

INFLUÊNCIA DO HPV-16 SOBRE A PRODUÇÃO INTRALESIONAL DE IL-10 EM MULHERES IMUNOGENETICAMENTE RESPONSIVAS E PORTADORAS DO HIV-1

INFLUENCE OF THE HPV-16 ON IL-10 INTRALESIONAL PRODUCTION IN IMMUNOGENETICALLY RESPONSIVE WOMEN CARRYING HIV-1 INFECTION

MENÇÃO HONROSA – PRÊMIO MELHOR TRABALHO COMPLETO, CATEGORIA: LABORATÓRIO

Ana Paula M Fernandes¹, Maria Alice G Gonçalves², Renata T Simões²,
Silvana Maria Quintana³, Geraldo Duarte⁴, Eduardo A Donadi⁵

RESUMO

Introdução: a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) do tipo 16, constitui importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Citocinas são importantes na resposta imune contra infecções virais. Geneticamente determinadas, podem apresentar predomínio para padrão associado com a eliminação do HPV, ou associadas com a persistência da infecção e progressão para lesões cervicais, como a interleucina 10 (IL-10). Além disso, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1), parece ser uma co-morbidade para o desenvolvimento das lesões cervicais. **Objetivo:** avaliar a influência da infecção pelo HPV-16 sobre fatores imunogenéticos associados à produção da citocina imunoinibitória IL-10, em mulheres infectadas pelo HIV-1 e apresentando lesões cervicais. **Método:** foram avaliadas biópsias de lesões cervicais de 42 mulheres (20 portadoras do HIV-1 e 22 não). A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para identificação do HPV-16 e do polimorfismo da IL-10. Níveis intralesionais de IL-10 foram dosados por ELISA. **Resultado:** independentemente da infecção pelo HIV-1, pacientes infectadas com o HPV-16, portadoras de alelos associados à baixa produção da IL-10, apresentaram níveis intralesionais significativamente maiores da IL-10 quando comparados com as pacientes que não possuíam o HPV-16 ($p = 0,01$). **Conclusão:** a presença do HPV-16, independentemente da co-morbidade determinada pela infecção pelo HIV-1, parece ser um importante fator para a instalação e progressão das lesões cervicais, devido à presença de respostas permissivas, com níveis aumentados de IL-10, mesmo naquelas mulheres que imunogeneticamente estão predispostas a respostas que as protegeriam de instalação e progressão de lesões precursoras do câncer cervical.

Palavras-chave: HPV, lesões cervicais, HIV, IL-10, citocina, polimorfismo de citocina

ABSTRACT

Introduction: Infection with human papillomavirus 16 (HPV 16) is considered to be the major risk factor for cervical cancer development. Cytokines play an important role in the defense against viral infection. Such differences may be attributed to genetically determined molecular mechanisms including variations in transcription, translation and secretion pathways. Genetically determined, has been predominance of Th1 polarization, associated with the clearance of HPV infection or, in contrast, with immunosuppressive cytokines associated with persistence of HPV infection and progression to cervical lesions, as interleukine 10 (IL-10). Furthermore, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection is co morbidity to cervical lesions development. **Objective:** to further evaluate the HPV16 infection influence on immunogenetic factors associated with IL-10 immunoinhibitory cytokine production levels in women presenting with HIV infection and squamous intraepithelial lesions. **Method:** cross-sectional study ($n = 42$ cervical biopsies from 22 HIV - and 20 HIV +). Cytokine polymorphism, and HPV detection and typing were performed using amplified DNA hybridized with sequence specific primers, and cytokine intralesional levels were detected using ELISA. **Result:** independence of HIV infection, women HPV16 infected presenting with low production allele associated with IL-10 exhibited increased intralesional levels of IL-10 compared to HPV16 negative women ($p = 0,01$). **Conclusion:** presence of HPV16 infection, irrespective of co morbidity of the HIV-1 infection, may predispose to cervical lesion installation and progression, due the presence of permissive response, with increased IL-10 levels, inclusive among women with immunogenetically responsive to installation and progression cervical lesions to cervical cancer.

Keywords: HPV, cervical lesion, HIV, IL-10, cytokine, cytokine polymorphisms

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 16(3):67-72, 2004

INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que o câncer do colo do útero seja a terceira neoplasia mais comum na população feminina, de acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA). Segundo dados do Ministério da Saúde, essa neoplasia foi responsável pela morte de 3.953 mulheres no Brasil em 2002. Em 2003, estimativas apontaram para 16.480 novos casos e 4.110 óbitos em decorrência dessa doença¹. Como visto, a neoplasia do colo uterino ainda é um sério problema de saúde pública em nosso país.

DST – J bras Doenças Sex Transm 16(3):67-72, 2004

¹ Prof^a. Doutora do Departamento de Enfermagem Geral e Especializada, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP.

² Pós-Doutoranda do Departamento de Clínica Médica, Divisão de Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

³ Médica Assistente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

⁴ Prof Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

⁵ Prof. Associado do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Fonte financiadora: FAPESP (97/04490-8 e 01/02908-2).

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), lesões precursoras do câncer do colo uterino²⁻⁴. Entretanto, a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) é aceita como o fator mais fortemente associado à progressão das lesões cervicais para neoplasia⁵.

De acordo com o potencial oncogênico, os HPV podem ser classificados em HPV de baixo ou de alto risco. Os HPV de alto risco, a exemplo do tipo 16, são detectados em cerca de 50-80% das lesões de alto grau (NIC-II e NIC-III), e em cerca de 99,7% dos casos de câncer invasor do colo uterino².

O papel da imunidade local para controlar a infecção pelo HPV e o subsequente desenvolvimento das lesões cervicais é mostrado, indiretamente, pela frequência aumentada de lesões associadas às infecções pelo HPV em pacientes que apresentam imunidade celular reduzida^{7,8}, como ocorre na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).

Avaliações da produção de citocinas por linfócitos T do sangue periférico têm sido realizadas em mulheres apresentando a infecção pelo HPV, portadoras de lesões cervicais de vários graus de gravidade, sugerindo que o desenvolvimento das lesões cervicais está associado, preferencialmente, ao padrão local de citocinas imunoinibitórias, como a interleucina 10 (IL-10) e não a um padrão de resposta imune pró-inflamatória, que seria mais apropriada contra infecções virais e tumores⁹⁻¹⁵.

Sabe-se que existem três polimorfismos nucleotídicos únicos (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) descritos na região promotora do gene da IL-10, nas posições –1082, –819 e –592. A presença da base nitrogenada A na posição –1082 foi correlacionada com baixa produção da IL-10 após estimulação de células T *in vitro*¹⁵. Este polimorfismo do gene da IL-10 parece ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos da região promotora podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL-10¹⁶. A capacidade de secretar diferentes níveis de citocinas, herdadas geneticamente, parece ser relevante na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese das lesões cervicais¹⁷. No entanto, são raros os estudos avaliando o polimorfismo de citocinas nas lesões cervicais^{18,19}.

Estudo avaliando o polimorfismo da IL-10 mostrou que pacientes com câncer cervical parecem estar imunogeneticamente predispostos a produzir altos níveis da IL-10. Além disso, foi observado que a prevalência de alelos associados à baixa produção foi menor no grupo de pacientes com câncer cervical quando comparados com o de mulheres saudáveis, no qual não foram observados alelos para alta produção. Estes resultados sugerem que a habilidade, geneticamente determinada, de produzir altos níveis da IL-10 pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer cervical²⁰.

OBJETIVO

Frente a estas considerações, este estudo tem o objetivo de avaliar, em mulheres apresentando NIC, com ou sem a infecção pelo HIV-1, a influência da infecção pelo HPV-16 sobre a produção da IL-10 associada a fatores imunogenéticos.

MÉTODO

Foram avaliadas 42 mulheres com idade variando entre 16 e 46 anos, apresentando NIC de baixo e alto grau, sendo 20 (47,6%) portadoras e 22 (52,4%) não-portadoras da infecção pelo HIV-1. As pacientes foram selecionadas no Setor de Moléstias Infecto-Contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP).

Aspectos éticos

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRPUSP, sob o número 6597/2001. Foram selecionadas apenas aquelas pacientes que concordaram em participar do estudo após serem informadas dos objetivos da pesquisa, com a garantia de anonimato, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

Colheita das amostras

Foram colhidos, no mesmo dia da realização da biópsia, 10 mL de sangue venoso periférico de cada paciente, em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA), contendo EDTA K3 (0,054 mL/tubo), para extração de DNA e posterior tipificação do polimorfismo da IL-10.

Os fragmentos cervicais foram obtidos a partir de biópsias cervicais, colposcopicamente dirigidas, de pacientes com indicação clínica deste procedimento para complementação diagnóstica de NIC diagnosticada pelo esfregaço citológico. Estas amostras foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e mantidas a -70°C até serem processadas. O DNA genômico extraído foi usado para a detecção da infecção e tipagem do HPV.

Extração de DNA e proteínas

O DNA genômico, utilizado para tipificação do polimorfismo da IL-10, foi isolado das células linfomononucleadas do sangue periférico pelo método de *salting out* previamente descrito²¹.

A extração do DNA viral e das proteínas nas amostras cervicais, para detecção da infecção pelo HPV, tipagem viral e quantificação dos níveis intralésionais da IL-10, foram realizadas utilizando Trizol® (Gibco, MD, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

Tipificação e detecção do HPV

O DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando 12,5 pM de cada dNTP, 25 pM de cada iniciador, 1,5 U de DNA Taq polimerase (BioTools-Spain), 5 µL de 10X tampão de enzima, 20 µg de DNA genômico e H₂O destilada deionizada até completar o volume total de 25 µL. A mistura foi processada

em termociclador (MJ Research, MA, USA) nas seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo a 94° C por 5 min, 35 ciclos de 94° C por 1 min seguido de 55° C por 40 s e 72° C por 40 s, uma extensão de 72° C por 10 min e, finalmente, 4° C indefinidamente.

Foram utilizados diferentes pares de iniciadores. Os iniciadores GP5 e GP6²² (que amplificam pequenos fragmentos de DNA) e os iniciadores MY09 e MY11²³ (que amplificam fragmentos maiores de DNA) foram utilizados para a amplificação e detecção genérica do HPV. Os iniciadores HPV16E7.667/HPV16E7.774, específicos para o HPV-16, também foram utilizados²⁴.

Os fragmentos de DNA amplificados foram aplicados em gel de poli-acrilamida a 10%, submetidos à eletroforese a 200 mA por duas horas e marcados com AgNO₃²⁵.

Quantificação dos níveis intralesionais da IL-10

Para quantificar os níveis intralesionais da IL-10 utilizou-se o método imunoenzimático (ELISA) através de anticorpos monoclonais humanos específicos para IL-10 revelados pela reação biotina-avidina-peroxidase, descrito por Fernandes *et al.*²⁶. Para a realização destes experimentos, foram colocados 50 µL de anticorpos humanos monoclonais específicos para IL-10 (na concentração de 2 µg/mL) em todos os poços da placa de poliestireno (Nunc, EUA), imediatamente tampada e incubada *overnight* em 4° C. Após este período, a placa foi lavada manualmente por quatro vezes, adicionando 200 µL de PBS/Tween 0,05% (Sigma, EUA). Em seguida, foram adicionados à solução de bloqueio, 100 µL de albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, EUA), permanecendo por uma hora em temperatura ambiente e submetida à lavagem. Após este procedimento, foram adicionados, em cada unidade de reação (poço da placa), 50 µL de citocina-padrão, em concentrações conhecidas, utilizadas no preparo da curva-padrão e 50 µL das amostras a serem avaliadas, obtidas a partir de peças de biópsias. Logo em seguida, a placa foi vedada e incubada *overnight*, a 4° C, para que ocorresse a interação antígeno-anticorpo. Foram utilizadas citocinas recombinantes humanas na construção da curva-padrão (Pharmlingen, EUA), diluídas em tampão Tween e preparadas numa concentração inicial de 2.000 pg/mL e, posteriormente, diluídas logaritmicamente em base dois, até atingir 0,1 pg/mL. Por último, colocou-se o controle negativo (tampão). Após este período de incubação, a placa foi novamente lavada por quatro vezes e, logo em seguida, adicionados 50 µL do anticorpo de detecção biotinilado (Pharmlingen, EUA). A diluição desse anticorpo foi realizada utilizando a solução Tween na concentração de 0,5 µg/mL. A incubação por uma hora em temperatura ambiente foi realizada, seguida pela lavagem e adição de 100 µL da solução contendo o conjugado

avidina-peroxidase (SAV-HRP, Dako, Dinamarca) diluída em 1:5.000. Após 30 minutos, foram adicionados 100 µL do reagente colorido (solução substrato OPD – o-fenilenodiamina dihidroclorido), fabricado pela Sigma (EUA), na concentração de 10 mg/mL contendo H₂O₂. As placas foram mantidas no escuro, na temperatura ambiente por 15-20 minutos ou até que a coloração amarela da curva padrão fosse visibilizada. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL da solução de bloqueio (H₂SO₄ – 1M), fabricado pela Merck (EUA). A densidade óptica nas placas foi determinada pela leitura em espectrofotômetro a 490 nm (Spectra Max 250, EUA), e as concentrações das citocinas foram determinadas, a partir da curva-padrão, pelo programa *Soft Max Pro* (Molecular Devices, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

Tipificação do polimorfismo de IL-10

O DNA genômico, obtido a partir de células do sangue periférico, foi amplificado por intermédio da reação em cadeia da polimerase, utilizando iniciadores seqüência-específicas, com *kits* da One Lambda (EUA). A **Tabela 1** mostra os polimorfismos nucleotídicos únicos na região promotora do gene da IL-10 correlacionado com os níveis de produção, na posição –1082.

Inicialmente, foi acrescentado 1 µL do diluente do DNA (H₂Odd) na unidade de reação referente ao controle negativo. Em seguida, foi acrescentado 1 µL da Taq-polimerase (Gibco, EUA) (5 U/µL) ao tubo contendo o D-mix (180 µL), agitando-se vigorosamente por cinco segundos. Desta solução foram retirados 9 µL e acrescentados à unidade de reação do controle negativo. Na seqüência, foram acrescentados 19 µL de solução contendo DNA, na concentração de 100 ng/µL, à solução D-mix/Taq-polimerase, sendo, então, agitada vigorosamente por cinco segundos. Foram, então, pipetados 10 µL desta solução em cada unidade de reação contendo os iniciadores seqüência-específicas, exceto a unidade do controle negativo. Esse material foi colocado no termociclador (PE-9600, Perkin-Elmer, EUA) para amplificação do DNA, que ocorreu em três etapas. Inicialmente, a amostra era aquecida a 96° C, por dez segundos. A seguir, a reação foi resfriada a 59° C, por 50 segundos. Por fim, a reação era aquecida a 72° C, por 30 segundos. No total foram realizados 30 ciclos de amplificação e a presença dos produtos de amplificação foram detectados em gel de agarose a 2%, submetidos à eletroforese em 170 V por 5 min, sob marcação com brometo de etídio.

Tabela 1 – Associação entre genótipo e fenótipo de produção da IL-10.

Polimorfismo	Genótipo	Fenótipo de produção
IL-10 (-1082)	GCC/GCC GCC/ACC, GCC/ATT ACC/ACC, ACC/ATA, ATA/ATA	Alto Intermediário Baixo

Análise estatística

Para a avaliação estatística utilizou-se o teste de Mann-Whitney, considerando significantes as diferenças cujo $p < 0,05$.

RESULTADO

Polimorfismo da IL-10 e status da infecção pelo HPV-16 e HIV-1

A avaliação com a reação em cadeia da polimerase determinou que todas as pacientes deste estudo eram portadoras da infecção pelo HPV. Destas, 26/42 (62,0%) apresentavam infecção cervical pelo HPV-16. Relativo ao polimorfismo da IL-10, 18/42 (43,0%) pacientes apresentavam alelos associados à baixa produção, 19/42 (45,0%) tinham alelos para produção intermediária e 5/42 (12,0%) possuíam alelos associados à alta produção da IL-10. A presença da infecção cervical pelo HPV-16 foi detectada em 12/26 (46,0%) das pacientes portadoras de alelos associados com a baixa produção da IL-10, 11/26 (42,0%) para produção intermediária e 3/26 (12,0%) para a alta produção da IL-10. Das pacientes portadoras da infecção pelo HIV-1, 10/20 (50,0%) apresentavam alelos de baixa produção para IL-10, 7/20 (35,0%) para produção intermediária e 3/20 (15,0%) para a alta produção. A **Tabela 2** mostra estes resultados.

Tabela 2 – Caracterização das pacientes portadoras de lesões cervicais estratificadas de acordo com o polimorfismo associado com diferentes níveis de produção da IL-10 e *status* da infecção pelo HPV-16 e HIV-1.

Infecção pelo HIV Polimorfismo da IL-10	HPV-16		TOTAL n (%)
	Sim HIV-1 n (%)	Não HIV-1 n (%)	
Baixa produção	5 (27,8%)	7 (38,9%)	18 (100,0%)
Intermediária produção	4 (21,1%)	7 (36,8%)	19 (100,0%)
Alta produção	3 (60,0%)	0 (0%)	5 (100,0%)
Total	12 (28,7%)	14 (33,3%)	42 (100,0%)

Tabela 3 – Níveis intralésionais (mediana) da IL-10 de acordo com o polimorfismo associado aos diferentes níveis de produção da IL-10 em pacientes estratificadas de acordo com o *status* da infecção pelo HIV-1 e HPV-16.

Polimorfismo da IL-10	Infecção pelo HIV-1		Infecção pelo HPV-16	
	Ausente pg/mL (variação)	Presente pg/mL (variação)	Ausente pg/mL (variação)	Presente pg/mL (variação)
Baixa produção	786 (0-7816)	203 $p > 0,99$ (0-6716)	0 (0-1586)	2840 (0-7816)
Intermediária produção	3228 (0-8304) $p = 0,77$	3405 (0-6764)	1571 (0-8304) $p = 0,84$	4936 (0-6764)
Alta produção	0 (0)	5453 (5213-5692) **	0 (0)	5453 (5213-5692) **

*Mann-whitney ($p \leq 0,05$).

** Número insuficiente de casos.

DST – J bras Doenças Sex Transm 16(3): 67-72, 2004

Associação entre polimorfismo e níveis intralésionais da IL-10

Pacientes infectadas pelo HPV-16, portadoras de polimorfismos associados à baixa produção da IL-10, apresentaram níveis intralésionais significativamente maiores da IL-10 quando comparados com os de pacientes que não possuíam infecção pelo HPV-16, independentemente da infecção pelo HIV-1 ($p = 0,01$). A **Tabela 3** ilustra tais resultados.

DISCUSSÃO

As citocinas têm papel importante na defesa do organismo contra infecções virais, indiretamente, na determinação do padrão de resposta imune deflagrada ou diretamente pela inibição da replicação viral²⁷. Tem sido descrito que na presença de respostas imunes contra o HPV, com predomínio para o padrão de citocinas imunoinibitórias, seja na região cervical ou na circulação periférica, um ambiente favorável para transformações neoplásicas se desenvolve, permitindo a progressão das lesões cervicais para o câncer cervical^{28,29}.

Evidências sugerem regulação cruzada entre diferentes padrões de citocinas nas respostas imunes³⁰. Se por um lado, citocinas pró-inflamatórias, como o IFN-gama, induzem a resposta imune pró-

inflamatória que se mostra efetiva contra infecções virais e neoplasias, por outro lado, citocinas imunoinibitórias, como IL-10, induzem a resposta imune humoral, eficaz contra antígenos extracelulares, entretanto, permissiva ao desenvolvimento de tumores^{28,31,32}.

Dados consistentes têm descrito que a variação na produção de citocinas é geneticamente determinada¹⁷⁻¹⁹. Assim, o polimorfismo único de nucleotídeos na região do gene promotor da IL-10, na posição -1082, está associado à produção diferencial da IL-10 em baixos, intermediários e altos produtores da IL-10³³.

Os resultados da presente casuística mostraram que mulheres portadoras da infecção pelo HPV-16, mesmo apresentando padrão imunogenético para respostas imunoinibitórias reduzidas, ou seja, portadoras de alelos para baixa produção da IL-10, apresentavam níveis intralesionais da IL-10 maiores do que aquelas pacientes que não possuíam a infecção pelo HPV-16. Esses resultados sugerem que mesmo geneticamente pré-determinada, a infecção pelo HPV-16 pode influenciar a resposta imune local e, conseqüentemente, contribuir para a instalação e progressão das lesões cervicais. Esses achados corroboram outros³², confirmando níveis aumentados de mRNA para IL-10 em pacientes portadoras de lesões cervicais de alto grau e positivas para a infecção pelo HPV-16 com relação às mulheres saudáveis.

Segundo Gianini *et al.*³⁴, níveis aumentados de IL-10 em mulheres com lesões cervicais infectadas pelo HPV, com relação às mulheres saudáveis apresentando colos uterinos normais, indicam a ocorrência de imunossupressão local, visto que a IL-10 estaria inibindo: 1) a apresentação de antígenos, 2) a função das células T citotóxicas, 3) a proliferação das células T e 4) a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas inibições contribuem para a instalação e o desenvolvimento de lesões cervicais após infecção pelo HPV.

Lesões cervicais e o câncer do colo do útero ocorrem comumente em pacientes positivas para a infecção pelo HIV-1 imunocomprometidas, condição que claramente define a disfunção imune local^{35,36}. A presente análise mostrou que mulheres portadoras de alelos associados à baixa produção da IL-10 e da infecção pelo HPV-16 apresentaram níveis intralesionais significativamente maiores da IL-10. Entretanto, quando a infecção pelo HIV-1 foi avaliada, nenhuma diferença foi observada. Estes achados sugerem que a presença da infecção pelo HPV-16, mais do que a presença da infecção pelo HIV-1, é um fator predominantemente influenciador na indução da resposta intralesional imunoinibitória, permissiva para a instalação das lesões cervicais. Na atual casuística, não houve nenhuma paciente com estado imune altamente comprometido, podendo justificar os resultados referentes à concentração da IL-10 intralesional.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na presente casuística sugerem que a presença da infecção pelo HPV-16, tipo viral predominantemente encontrado em estudos brasileiros, parece influenciar a produção intralesional da IL-10, citosina imunoinibitória, aumentando sua produção em mulheres que geneticamente estariam predispostas a produzir níveis reduzidos dessa citocina, deixando-as mais susceptí-

veis a instalação e progressão das lesões cervicais, precursoras do câncer do colo uterino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer (INCA), Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. Rio de Janeiro, 2002.
2. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 127(8): 930-934, 2003.
3. KJELLBERG, G. L., et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br. J. Cancer*, 82(7): 1332-1338, 2000.
4. GONÇALVES, M.A., BURATTINI, M.N., DONADI, E.A., MASSAD, E. Risk factors associated with genital warts in HIV-positive Brazilian women. *Tumori*, 89: 9-15, 2003.
5. WALLIN, K.L., et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 341(22): 1633-1638, 1999.
6. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 342-350, 2002.
7. PETRY, K.U., SCHEFFEL, D., BODE, U., et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int. J. Cancer*, 57: 836-840, 1994.
8. ELLERBROCK, T.V., CHIASSON, M.A., BUSH, T.J., et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA*, 283(8): 1031-1037, 2000.
9. TARTOUR, E., GEY, A., SASTRE-GARAU, X., et al. Analysis of interleukin 6 gene expression in cervical neoplasia using a quantitative polymerase chain reaction assay: evidence for enhanced interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma. *Cancer Res.*, 54(23): 6243-6248, 1994.
10. CLERICI, M., MEROLA, M., FERRARIO, E., et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 245-250, 1997.
11. OLAITAN, A., JOHNSON, M.A., REID, W.M., POULTER, L.W. Changes to the cytokine microenvironment in the genital tract mucosa of HIV+ women. *Clin. Exp. Immunol.*, 112: 100-104, 1998.
12. AL-SALEH, W., GIANNINI, S.L., JACOBS, N., et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J. Pathol.*, 184(3): 283-290, 1998.
13. GIANNINI, S.L., AL-SALEH, W., PIRON, H., et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.*, 113(): 183-189, 1998.
14. MOTA, F., RAYMENT, N., CHONG, S., SINGER, A., CHAIN, B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin. Exp. Immunol.*, 116(1): 33-40, 1999.
15. TURNER, D.M., WILLIAMS, D.M., SANKARAN, D., LAZARUS, M., SINNOTT, P.J., HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J. Immunogenet.*, 24: 1-8, 1997.
16. ESKDALE, J., GALLAGHER, G., VERWEIJ, C.L., KEIJERS, V., WESTENDORP, R.G., HUIZINGA, T.W. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Immunology*, 95: 9465-9470, 1998.
17. HUTCHINSON, I.V., PRAVICA, V., HAJEER, A., SINNOTT, P.J. Identification of high and low responders to allografts. *Rev. Immunogenet.*, 1: 323-333, 1999.
18. BIDWELL, J.L., WOOD, N.A., MORSE, H.R., OLOMOLAIYE, O.O., KEEN, L.J., LAUNDY, G.J. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement. *Eur. J. Immunogenet.*, 26: 135-223, 1999.
19. HAUKIM, N., BIDWELL, J.L., SMITH, A.J., et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.*, 3 (6): 313-330, 2002.
20. STANCZUK, G.A., SIBANDA, E.N., PERREY, C., et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int. J. Cancer*, 94(6): 792-794, 2001.
21. MILLER, A.S., DYKES, D.D., OLESKY, H.F. A simple salting-out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1255, 1988.

22. NIJDERS, P.J., VAN DEN, BRULE, A.J., SCHRIJNEMAKERS, H.F., SNOW, G., MEIJER, C.J., WALBOOMERS, J.M. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.*, 71:173-181, 1990.
23. MANOS, M.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of human papillomaviruses. In: Furth M and Greaves M eds. Molecular diagnostic of Human Cancer, Cancer Cells, New York, Cold Spring Harbor Press, 1989
24. WALBOOMERS, J.M., JACOBS, M.V., MANOS, M.M., et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, 189:12-19, 1999.
25. SANGUINETTI, C.J., DIAS-NETO, E., SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 914-921, 1994.
26. FERNANDES, A.P.M. Polimorfismo e níveis intralesionais de citocinas em lesões cervicais associadas à infecção pelo papilomavírus humano em mulheres com ou sem a infecção pelo HIV-1. [Tese]. Ribeirão Preto (SP): *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP*; 2003.
27. KOZIEL, M.J. Cytokines in viral hepatitis. *Semin. Liver Dis.*, 19(2): 157-169, 1999.
28. OLAITAN, A., JOHNSON, M.A. Cervical intraepithelial neoplasia in women with HIV. *J. Int. Assoc. Physicians AIDS Care*, 3(5): 15-17, 1997.
29. AHMED, S.M., AL H., REID, W.M., POULTER, L.W. The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects. *Scand. J. Immunol.*, 56: 204-211, 2002.
30. MOSMANN, T.R. Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol. Res.*, 10: 183-188, 1991.
31. CLERICI, M., SHEARER, G.M. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol. Today*, 15: 575-581, 1994.
32. EL-SHERIF, A.M., SETH, R., TIGHE, P.J., JENKINS, D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J. Pathol.*, 195: 179-185, 2001.
33. TURNER, D.M., GRANT, S.C.D., YONAN, N., et al. Cytokine genotypes and heart transplant rejection. *Transplantation*, 64:776-8, 1997.
34. GIANNINI, S.L., HUBERT, P., DOYEN, J., BONIVER, J., DELVENNE, P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int. J. Cancer*, 97(5): 654-659, 2002.
35. MAIMAN, M., FRUCHTER, R.G., GUY, L., CUTHILL, S., LEVINE, P., SERUR, E. Human deficiency virus infection and invasive cervical carcinoma. *Cancer*, 71: 404, 1993.
36. SHAMANIN, V., ZUR HAUSEN, H., LAVERGNE, D., et al. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88, (12): 802-811, 1996.

Endereço para correspondência:

ANA PAULA MORAIS FERNANDES

Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, USP.

Av Bandeirantes 3900, Monte Alegre,

E-mail: anapaula@eerp.usp.br

Recebido em: 28/06/04

Aprovado em: 20/10/04