral. Enquanto que nas lesões de alto grau estas citocinas estariam supressas em decorrência da infecção persistente pelo HPV, como um mecanismo de evasão da resposta imune (PARADKAR et al., 2014).

Em um estudo que avaliou o nível de INF- γ por imunohistoquímica foi demonstrado aumento da densidade desta citocina nos tecidos de lesões intraepiteliais cervicais em comparação com tecidos cervicais normais, mas há uma diminuição novamente em tecidos com câncer em comparação a lesão intraepitelial (KOBAYASHI et al., 2008). Interferons são quimiocinas essenciais para a ativação da resposta imune inata e adaptativa contra infecções virais direcionando a resposta para o padrão Th₁ (DIAMOND; FARZAN, 2013) e podem ser classificados como tipo 1 (INF- α e INF- β) ou tipo 2 (INF- γ) (PARADKAR et al., 2014). A injeção intracervical de INF- α foi avaliada em pacientes com NIC II e III, com 60% destas pacientes apresentando resposta satisfatória ao tratamento, sendo que estas tiveram maior expressão de citocinas do padrão Th₁ e redução da taxa de infecção pelo HPV de alto risco (RAMOS et al., 2010).

Estudo realizado por Bais et al., 2007 avaliou a IL-12 demonstrando níveis mais elevados desta citocina em pacientes com NIC II em comparação com NIC III e câncer invasor (BAIS et al., 2007). Esta citocina é uma glicoproteína expressa por linfócitos B, células dendríticas e fagócitos, e aparenta ter um efeito protetor contra o câncer de colo uterino (PARADKAR et al., 2014).

Vários trabalhos têm demonstrado que pacientes que apresentam perfil de citocinas com prevalência do padrão Th₁ têm melhores desfechos clínicos, com maior possibilidade de clareamento da infecção HPV do que pacientes que apresentam prevalência de citocinas do padrão Th₂ (SCOTT et al., 2013; LAZARENKO et al., 2014; STANLEY; STERLING, 2014). Desta maneira, encontrar preditores imunológicos capazes de identificar mulheres com potencial para infecção persistente e progressão para lesões intraepiteliais pode ser de grande valia para melhorar estratégias de prevenção do câncer de colo uterino (TORRES-POVEDA et al., 2018).

Para avaliação da via Th₂, foram utilizadas as citocinas IL-2 e IL-4, que são importantes fatores para ativação, diferenciação e proliferação de linfócitos, direcionando a resposta imune para esta via imunológica de resposta (ZHU et al.,

2001). Considerando que o padrão de resposta Th₂ pode favorecer o desenvolvimento de lesões de alto grau do colo uterino, estudos prévios demonstraram níveis mais elevados de IL-2 e IL-4 em lesões intraepiteliais cervicais e em pacientes com infecção por AR-HPV (PEGHINI et al., 2012; TELESHEVA et al., 2012; DANIILIDIS et al., 2016).

Em oposição a este raciocínio, neste estudo verificou-se diferença significativa no nível da citocina IL-2 entre os grupos anatomopatológicos, sendo verificado nível mais elevado desta citocina no grupo ALIE em comparação com os grupos de lesão cervical (LIEBG e LIEAG). Porém, esse resultado é consistente com um estudo recente que mostrou que a gravidade da doença cervical estava inversamente relacionada aos níveis de IL-2 (LI et al., 2019). Apesar da IL-2 ser importante na via de diferenciação do padrão de resposta Th₂ ela pode ser considerada uma importante citocina pro-inflamatória do padrão de resposta Th₁ (PARADKAR et al., 2014; SONG et al., 2015), o que justifica o achado deste estudo onde IL-2 estava significativamente reduzida nos casos de lesão intraepitelial cervical nos permitindo hipotetizar que a supressão desta citocina pode facilitar o desenvolvimento destas lesões.

O desenvolvimento de terapias imunológicas tem sido uma importante vertente para o tratamento do câncer de colo uterino e de lesões pré-malignas (TIRONE; MICHELIN; MURTA, 2010; ORBEGOSO; MURALI; BANERJEE, 2018), sendo que a citocina IL-2 já foi testada para o tratamento de pacientes oncológicos (SIM; RADVANYI, 2014). Esta citocina pode ter efeitos antivirais e antitumorais, podendo ser benéfica para o clareamento do HPV e para a prevenção da progressão de lesões cervicais. Além disso, a IL-2 é uma citocina pleiotrópica, com múltiplas células alvo, incluindo células tumorais, podendo inibir a sua proliferação (VALLE-MENDIOLA et al., 2016). Desta maneira, a infecção pelo HPV pode promover sua regulação negativa, e assim, favorecer o desenvolvimento de lesões.

Já a IL-4 é uma citocina anti-inflamatória que pode inibir a expressão de citocinas do padrão Th₁ e polarizar a resposta imune para o padrão Th₂ (OLVER et al., 2007) e sua maior expressão está associada à NIC/câncer de colo do útero (PEGHINI et al., 2012). Além disso, o polimorfismo no gene da IL-4, que faz com que a expressão desta citocina fique aumentada, está mais associado ao câncer de colo

uterino (TORRES-POVEDA et al., 2016). Em nosso estudo não detectamos diferença significativa no nível de IL-4 entre os grupos, o que pode ser em decorrência da concentração muito baixa desta citocina (próxima aos níveis inferiores da capacidade de detecção) encontrado em todas as amostras.

Para avaliação da via Treg, foi quantificado a citocina IL-10, que tem um papel chave para regulação do sistema imune, inibindo a resposta inflamatória sendo que o aumento da produção desta citocina está associado com a sustentação de infecções crônicas e sua inibição promove o clareamento do patógeno (SANJABI et al., 2009). A função imunossupressiva da IL-10 produzida em lesões cervicais pode interagir com outros tipos de citocinas e enfraquecer a imunidade antitumoral, facilitando a progressão de lesões (BERTI et al., 2017). Neste estudo não se observou diferença no nível desta citocina entre os três grupos anatomopatológicos. Porém, vários estudos já demonstraram esta correlação, demonstrando elevados níveis de IL-10 em lesões intraepiteliais cervicais e câncer de colo uterino, assim como em infecções persistentes pelo HPV (EKALAKSANANAN et al., 2014; DANIILIDIS et al., 2016; LI et al., 2016). A superexpressão de IL-10 criando um ambiente imunossupressivo, tem sido reportada como fator determinante para a criação de um microambiente favorável para a progressão de lesões cervicais e evasão do sistema imune pelo HPV (SYRJÄNEN et al., 2009). No entanto, também existem estudos demonstrando correlação entre a redução de IL-10 e o desenvolvimento de cânceres distintos, incluindo câncer de colo uterino (BROWER, 2005) e o aumento desta citocina em associação à eliminação do HPV (FARZANEH et al., 2006). Esta controvérsia aponta a necessidade de mais estudos com amostras maiores para esclarecer o papel desta citocina no controle da infecção pelo HPV e na progressão de lesões pré-neoplásicas.

Para avaliar o padrão de resposta imune Th₁₇, incluímos as citocinas IL-23 e IL17A, esta via de resposta imune possui importante papel contra algumas infecções bacterianas e fúngicas, na patogênese de doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas. A IL-17 é uma das principais citocinas deste padrão de resposta imune, estando envolvida no desenvolvimento de inflamação e na defesa do hospedeiro contra infecções, induzindo a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (IWAKURA et al., 2011; MIOSSEC; KOLLS, 2012). Muitos estudos têm associado o aumento da concentração de IL-17 com infecções

persistentes pelo HPV, com lesões intraepiteliais cervicais e câncer de colo uterino (HOU et al., 2012; GOSMANN et al., 2014; MIRANDA et al., 2014; XUE et al., 2018). Os resultados deste estudo fazem oposição aos resultados obtidos em estudos prévios, pois não encontrou diferença na concentração de IL-17A entre os três grupos anatomopatológicos. Entretanto, o exato papel do padrão de resposta Th₁₇ na imunopatogênese tumoral permanece incerto, pois a expressão de Th₁₇ em células tumorais tanto pode suprimir a progressão tumoral através do aumento da imunidade antitumoral quanto pode facilitar sua progressão através do aumento da angiogênese inflamatória (KRYCZEK et al., 2009). Se o efeito da resposta Th₁₇ é pouco conhecido na resposta ao câncer, menos ainda se sabe em relação às lesões pré-neoplásicas cervicais.

Outra importante citocina indutora da diferenciação da resposta Th₁₇ é a IL-23 que pode desempenhar um papel na resposta inflamatória do sistema imune inato em mucosas (CUA; TATO, 2010). No entanto, o papel desta citocina para a resposta imune à infecção pelo HPV ainda é pouco conhecido. No atual estudo, a citocina IL-23 foi encontrada em concentração significativamente maior nas pacientes do grupo ALIE em comparação com o grupo de pacientes com LIEAG. É importante destacar que este estudo avaliou a concentração de citocinas no interior do tecido, através de biópsias. É provável que o microambiente do interior da lesão apresente níveis diferentes de citocinas em comparação àqueles encontrados nas secreções, já que a infecção pelo HPV pode promover uma regulação negativa de citocinas no interior da lesão, diferentemente do ambiente adjacente ao tecido infectado, que se torna rico em citocinas pró-inflamatórias (AMADOR-MOLINA et al., 2013). Além disto, já foi demonstrado que as células Th₁₇ inatas se localizam predominantemente nos tecidos cutâneo mucosos, onde funcionam como sentinelas do sistema imune sendo a citocina IL-23 uma forte indutora da produção de citocinas pró-inflamatórias (CUA; TATO, 2010). Em um estudo experimental foi demonstrado que ratos com deficiência de receptores para IL-23 têm mais risco de progressão de lesões pré-malignas orais para câncer (CAUGHRON; YANG; YOUNG, 2018). Desta maneira, é de se esperar que a infecção pelo HPV promova uma regulação negativa desta citocina como mecanismo de evasão da resposta imune, justificando a menor concentração de IL-23 encontrada no grupo LIEAG neste estudo.

A infecção pelo HPV de alto risco tem a capacidade de interferir nas vias de sinalização do sistema imune inato e adaptativo, interferindo diretamente na produção de citocinas (TUMMERS; BURG, 2015). Para demonstrar este efeito, diversos estudos avaliaram a concentração de citocinas no colo uterino em relação ao status de infecção pelo HPV, independente da lesão associada (TELESHEVA et al., 2012; LI et al., 2019; OTANI et al., 2019). Telesheva et al (2012) encontraram concentrações da citocina INF- γ significativamente maiores em pacientes com infecção transitória pelo HPV em comparação com pacientes com infecção persistente por este vírus. Um interessante estudo longitudinal que avaliou mulheres com infecção persistente por AR-HPVs demonstrou que as citocinas IL-2 e IL-6 podem ser importantes marcadores de risco para o surgimento de lesões de alto grau (LI et al., 2019).

Neste estudo não foi encontrada diferença significativa para as citocinas estudadas entre as pacientes com PCR-HPV positivo e negativo, o que pode ser em decorrência da sensibilidade do teste utilizado, sendo que em nossa casuística tivemos uma porcentagem relativamente baixa de positividade para PCR-HPV nas pacientes com lesão intraepitelial comparando-se com o descrito na literatura (GUAN et al., 2012). O que demonstra que a presença da lesão cervical pode ser mais importante para a avaliação de alterações na imunidade local do que a detecção da infecção pelo HPV, já que esta depende da sensibilidade do método utilizado. Além disso, a lesão intraepitelial cervical representa uma alteração causada pelo HPV, mesmo que este não seja detectado.

Daniilidis et al (2015) avaliaram a diferença entre as concentrações de citocinas em grupos de pacientes com lesões cervicais, agrupando as citocinas por grupos de padrão de resposta imune: 1) Mediadores da imunidade natural, 2) Fatores reguladores de linfócitos e 3) Fatores reguladores da inflamação imunológica. Sendo encontradas distribuições de citocinas diferentes em cada grupo de estudo (normal, LIEBG e LIEAG).

Em nosso estudo, ao avaliar a distribuição das citocinas em cada grupo de estudo, nota-se detecção da citocina IL-17A em maiores quantidades em todos os grupos e das citocinas IL-4 e IL-23 em menores quantidades em todos os grupos. Porém foram notadas diferenças nos padrões de distribuição das citocinas entre os grupos: ALIE, LIEBG e LIEAG (Figura 6). Sendo que o grupo LIEAG foi o único que

apresentou diferença significativa entre as citocinas IL-10 e IL-2 com menor concentração desta última e entre INF γ e IL-2, com menor concentração desta última. E a comparação entre as citocinas IL-12 e IL-2 mostrou diferença significativa entre seus níveis para os grupos LIEBG e LIEAG com níveis menores de IL-2 em relação a IL-12 ($p=0,021$ e $p<0,001$ respectivamente). Tabela 9. Estes achados demonstram que a infecção pelo HPV e as lesões causadas por ele proporcionam uma desregulação na produção de citocinas no microambiente destas lesões.

O presente estudo tem como grande diferencial a técnica utilizada para quantificação de citocinas através de amostras de tecidos, sendo que estas amostras foram coletadas por um único pesquisador e conforme demonstrado em nosso estudo, apresentaram boa taxa de detecção para todas as citocinas estudadas. Além disto, nós realizamos a análise da quantificação de citocinas por amostra e após realizamos a metodologia de ajuste por quantificação total de proteínas por amostra demonstrando que nossas amostras apresentam grande homogeneidade interindividual, já que foram obtidos os mesmos resultados utilizando ambas as metodologias.

Este estudo, empregou um painel abrangente de citocinas para testar amostras do local da lesão, indicando um papel importante da IL-2 e IL-23 nessa região e, assim, possibilitando um melhor entendimento do mecanismo de resposta imune no microambiente das lesões intra-epiteliais cervicais.

No entanto este estudo tem algumas limitações, como o fato de ter sido realizado em um único centro, o que pode trazer o viés de seleção por se tratar de um centro de referência. Outro fator negativo é o fato de este ser um estudo transversal, não podendo gerar conclusões concretas a respeito da relação causa e efeito da redução destas citocinas para estas pacientes. Desta maneira, estudos longitudinais e com maiores amostras avaliando a imunidade local, principalmente no microambiente de lesões causadas pelo HPV são necessários para melhorar nosso entendimento do efeito que a regulação destas citocinas pode promover na evolução destas lesões.

7 CONCLUSÃO

As concentrações das citocinas IL-2 e IL-23 em amostras de biópsias de colo uterino de mulheres com achados colposcópicos anormais mostrou diferença significativa entre os grupos de estudo: ALIE, LIEBG e LIEAG.

As concentrações das citocinas avaliadas neste estudo (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e INF- γ) não apresentaram diferença significativa em relação ao *status* biomolecular do HPV, avaliado através da reação em cadeia de polimerase (PCR-HPV).

Os padrões de distribuição das citocinas testadas (IL-12, INF- γ , IL-2, IL-4, IL-23, IL-17 e IL-10) foram diferentes entre os grupos de estudo (ALIE, LIEBG e LIEAG), sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre as citocinas em todos os grupos, com diferenças nas relações entre os pares de citocina em cada grupo.

REFERÊNCIAS¹

AMADOR-MOLINA, A.; HERNÁNDEZ-VALENCIA, J. F.; LAMOYI, E.; CONTRERAS-PAREDES, A.; LIZANO, M. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624–42, 28 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169630>>

APETOH, L.; QUINTANA, F. J.; POT, C.; JOLLER, N.; XIAO, S.; KUMAR, D. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Interacts with c-Maf to Promote the Differentiation of Type 1 Regulatory T Cells Induced by IL-27. **Nat Immunol**, v. 11, n. 9, p. 854–861, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676095>>.

AUDIRAC-CHALIFOUR, A.; TORRES-POVEDA, K.; BAHENA-ROMÁN, M.; TÉLLEZ-SOSA, J.; MARTÍNEZ-BARNETCHE, J.; CORTINA-CEBALLOS, B. et al. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153274, 26 abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0153274>>.

BAIS, A. G.; BECKMANN, I.; EWING, P. C.; EIJKEMANS, M. J.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J. et al. Cytokine Release in HR-HPV(+) Women without and with Cervical Dysplasia (CIN II and III) or Carcinoma, Compared with HR-HPV(-) Controls. **Mediators Inflamm**, v. 2007, p. 24147, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288269>>.

BARTON, G. M. Viral Recognition by Toll-like Receptors. **Semin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 33–40, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336545>>.

BASU, P.; MITTAL, S.; BHADRA VALE, D.; CHAMI KHARAJI, Y. Secondary prevention of cervical cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 73–85, fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28988647>>.

BASU, P.; MITTAL, S.; BHAUMIK, S.; MANDAL, S. S.; SAMADDAR, A.; RAY, C. et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasias in a previously unscreened population-A pooled analysis from three studies. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 7, p. 1693–1699, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27793>>

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT NBR 6023).

BAUER, M.; FINK, B.; THÜRMAN, L.; ESZLINGER, M.; HERBERTH, G.; LEHMANN, I. Tobacco smoking differently influences cell types of the innate and adaptive immune system—indications from CpG site methylation. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 83, 3 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27493699>>.

BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M.; ONG, C. K.; VILLA, L. L.; DELIUS, H. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **The Journal of infectious diseases**, v. 170, n. 5, p. 1077–85, nov. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7963696>>.

BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A.; GREEN, J.; INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. **International journal of cancer**, v. 120, n. 4, p. 885–91, 15 fev. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22357>>.

BERTI, F. C. B.; PEREIRA, A. P. L.; CEBINELLI, G. C. M.; TRUGILO, K. P.; BRAJÃO DE OLIVEIRA, K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 34, p. 1–13, abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28365229>>.

BORNSTEIN, J.; BENTLEY, J.; BÖSZE, P.; GIRARDI, F.; HAEFNER, H.; MENTON, M. et al. 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 1, p. 166–172, jul. 2012. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00006250-201207000-00026>>.

BOSCH, F. X.; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M.; GIULIANO, A. R.; DE SANJOSE, S.; BRUNI, L. et al. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. **Vaccine**, v. 26 Suppl 1, p. K1-16, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847553>>.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J.; SHAH, K. V. The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, n. 4, p. 244–265, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>>.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>>.

BROTMAN, R. M.; SHARDELL, M. D.; GAJER, P.; TRACY, J. K.; ZENILMAN, J. M.; RAVEL, J. et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 11, p. 1723–33, 1 dez. 2014. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/infdis/jiu330>>.

BROWER, V. Researchers attempting to define role of cytokines in cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 16, p. 1175–7, 17 ago. 2005. Disponível em: <<http://academic.oup.com/jnci/article/97/16/1175/2521368/Researchers-Attempting-To-Define-Role-of-Cytokines>>.

CASTLE, P. E.; GIULIANO, A. R. Chapter 4: Genital Tract Infections, Cervical Inflammation, and Antioxidant Nutrients--Assessing Their Roles as Human Papillomavirus Cofactors. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 31, p. 29–34, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807942>>.

CASTLE, P. E.; HILDESHEIM, A.; BOWMAN, F. P.; STRICKLER, H. D.; WALKER, J. L.; PUSTILNIK, T. et al. Cervical Concentrations of Interleukin-10 and Interleukin-12 Do Not Correlate with Plasma Levels. **J Clin Immunol**, v. 22, n. 1, p. 23–27, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958590>>.

CAUGHRON, B.; YANG, Y.; YOUNG, M. R. I. Role of IL-23 signaling in the progression of premalignant oral lesions to cancer. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196034, 17 abr. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0196034>>.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N. et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-Beta Induction of Transcription Factor Foxp3. **J Exp Med**, v. 198, n. 12, p. 1875–1886, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676299>>.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The Natural History of Human Papillomavirus Infections of the Mucosal Epithelia. **APMIS**, v. 118, n. 6–7, p. 422–449, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553526>>.

CLERICI, M.; SHEARER, G. M.; CLERICI, E. Cytokine Dysregulation in Invasive Cervical Carcinoma and Other Human Neoplasias: Time to Consider the TH1/TH2 Paradigm. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 4, p. 261–263, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486806>>.

COHEN, P. A.; JHINGRAN, A.; OAKNIN, A.; DENNY, L. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 393, n. 10167, p. 169–182, 12 jan. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30638582>>.

CRANE, J. M. G. Pregnancy outcome after loop electrosurgical excision procedure: a systematic review. **Obstetrics and gynecology**, v. 102, n. 5 Pt 1, p. 1058–62, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672487>>.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 7, p. 479–89, 18 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri2800>>.

D'OTTAVIANO-MORELLI, M. G. L.; ZEFERINO, L.; CECATTI, J. G.; TERRABUIO, D. R.; MARTINEZ, E. Z. Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma based on cytological screening in the region of Campinas, São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 153–159, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15029316>>.

DA SILVA, D. M.; FAUSCH, S. C.; VERBEEK, J. S.; KAST, W. M. Uptake of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and contributes to acquisition of T cell immunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 12, p. 7587–97, 15 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548594>>.

DANIILIDIS, A.; KOUTSOS, J.; OIKONOMOU, Z.; NASIOUTZIKI, M.; HATZIPARADISI, K.; TANTANASIS, T. Cytokines of Cervical Mucosa and Human Papilloma Virus Infection of the Cervix: A Descriptive Study. **Acta cytologica**, v. 60, n. 1, p. 58–64, 23 mar. 2016. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/445161>>.

DARRAGH, T. M.; COLGAN, T. J.; COX, J. T.; HELLER, D. S.; HENRY, M. R.; LUFF, R. D. et al.; MEMBERS OF LAST PROJECT WORK GROUPS. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 16, n. 3, p. 205–242, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820980>>.

DAUD, I. I.; SCOTT, M. E.; MA, Y.; SHIBOSKI, S.; FARHAT, S.; MOSCICKI, A. B. Association between Toll-like Receptor Expression and Human Papillomavirus Type 16 Persistence. **Int J Cancer**, v. 128, n. 4, p. 879–886, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473890>>.

DE JONG, A.; VAN POELGEEST, M. I.; VAN DER HULST, J. M.; DRIJFHOUT, J. W.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J. et al. Human Papillomavirus Type 16-Positive Cervical Cancer Is Associated with Impaired CD4+ T-Cell Immunity against Early Antigens E2 and E6. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5449–5455, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289354>>.

DE RODA HUSMAN, A. M.; SNIJDERS, P. J.; STEL, H. V.; VAN DEN BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; WALBOOMERS, J. M. Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. **British journal of cancer**, v. 72, n. 2, p. 412–7, ago. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543772>>.

DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 1, p. 46–57, 14 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3344>>.

DOORBAR, J. The Papillomavirus Life Cycle. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753007>>.

DOORBAR, J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Disease markers**, v. 23, n. 4, p. 297–313, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627064>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

DURCAN, L.; PETRI, M. Immunomodulators in SLE: Clinical evidence and immunologic actions. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 73–84, nov. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27371107>>.

EINSTEIN, M. H.; SCHILLER, J. T.; VISCIDI, R. P.; STRICKLER, H. D.; COURSAGET, P.; TAN, T. et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 9, n. 6, p. 347–56, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467474>>.

EKALAKSANANAN, T.; MALAT, P.; PIENTONG, C.; KONGYINGYONES, B.; CHUMWORATHAYI, B.; KLEEBKAOW, P. Local Cervical Immunity in Women with Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions and Immune Responses after Abrasion. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 10, p. 4197–4201, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935370>>.

FARZANEH, F.; ROBERTS, S.; MANDAL, D.; OLLIER, B.; WINTERS, U.; KITCHENER, H. C. et al. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 113, n. 8, p. 961–4, ago. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0528.2006.00956.x>>.

FAUSCH, S. C.; DA SILVA, D. M.; RUDOLF, M. P.; KAST, W. M. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 6, p. 3242–9, 15 set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218143>>.

FORMAN, D.; DE MARTEL, C.; LACEY, C. J.; SOERJOMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; BRUNI, L. et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. **Vaccine**, v. 30, p. F12–F23, 20 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199955>>.

GAO, T.; WANG, J.; YANG, M.; LI, H. Transcriptome analysis reveals the effect of oral contraceptive use on cervical cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 4, p. 1703–8, 8 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109897>>.

GOSMANN, C.; MATTAROLLO, S. R.; BRIDGE, J. A.; FRAZER, I. H.; BLUMENTHAL, A. IL-17 Suppresses Immune Effector Functions in Human Papillomavirus-Associated Epithelial Hyperplasia. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 5, p. 2248–2257, 1 set. 2014. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1400216>>.

GUAN, P.; HOWELL-JONES, R.; LI, N.; BRUNI, L.; DE SANJOSÉ, S.; FRANCESCHI, S. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. **International journal of cancer**, v. 131, n. 10, p. 2349–59, 15 nov. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27485>>.

GUVEN, S.; KART, C.; GUVENDAG GUVEN, E. S.; GUNALP, G. S. The underlying cause of cervical cancer in oral contraceptive users may be related to cervical mucus changes. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 3, p. 550–2, jan. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987707001089>>.

HARDIKAR, S.; JOHNSON, L. G.; MALKKI, M.; PETERSDORF, E. W.; GALLOWAY, D. A.; SCHWARTZ, S. M. et al. A population-based case–control study of genetic variation in cytokine genes associated with risk of cervical and vulvar cancers. **Gynecologic Oncology**, v. 139, n. 1, p. 90–96, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241630>>.

HOU, F.; LI, Z.; MA, D.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, T. et al. Distribution of Th17 cells and Foxp3-expressing T cells in tumor-infiltrating lymphocytes in patients with uterine cervical cancer. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 413, n. 23–24, p. 1848–54, 20 nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898112003518>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019 Inca**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER; APPLEBY, P.; BERAL, V.; BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A.; COLIN, D.; FRANCESCHI, S.; GOODHILL, A. et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **Lancet (London, England)**, v. 370, n. 9599, p. 1609–21, 10 nov. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607616845>>.

ISAACSON WECHSLER, E.; WANG, Q.; ROBERTS, I.; PAGLIARULO, E.; JACKSON, D.; UNTERSBERGER, C. et al. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. **Journal of virology**, v. 86, n. 11, p. 6358–64, 1 jun. 2012. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.07069-11>>.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H.; SAIJO, S.; NAKAE, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149–62, 25 fev. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761311000501>>.

IWATA, T.; FUJII, T.; MORII, K.; SAITO, M.; SUGIYAMA, J.; NISHIO, H. et al. Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 126–133, 1 fev. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10147-014-0680-8>>.

KARIM, R.; MEYERS, C.; BACKENDORF, C.; LUDIGS, K.; OFFRINGA, R.; VAN OMMEN, G. J. et al. Human Papillomavirus Deregulates the Response of a Cellular Network Comprising of Chemotactic and Proinflammatory Genes. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17848, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423754>>.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The Roles of TLRs, RLRs and NLRs in Pathogen Recognition. **Int Immunol**, v. 21, n. 4, p. 317–337, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246554>>.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637–50, 27 maio 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761311001907>>.

KHAN, M. J.; WERNER, C. L.; DARRAGH, T. M.; GUIDO, R. S.; MATHEWS, C.; MOSCICKI, A. B. et al. ASCCP Colposcopy Standards. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 21, n. 4, p. 223–229, out. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28953110>>.

KJELDSEN, J. W.; DONIA, M.; SVANE, I. M. Cancer immunotherapy. **Ugeskrift for læger**, v. 180, n. 21, 21 maio 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29804567>>.

KOBAYASHI, A.; WEINBERG, V.; DARRAGH, T.; SMITH-MCCUNE, K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 5, p. 412–420, 2 set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079205>>.

KOENEMAN, M. M.; KRUITWAGEN, R. F.; NIJMAN, H. W.; SLANGEN, B. F.; VAN GORP, T.; KRUSE, A.-J. Natural history of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a review of prognostic biomarkers. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 4, p. 527–546, 3 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703310>>.

KOSHIOL, J.; SKLAVOS, M.; WENTZENSEN, N.; KEMP, T.; SCHIFFMAN, M.; DUNN, S. T. et al. Evaluation of a multiplex panel of immune-related markers in cervical secretions: a methodologic study. **International journal of cancer**, v. 134, n. 2, p. 411–25, 15 jan. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28354>>.

KRIEK, J.-M.; JAUMDALLY, S. Z.; MASSON, L.; LITTLE, F.; MBULAWA, Z.; GUMBI, P. P. et al. Female genital tract inflammation, HIV co-infection and persistent mucosal Human Papillomavirus (HPV) infections. **Virology**, v. 493, p. 247–254, jun. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682216300526>>.

KRYCZEK, I.; BANERJEE, M.; CHENG, P.; VATAN, L.; SZELIGA, W.; WEI, S. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood**, v. 114, n. 6, p. 1141–9, 6 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-03-208249>>.

KYRGIU, M.; KOLIOPOULOS, G.; MARTIN-HIRSCH, P.; ARBYN, M.; PRENDIVILLE, W.; PARASKEVAIDIS, E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 367, n. 9509, p. 489–498, 11 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473126>>.

KYRGIU, M.; MITRA, A.; MOSCICKI, A.-B. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 179, p. 168–182, jan. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524416301098>>.

LACEY, C. J.; LOWNDES, C. M.; SHAH, K. V. Chapter 4: Burden and Management of Non-Cancerous HPV-Related Conditions: HPV-6/11 Disease. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/35-41, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950016>>.

LAZARENKO, L. M.; NIKITINA, O. E.; NIKITIN, E. V.; DEMCHENKO, O. M.; KOVTONYUK, G. V.; GANOVA, L. O. et al. Development of biomarker panel to predict, prevent and create treatments tailored to the persons with human papillomavirus-induced cervical precancerous lesions. **The EPMA journal**, v. 5, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3901026&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LEONG, C.-M.; DOORBAR, J.; NINDL, I.; YOON, H.-S.; HIBMA, M. H. Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. **The British journal of dermatology**, v. 163, n. 6, p. 1253–63, dez. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2010.09968.x>>.

LI, B.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; TAN, G.; ZHANG, W.; ZHANG, N. et al. The value of cytokine levels in triage and risk prediction for women with persistent high-risk human papilloma virus infection of the cervix. **Infectious Agents and Cancer**, v. 14, n. 1, p. 16, 28 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31297140>>.

LI, L.; MA, Y.; LIU, S.; ZHANG, J.; XU, X.-Y. Interleukin 10 promotes immune response by increasing the survival of activated CD8+ T cells in human papillomavirus 16-infected cervical cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 16093–16101, 11 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-016-5466-3>>.

LIN, Y.; RITCHEA, S.; LOGAR, A.; SLIGHT, S.; MESSMER, M.; RANGEL-MORENO, J. et al. Interleukin-17 Is Required for T Helper 1 Cell Immunity and Host Resistance to the Intracellular Pathogen *Francisella Tularensis*. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 799–810, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853481>>.

LUCKHEERAM, R. V.; ZHOU, R.; VERMA, A. D.; XIA, B. CD4⁺T Cells: Differentiation and Functions. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 925135, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474485>>.

LUGO-VILLARINO, G.; MALDONADO-LOPEZ, R.; POSSEMATO, R.; PENARANDA, C.; GLIMCHER, L. H. T-Bet Is Required for Optimal Production of IFN-Gamma and Antigen-Specific T Cell Activation by Dendritic Cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7749–7754, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802010>>.

MANT, C.; KELL, B.; BEST, J. M.; CASON, J. Polymerase chain reaction protocols for the detection of DNA from mucosal human papillomavirus types -6, -11, -16, -18, -31 and -33. **Journal of virological methods**, v. 66, n. 2, p. 169–78, jul. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9255727>>.

MARKS, M. A.; EBY, Y.; HOWARD, R.; GRAVITT, P. E. Comparison of normalization methods for measuring immune markers in cervical secretion specimens. **Journal of immunological methods**, v. 382, n. 1–2, p. 211–5, 31 ago. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002217591200138X>>.

MARKS, M. A.; VISCIDI, R. P.; CHANG, K.; SILVER, M.; BURKE, A.; HOWARD, R. et al. Differences in the concentration and correlation of cervical immune markers among HPV positive and negative perimenopausal women. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 798–803, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015106>>.

MATSUMOTO, K.; OKI, A.; FURUTA, R.; MAEDA, H.; YASUGI, T.; TAKATSUKA, N. et al; JAPAN HPV AND CERVICAL CANCER (JHACC) STUDY GROUP. Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, p. 2065–2073, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20626752>>.

MATTHEWS, K.; LEONG, C. M.; BAXTER, L.; INGLIS, E.; YUN, K.; BÄCKSTRÖM, B. T. et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. **Journal of virology**, v. 77, n. 15, p. 8378–85, ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857907>>.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 18 out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943118>>.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295–298, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363937>>.

MILLER, L. S.; MODLIN, R. L. Human Keratinocyte Toll-like Receptors Promote Distinct Immune Responses. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 2, p. 262–263, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17228303>>.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 10, p. 763–76, 1 out. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd3794>>.

MIRANDA, L. N.; REGINALDO, F. P. S.; SOUZA, D. M. B. O.; SOARES, C. P.; SILVA, T. G. A.; ROCHA, K. B. F. et al. Greater expression of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) and interleukin-17 (IL-17) in cervical intraepithelial neoplasia: analytical cross-sectional study. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 133, n. 4, p. 336–42, 28 out. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802015000400336&lng=en&tlng=en>.

MITRA, A.; MACINTYRE, D. A.; LEE, Y. S.; SMITH, A.; MARCHESI, J. R.; LEHNE, B. et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Scientific reports**, v. 5, p. 16865, 17 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep16865>>.

MOSCICKI, A. B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.; VILLA, L. L. Chapter 5: Updating the Natural History of HPV and Anogenital Cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/42-51, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950017>>.

MURER, P.; NERI, D. Antibody-cytokine fusion proteins: A novel class of biopharmaceuticals for the therapy of cancer and of chronic inflammation. **New Biotechnology**, v. 52, p. 42–53, 25 set. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30991144>>.

MUSTAFA, R. A.; SANTESSO, N.; KHATIB, R.; MUSTAFA, A. A.; WIERCIOCH, W.; KEHAR, R. et al. Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 132, n. 3, p. 259–265, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851054>>.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern Recognition via the Toll-Like Receptor System in the Human Female Genital Tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20396665>>.

NELSON, T. M.; BORGOGNA, J.-L. C.; BROTMAN, R. M.; RAVEL, J.; WALK, S. T.; YEOMAN, C. J. Vaginal biogenic amines: biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis? **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 253, 29 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483694>>.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin Immune Sentinels in Health and Disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 679–691, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19763149>>.

OLVER, S.; APTE, S.; BAZ, A.; KIENZLE, N. The duplicitous effects of interleukin 4 on tumour immunity: how can the same cytokine improve or impair control of tumour growth? **Tissue Antigens**, v. 69, n. 4, p. 293–298, abr. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389011>>.

ORBEGOSO, C.; MURALI, K.; BANERJEE, S. The current status of immunotherapy for cervical cancer. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 23, n. 6, p. 580–588, nov. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534022>>.

OTANI, S.; FUJII, T.; KUKIMOTO, I.; YAMAMOTO, N.; TSUKAMOTO, T.; ICHIKAWA, R. et al. Cytokine expression profiles in cervical mucus from patients with cervical cancer and its precursor lesions. **Cytokine**, v. 120, p. 210–219, ago. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31121496>>.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454–467, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400188>>.

PARADKAR, P. H.; JOSHI, J. V.; MERTIA, P. N.; AGASHE, S. V.; VAIDYA, R. A. Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 15, n. 9, p. 3851–64, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935564>>.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: The Burden of HPV-Related Cancers. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/11-25, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949997>>.

PAVIĆ, N. Is there a local production of nitrosamines by the vaginal microflora in anaerobic vaginosis/trichomoniasis? **Medical hypotheses**, v. 15, n. 4, p. 433–6, dez. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6396500>>.

PEGHINI, B. C.; ABDALLA, D. R.; BARCELOS, A. C. M.; TEODORO, L. das G. V. L.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 920–926, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749886>>.

PIYATHILAKE, C. J.; OLLBERDING, N. J.; KUMAR, R.; MACALUSO, M.; ALVAREZ, R. D.; MORROW, C. D. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 9, n. 5, p. 357–66, 1 maio 2016. Disponível em: <<http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0350>>

PLUMMER, M.; DE MARTEL, C.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; FRANCESCHI, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609–e616, set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470177>>.

RAMOS, M. C.; MARDEGAN, M. C.; PEGHINI, B. C.; ADAD, S. J.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Expression of cytokines in cervical stroma in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after treatment with intralesional interferon alpha-2b. **European journal of gynaecological oncology**, v. 31, n. 5, p. 522–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21061793>>.

SANJABI, S.; ZENEWICZ, L. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 447–453, ago. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489209000502>>.

SATO, Y.; GOTO, Y.; NARITA, N.; HOON, D. S. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenviron**, v. 2 Suppl 1, p. 205–214, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19685283>>.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; DE SANJOSÉ, S.; FAKHRY, C.; MONK, B. J. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16086, 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27905473>>.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. K. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. **JNCI Monographs**, v. 2003, n. 31, p. 14–19, 1 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807940>>.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1, p. S12–S17, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494219>>.

SCOTT, M. E.; SHVETSOV, Y. B.; THOMPSON, P. J.; HERNANDEZ, B. Y.; ZHU, X.; WILKENS, L. R. et al. Cervical cytokines and clearance of incident human papillomavirus infection: Hawaii HPV cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 5, p. 1187–1196, 1 set. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28119>>.

SERRANO, B.; BROTONS, M.; BOSCH, F. X.; BRUNI, L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 14–26, fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29037457>>.

SIM, G. C.; RADVANYI, L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 377–390, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200249>>.

SMITH, J. S.; GREEN, J.; BERRINGTON DE GONZALEZ, A.; APPLEBY, P.; PETO, J.; PLUMMER, M. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9364, p. 1159–67, 5 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686037>>.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M. et al; FORUM GROUP MEMBERS; BETHESDA 2001 WORKSHOP. The 2001 Bethesda System:Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology; **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2114, 24 abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11966386>>.

SONG, D.; LI, H.; LI, H.; DAI, J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. **Oncology letters**, v. 10, n. 2, p. 600–606, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26622540>>.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 1, p. 76–102, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118387>>.

SPRACKLEN, C. N.; HARLAND, K. K.; STEGMANN, B. J.; SAFTLAS, A. F. Cervical surgery for cervical intraepithelial neoplasia and prolonged time to conception of a live birth: a case-control study. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 120, n. 8, p. 960–5, jul. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1471-0528.12209>>.

STANLEY, M. Immune Responses to Human Papillomavirus. **Vaccine**, v. 24 Suppl 1, p. S16-22, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219398>>.

STANLEY, M. A. Immune responses to human papilloma viruses. **The Indian journal of medical research**, v. 130, n. 3, p. 266–76, set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901436>>.

STANLEY, M. A. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491770>>.

STANLEY, M. A.; STERLING, J. C. Host Responses to Infection with Human Papillomavirus. In: **Current problems in dermatology**. v. 45, p. 58–74, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643178>>.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic Dendritic Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 685–711, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615891>>.

STUMBAR, S. E.; STEVENS, M.; FELD, Z. Cervical Cancer and Its Precursors: A Preventative Approach to Screening, Diagnosis, and Management. **Primary care**, v. 46, n. 1, p. 117–134, mar. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009545431830099X>>.

SYRJÄNEN, S.; NAUD, P.; SARIAN, L.; DERCHAIN, S.; ROTELI-MARTINS, C.; LONGATTO-FILHO, A. et al. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 455, n. 6, p. 505–15, 12 dez. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00428-009-0850-7>>.

TELESHEVA, L. F.; DOLGUSHINA, V. F.; ABRAMOVSKIKH, O. S.; ZOTOVA, M. A.; MEZENTSEVA, E. A.; ORNER, I. I. et al. Cytokine status of cervical mucus in women with transitory and persistent course of papillomavirus infection. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 4, p. 118–21, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22937720>>.

TING, J.; KRUIKAS, D. T.; SMITH, J. S. A global review of age-specific and overall prevalence of cervical lesions. **International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 20, n. 7, p. 1244–9, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21495248>>.

TING, J.; ROSITCH, A. F.; TAYLOR, S. M.; RAHANGDALE, L.; SOETERS, H. M.; SUN, X. et al. Worldwide incidence of cervical lesions: a systematic review. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 2, p. 225–241, 30 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24877975>>.

TIRONE, N. R.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Using cytokines to treat cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 5, n. 2, p. 165–9, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961435>>.

TORRES-POVEDA, K.; BAHENA-ROMÁN, M.; DELGADO-ROMERO, K.; MADRID-MARINA, V. A prospective cohort study to evaluate immunosuppressive cytokines as predictors of viral persistence and progression to pre-malignant lesion in the cervix in women infected with HR-HPV: study protocol. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 582, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30453958>>.

TORRES-POVEDA, K.; BURGUETE-GARCÍA, A. I.; BAHENA-ROMÁN, M.; MÉNDEZ-MARTÍNEZ, R.; ZURITA-DÍAZ, M. A.; LÓPEZ-ESTRADA, G. et al. Risk allelic load in Th2 and Th3 cytokines genes as biomarker of susceptibility to HPV-16 positive cervical cancer: a case control study. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 330, 24 maio 2016. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2364-4>>.

TUMMERS, B.; BURG, S. H. Van Der. High-risk human papillomavirus targets crossroads in immune signaling. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2485–506, 21 maio 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/7/5/2485/>>.

VALLE-MENDIOLA, A.; GUTIÉRREZ-HOYA, A.; LAGUNAS-CRUZ, M. del C.; WEISS-STEIDER, B.; SOTO-CRUZ, I. Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 2849523, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2016/2849523/>>.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 11–20, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23769415>>.

VOLPE, E.; SERVANT, N.; ZOLLINGER, R.; BOGIATZI, S. I.; HUPÉ, P.; BARILLOT, E. et al. A Critical Function for Transforming Growth Factor-Beta, Interleukin 23 and Proinflammatory Cytokines in Driving and Modulating Human T(H)-17 Responses. **Nat Immunol**, v. 9, n. 6, p. 650–657, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454150>>.

WEI, L.; GRIEGO, A. M.; CHU, M.; OZBUN, M. A. Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 10, p. 2373–2381, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25064354>>.

WIRA, C. R.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.; PATEL, M. V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 217–230, 6 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743222>>.

WOO, Y. L.; VAN DEN HENDE, M.; STERLING, J. C.; COLEMAN, N.; CRAWFORD, R. A. F.; KWAPPENBERG, K. M. C. et al. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. **International journal of cancer**, v. 126, n. 1, p. 133–41, 1 jan. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24804>>.

XUE, J.; WANG, Y.; CHEN, C.; ZHU, X.; ZHU, H.; HU, Y. Effects of Th17 cells and IL-17 in

the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 2, p. 297–306, fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29277958>>.

ZHU, J.; GUO, L.; WATSON, C. J.; HU-LI, J.; PAUL, W. E. Stat6 Is Necessary and Sufficient for IL-4's Role in Th2 Differentiation and Cell Expansion. **J Immunol**, v. 166, n. 12, p. 7276–7281, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390477>>.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–69, 1 set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725574>>.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–5, 20 fev. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682208007721>>.

ANEXOS

ANEXO A:

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL INTRALESIONAL DE CITOCINAS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS DE BAIXO E ALTO GRAU DO TRATO GENITAL INFERIOR

Pesquisador: Caetano Galvão Petrini

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43544114.9.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.071.278

Data da Relatoria: 20/05/2015

Apresentação do Projeto:

Dentre os fatores relacionados infecção persistente pelo HPV, a imunidade do hospedeiro parece ser relevante. Assim, as citocinas produzidas pelas células de defesa estão envolvidas na resposta sistêmica e local tornam-se importantes para a completa compreensão da resposta imune ao HPV.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como principal objetivo comparar a concentração das citocinas Th1 (IL-12, INF), Th2 (IL-2, IL-4), Th17 (IL-23, IL17) e Treg (IL-10) no sangue e trato genital inferior de mulheres com e sem LIE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: riscos mínimos relacionados à biópsia de colo uterino e à coleta de sangue.

Benefícios: conhecimento sobre do perfil imune ao hpv no trato genital feminino.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A infecção persistente pelo HPV está relacionada ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e carcinoma invasor do epitélio do trato genital inferior. Dentre os fatores que podem influenciar a persistência da infecção viral, a falha da resposta imune do hospedeiro parece ser relevante. Mulheres que não apresentam uma resposta imune mediada por células adequada têm maior probabilidade de desenvolver infecções persistentes levando assim a lesões de alto grau. A

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 1.071.278

infecção pelo HPV está associada a uma regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas e de moléculas de processamento e apresentação de antígenos, o sistema imunológico sistêmico e local desempenham papel importante, mas ainda não totalmente conhecido. As citocinas produzidas pelas células de defesa estão envolvidas nesta resposta e nem sempre os níveis plasmáticos destas substâncias se correlacionam com nível de citocinas na mucosa cervical, por isso estudos que avaliam a resposta imune

sistêmica e local tornam-se importantes para a completa compreensão da resposta imune ao HPV. O objetivo deste estudo é avaliar o padrão de resposta imune sistêmica e local no trato genital inferior de mulheres com lesão intraepitelial de baixo (LIEBG) e de alto grau (LIEAG). Para cumprir este objetivo será realizado um estudo observacional analítico caso controle quantificando as citocinas pró e anti-inflamatórias no sangue e no trato genital inferior de mulheres com LIE, comparando com as dosagens destas substâncias em um grupo controle. Serão coletados fragmentos de biópsias com pinças de Medina modificada, somente da área de transformação anormal de colo uterino ou vaginal e/ou vulvar de pacientes que apresentarem alterações colposcópicas maiores ou menores. Para dosagem das citocinas, no sangue e no epitélio do trato genital inferior será realizado o Método ELISA Luminex.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2 de 18/05/2015, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 de 18/05/2015, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

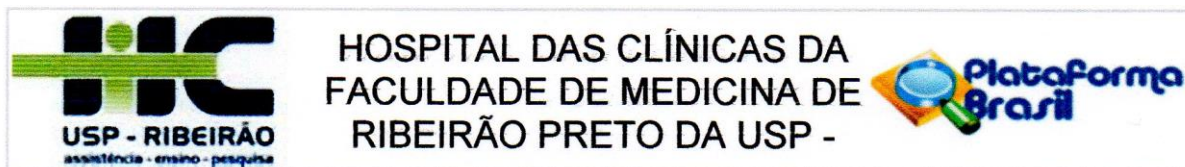
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.071.278

forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 25 de Maio de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO B:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da paciente:.....

Data de Nascimento / Idade:.....

Registro HC e/ou documento de identificação:

.....

**NOME DA PESQUISA: PERFIL INTRALESIONAL DE CITOCINAS EM LESÕES
INTRAEPITELIAIS DE BAIXO E ALTO GRAU DO COLO UTERINO**

IDENTIFICAÇÃO DA EQUIPE MÉDICA:

Pesquisador Responsável:

Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Quintana

Fones: (016) 36022804, 36022587

Pesquisadores envolvidos: Dr. Caetano Petrini, Prof Dr. Geraldo Duarte, Prof^a Dr^a. Aparecida Yulie Yamamoto, Dr^a. Patricia Pereira dos Santos Melli, Paula Rahal

Você está sendo convidada a participar da pesquisa **PERFIL INTRALESIONAL DE CITOCINAS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS DE BAIXO E ALTO GRAU DO COLO UTERINO** e declaro que em/...../..... fui devidamente informada, em detalhes, pela médica responsável que:

1- O estudo implica em que eu me submeta a exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

“Você apresenta uma lesão no colo do útero (vagina e/ou vulva) que é causada pelo papiloma vírus humano. Durante o seu acompanhamento neste serviço, você realizará exames que definirão se esta lesão apresenta baixo risco de progredir para câncer ou se tem maior risco de evoluir para câncer. A conduta a ser tomada pela equipe de assistência dependerá destes exames, que deverão ser realizados independentemente desta pesquisa. O objetivo desta pesquisa é avaliar

como seu organismo responde a infecção que o papiloma vírus humano causa. Esta avaliação será realizada de duas formas: pela dosagem no seu sangue de substâncias envolvidas nas defesas do organismo humano. Para isto será colhido 5ml de sangue por meio de punção de uma veia (tirar sangue) que será realizada durante a coleta de exames que são solicitados de rotina. A outra forma é dosar estas substâncias no material retirado por biópsia da lesão no colo do útero (vulva e/ou vagina). Estes exames fazem parte da rotina do ambulatório de moléstias infectocontagiosas onde você faz o seguimento e serão coletados de rotina mesmo que você não deseje participar do estudo, porém o compromisso é que neste caso os dados não farão parte da pesquisa.

2- Você será submetida a exame ginecológico de rotina e se visualizado lesão, será retirado um pequeno fragmento para avaliação anatomopatológica (avaliação no microscópio) e para pesquisa. Este procedimento se chama biópsia e pode causar um pequeno desconforto durante a realização e sangramento discreto após sua realização, devendo-se evitar ter relação sexual no dia do procedimento. Não serão necessários exames adicionais para obtenção do material para pesquisa e a coleta do material não oferecerá risco adicional ao procedimento que já seria realizado.

3- Você não terá gastos adicionais para o tratamento de sua lesão em decorrência da obtenção do material para pesquisa e não receberá pagamento pela participação no estudo.

4- Você pode retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do projeto, sem que isso traga prejuízo à continuação do seu tratamento. Nós garantimos que você continuará sendo tratada como as demais pacientes do Hospital das Clínicas.

5- Os pesquisadores garantem que responderão qualquer pergunta e esclarecerá qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa e ao tratamento indicado para você.

6- Os pesquisadores se comprometem a proporcionar a você informações atualizadas durante o estudo, garantindo acesso aos resultados da pesquisa, ainda que estas possam afetar a sua vontade de continuar participando da pesquisa.

7- Os pesquisadores se comprometem a manter o sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente.

8- Participando desta pesquisa as pacientes estarão contribuindo para aprimorar os conhecimentos médicos, bem como aprimorar as condutas no seguimento das lesões causadas pelo HPV.

9- Todo material que for coletado será congelado e posteriormente analisado. Caso seja necessário, outras dosagens poderão ser realizadas neste material.

10- Você receberá uma via deste Termo de Consentimento assinado e rubricado em todas as páginas, por você e pelo pesquisador responsável.

Tenho ciência do exposto acima e desejo participar da pesquisa da médica que subscreve o documento.

Ribeirão Preto,

Nome do participante:

assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador:

assinatura: _____ data: _____

Para dúvidas éticas:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO Bairro: MONTE ALEGRE, CEP: 14.048 900
UF: SP, Município: RIBEIRAO PRETO Telefone: (16) 3602-2228, Fax: (16)3633-1144

ANEXO C:

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Eu, Silvana Maria Quintana , responsável pelo biorrepositório Banco de amostras do trato genital inferior de mulheres participantes da pesquisa “PERFIL INTRALESIONAL DE CITOCINAS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS DE BAIXO E ALTO GRAU DO TRATO GENITAL INFERIOR” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de biópsias do trato genital inferior para que possam ser utilizadas em pesquisas futuras, referente ao Projeto de pesquisa “PERFIL INTRALESIONAL DE CITOCINAS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS DE BAIXO E ALTO GRAU DO TRATO GENITAL INFERIOR” , gostaria de convidá-la para guardar a sua amostra de biópsia do trato genital inferior para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. A senhora também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Este material será coletado durante o exame ginecológico, sendo realizado por biópsia de lesões do trato genital inferior, guiada por genitoscopia. Após coletado será guardado em tubo de Eppendorf que será mantido congelado à -20 °C.

Eu, como responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de tecido será identificada por meio de registro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Quanto à coleta de material, serão coletadas duas amostras do tamanho de um grão de arroz. Em decorrência da coleta poderá ocorrer sangramento vaginal discreto, que geralmente é autolimitado e uma das amostras será encaminhada para análise anatomopatológica, que definirá qual o tipo de lesão que a senhora possui.

Solicitamos também os dados de contato da senhora, para que seja possível encontrá-la posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos autorização, caso seja

necessário, para o descarte do material armazenado em caso de danificação do material, tornando-o impróprio para a análise.

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____, bairro _____,
cidade _____, telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua amostra de material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade da Dr^a Silvana Maria Quintana, para fins de pesquisa e análise científica. **Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhora.**

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso a senhora tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, a senhora também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Quintana

Telefone para contato: (016) 3602-2804, 3602-2587

Assinatura: _____ Data: _____

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ Data: _____

ANEXO D:

PROTOCOLO DE PESQUISA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS SEMIGO

AMBULATÓRIO MOLÉSTIAS INFECTO-CONTAGIOSAS EM GINECOLOGIA (AMIG)-HCFMRPUSP

Data: _____

Examinador: _____

Orientador: _____

1) IDENTIFICAÇÃO:Nome: _____ Registro: _____ Data
nascimento: _____

Endereço: _____ Fone: _____

Cor: branca preta amarela pardaEstado civil: casada solteira viúva desquitada amasiadaNº anos estudados: analfabeta 1-4 4-8 9-12 >12/3º grau/técnicoProfissão: estudante doméstica do lar profissional sexo outra _____**2) ANTECEDENTES GINECOLÓGICOS E OBSTÉTRICOS:**

Menarca: _____ Idade 1ª relação sexual: _____ Idade na 1ª gestação: _____

Gesta: ____ Para: ____ Aborto: ____ Nº partos vaginais: ____ Nº cesáreas: ____ Nº filhos vivos: ____

Nº total parceiros sexuais: ____ Nº parceiros sexuais último ano: ____ Prostituição: não simOrientação sexual: homossexual heterossexual bissexualPassado DST: Não Sim sífilis gonorréia clamídia HPV tricomonas
 hepatite B Hepatite C herpes HIV outra: _____DIP: Não Sim CAUTERIZAÇÃO: Não Sim TATOO: Não Sim CIRURGIA: NÃO SIM
Qual: _____**3) ANTECEDENTES PESSOAIS:**Uso de drogas: Não Sim Qual: maconha cocaína heroína crack outra: _____Via: fumo inalação EV outra: _____Presidiária: Não SimTabagismo: Não Sim <10 cigarros/dia 10-20/dia >20/dia

Alcoolismo: Não Sim cachaça cerveja uísque outros _____

Doenças sistêmicas: Não Sim HAS DM HIV LES, transplantadas,QT)
 outras: _____

Sorologias: ELISA anti HIV: negativa não realizada diag na gravidez positiva <1ano 1-5a
 >5a

ELISA HBsAg: negativa não realizada diag na gravidez positiva

ELISA anti HCV: negativa não realizada diag na gravidez positiva

VDRL/RPR: negativo não realizado diag na gravidez positivo

4) DADOS DO PARCEIRO (ATUAL OU ANTERIOR)

Sorologia anti HIV: Positiva Negativa Não sabe

Passado DST Não Sim sífilis gonorréia HPV tricomonas hepatite B Hepatite C
 herpes

Orientação sexual: homossexual heterossexual bissexual heterossexual hiperativo

Alcoolismo: Não Sim **Uso de drogas:** Não Sim **Tabagismo:** Não Sim

Tatuagem: Não Sim **Presidiário:** Não Sim

5) DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA: Não Sim

6) PACIENTE JÁ TINHA OUVIDO FALAR DE HPV: Não Sim Revista jornal TV
 médico amiga

7) PACIENTE SABIA QUE HPV TINHA RELAÇÃO COM CÂNCER DE COLO: Não Sim

8) PACIENTE SABIA TRANSMISSÃO SEXUAL DO HPV: Não Sim

9) MOTIVO DA CONSULTA:

grávida não grávida

HIV+ citologia alterada colposcopia alterada biópsia condiloma vulvar condiloma vaginal
 condiloma cervical condiloma perianal HPV NIC 1 NIC1-6m

NIC1-12m NIC2 NIC3 Pós-CAF-7d Pós-CAF-3m Pós-CAF-6m Pós-CAF-9m

Pós-CAF-12m Pós-CAF-18m Pós-CAF-24m Pós-CAF >24m Pós-Laser

vitimizada prurido corrimento ectopia herpes outras _____

DUM: _____ MAC: nada condom ACHO DIU ACHI LT vasectomia

10) EXAME GINECOLÓGICO: GENITOSCOPIA

colposcopia satisfatória – local JEC: -3 -2 -1 zero +1 +2 +3

colposcopia insatisfatória : JEC não visual atrofia inflamação colo não visualizado

Achados Normais: Ep. Estrat. Escamoso Ep. Cilíndrico ZTN-UG: -3 -2 -1 0

Achados Anormais: ZTA-UG: -3 -2 -1 zero +1 +2 +3

dentro ZT fora ZT MENORES MAIORES

EAB fino EAB grosseiro OGA espessados

mosaico regular mosaico irregular

pontilhado regular pontilhado irregular

iodo negativo vasos atípicos

Teste do IODO: iodo positivo iodo negativo iodo malhado não realizado

Achados vários: condiloma erosão atrofia leucoplasias inflamação pólipos outros: _____

Achados sugestivos invasão: vasos atípicos erosão tecido cerebróide outros: _____

Vaginoscopia: sem lesão lesão clínica lesão subclínica 1/3 superior 1/3 médio
 1/3 inferior

parede lateral D parede lateral E parede anterior parede posterior fundo saco posterior
 fundo saco anterior fundo saco lateral D fundo lateral E

Vulvosscopia: sem lesão lesão clínica lesão subclínica 1/3 superior 1/3 médio 1/3 inferior

monte de vênus grande lábio D grande lábio E pequeno lábio D pequeno lábio E

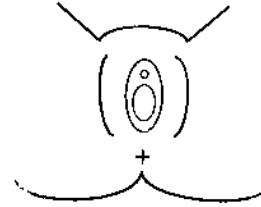
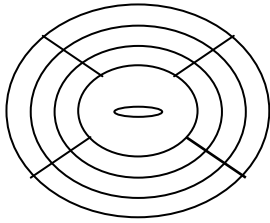
sulco interlabial D sulco interlabial E intróito vaginal carúnculas períneo clitóris
 uretra

região perianal sulco interglúteo região inguinal D região inguinal E

HD colposcópica: ACN ACA Menores ACA MAIORES

Achados vários Achados sugestivos invasão Lesão vaginal baixo grau Lesão vaginal alto grau Lesão vulvar baixo grau lesão vulvar alto grau Condilomatose genital

Biópsia: NÃO SIM LA colo LP colo vagina vulva anal
hora: _____



ÍNDICE COLPOSCÓPICO DE REID

Margem da lesão:

- **zero:** condiloma/contorno micropapilar bordos indefinidos bordos serrilhados ou geográfico
 lesões satélites
- **1 ponto:** bordos tênues, regulares ou retos bordos bem definidos
- **2 pontos:** "peeling" margens internas

Cor da lesão:

- **zero:** brilhante, branco neve branco tênue, translúcido
- **1 ponto:** branco intermediário
- **2 pontos:** acinzentado escuro (cinza esbranquiçado e superfície brilhante) branco opaco/acetorreação persistente

Vasos:

- **zero se:** mosaico fino, regular pontilhado fino, regular capilares finos
- **1 ponto se:** vasos não visualizados
- **2 pontos se:** mosaico grosseiro pontilhado grosseiro vasos atípicos

Subtotal: M,C,V= _____

Coloração pelo iodo:

- zero se: iodo positivo iodo negativo área com alteração menor (≤ 3) iodo negativo fora ZT

- 1 ponto se: iodo malhado, tigróide parcial, casco de tartaruga
- 2 pontos se: iodo negativo de lesão maior (≥ 3 p)

Classificação total: LIEBG (___) LIEAG (___)

11) CITOLOGIA TRÍPLICE: Não Sim fora HC HC

satisfatória satisfatória mas limitada insatisfatória BD inflamatória cândida
 vaginose tricomonas cocos HPV ASCUS AGUS NIC 1 NIC 2 NIC 3 NIVA 1
 NIVA 2 NIVA 3

Ca Microinvasor Ca invasor Adenocarcinoma

12) AP: Não Sim fora HC HC

CCI HPV Condiloma NIC 1 NIC 2 NIC 3 NIVA 1 NIVA 2 NIVA 3 NIV 1
 NIV 2 NIV 3 NIA 1 NIA 2 NIA 3 Ca Microinvasor Ca invasor Adenocarcinoma

13) PCR: Não Sim negativa positiva alto grau baixo grau

14) TRATAMENTO: expectante cone com CAF cone a frio LLETZ

LASER EC ATA 80% Podofilotoxina (Wartec 0,5%) Imiquimod (Aldara)
 5FU TDF

15) MARGENS DA PEÇA CIRURGICA

LIVRES ECTO LIEBG ECTO LIEAG ENDO LIEBG ENDO LIEAG