

KLISSIA PIRES SOUZA PICCININ

**AVALIAÇÃO DA IMUNO-EXPRESSÃO DA GRANZIMA B
NA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL EM
MULHERES INFECTADAS PELO HIV**

CAMPO GRANDE – MS, 2006

KLISSIA PIRES SOUZA PICCININ

**AVALIAÇÃO DA IMUNO-EXPRESSÃO DA GRANZIMA B
NA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL EM
MULHERES INFECTADAS PELO HIV**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA
MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE – REDE CENTRO-OESTE,
CONVÊNIO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS E
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO
SUL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Orientador: Prof Dr Ricardo Dutra Aydos

Coordenador: Prof Dr Carlos Alberto Bezerra Thomaz

CAMPO GRANDE- MS, 2006

Piccinin, Klissia Pires Souza Piccinin

Avaliação da imuno-expressão da granzima B na neoplasia intra-epitelial cervical em mulheres infectadas pelo HIV – Campo Grande, 2006.

54p.

Dissertação (Mestrado) – Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Evaluation of Granzyme B expression in cervical intraepithelial neoplasia from HIV infected women

1. Granzima B 2. HIV 3. Neoplasia intra-epitelial cervical

Banca Examinadora

Presidente: Ricardo Dutra Aydos – UFMS

Examinador externo: Adriane Bovo Carneiro - UNIDERP

Examinador interno: Rivaldo Venâncio da Cunha - UFMS

Examinador interno (suplente): Ernesto Antônio Figueiró Filho – UFMS

Data: 28 de junho de 2006. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Campo Grande – MS.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1. O câncer de colo uterino.....	03
2.2. A relação HPV e HIV.....	04
2.3. A prevenção do câncer nas pacientes HIV-positivo.....	06
2.4. A importância da contagem de CD4 e medida da carga viral.....	07
2.5. A função imune local.....	08
2.6. A apoptose.....	10
2.7. A granzima B.....	11
2.8. A granzima B em pacientes HIV-positivo.....	14
2.9. A granzima B no colo uterino.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1. Amostra.....	18
4.2. Material.....	19
4.3. Método.....	20
4.4. Análise estatística.....	22
4.5. Interpretação da expressão da granzima B.....	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO 1. Tabela 5.....	49
ANEXO 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	51
ANEXO 3. Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1- Intervalo e média dos linfócitos marcados por IHQ para a granzima B nos grupos HIV e controle, segundo o resultado anatomopatológico.....	24
Tabela 2- Média dos linfócitos marcados por IHQ para a granzima B no epitélio e no estroma nos grupos HIV e controle, segundo o resultado anatomopatológico...	25
Figura 1- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de LIEBG do grupo controle.....	26
Figura 2- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de LIEAG do grupo controle.....	26
Figura 3- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de LIEBG do grupo HIV-positivo.....	27
Figura 4- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de LIEAG do grupo HIV-positivo.....	27
Figura 5- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de cervicite leve do grupo HIV-positivo.....	28
Figura 6- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de cervicite leve do grupo controle.....	28
Figura 7- Fotomicrografia evidenciando vários linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ de cervicite aguda do grupo HIV-positivo.....	29
Figura 8- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de IHQ do grupo controle de tonsila.....	29
Tabela 3- Média dos linfócitos marcados por IHQ para a granzima B no epitélio e no estroma no grupo HIV de acordo com a contagem de CD4.....	30
Tabela 4- Média dos linfócitos marcados por IHQ para a granzima B no epitélio e no estroma no grupo HIV de acordo com a carga viral.....	31
Tabela 5- Distribuição das 71 pacientes segundo a identificação, número de linfócitos com a coloração IHQ para a granzima B em localização epitelial e estromal, seguido por resultado anatomopatológico, grupo HIV ou controle e valores da carga viral e contagem de CD4/mm ³ no grupo HIV.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

ACOG – American College of Obstetricians and Gynecologists
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APAF1– fator 1 ativador da protease
CCPI – proteinase I da célula citotóxica
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CI-MPR – receptor manose-6-fosfato cátion independente
CV – Carga viral
DNA – Ácido Desoxi-ribonucleico
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV – Papilomavírus Humano
ICAD – inibidora de caspase ativada DNase
IFN gama – Interferon gama
IHQ – Imuno-histoquímica
IL-10 – Interleucina-10
LIEBG – Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau
LIEAG – Lesão Intra-epitelial Escamosa de Baixo Grau
NIC – Neoplasia Intra-epitelial Cervical
OMS – Organização Mundial da Saúde
PARP – *Poly ADP ribose polimerase*
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TGF β – *transforming growth factor- β*
Th-1 – T helper-1
Th-3 – T helper-3

RESUMO

A granzima B é uma serino-protease sintetizada pelos linfócitos T citotóxicos ativados por um estímulo exógeno. O linfócito T citotóxico é o principal efetor no processo de erradicação de células infectadas por vírus e células neoplásicas. Em associação com a perforina, a granzima B induz apoptose na célula alvo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar quantitativamente, por estudo imuno-histoquímico, a expressão linfocitária da granzima B na neoplasia intra-epitelial cervical de pacientes infectadas pelo HIV. Participaram da pesquisa 71 pacientes, sendo 36 HIV-positivo e 35 controles. A maioria das pacientes do grupo HIV-positivo apresentava contagem de células CD4 > 200/mm³ e utilizava terapia anti-retroviral potente. Os valores medianos para a granzima B em 20 campos de grande aumento (epiteliais e estromais) no grupo HIV-positivo e no grupo controle foram respectivamente: sem neoplasia (20,5 e 4,6), NIC I (54,0 e 40,3), NIC II e NIC III (36,0 e 58,7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a NIC de pacientes HIV-positivo e controles. Portanto, a alta incidência e recorrência de NIC nas pacientes infectadas pelo HIV não parecem ser decorrentes de alteração na expressão linfocitária da granzima B.

Palavras-chave: granzima B, neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), HIV.

ABSTRACT

Granzyme B is a serine protease synthesized in activated cytotoxic T lymphocyte after exogenous stimulation. Cytotoxic T lymphocyte are the main effector in eradication process of neoplastic cell and virus infected cell. With perforin, granzyme B discharge apoptosis signal to a target cell. The objective of this study was to evaluate granzyme B expression in lymphocytes by immunohistochemistry staining of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in HIV-infected women. A total of 71 patients have participated of this study: 36 HIV-positive and 35 controls. The majority of HIV-infected women group received highly antiretroviral therapy (HAART) and presented CD4-cell count $>200/\text{mm}^3$. The activated cytotoxic T lymphocyte mean value in 20 fields (HPF400X), in both epithelials and stromals pars from HIV-positive group and control group were, respectively: without neoplasia (20,5 and 4,6), CIN I (54,0 and 40,3), CIN II and CIN III (36,0 and 58,7). There weren't significantly difference between CIN from HIV positive patients and controls. Thus, the high incidence and recurrence of CIN from HIV-infected women weren't resulting from granzyme B altered expression in lymphocytes.

Keywords: granzyme B, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), HIV.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) apresenta grande relevância em nosso meio pela alta prevalência e morbimortalidade. De acordo com a OMS, 43 milhões de pessoas são portadoras ou estão vivendo com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Ocorrem cinco milhões de novas infecções por ano.

Desde a identificação do retrovírus causador da AIDS em 1983, a taxa de infecção entre as mulheres tem aumentado significativamente¹. De uma razão homem: mulher de 40:1 no início da epidemia, hoje a razão já se encontra em 1:1 em diversos locais do mundo, sendo a faixa etária de 25 a 39 anos a mais atingida².

A relação entre o HIV e a neoplasia do colo uterino foi suspeitada pela primeira vez em 1988³. Vários estudos mostraram alta prevalência de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e carcinoma cervical invasivo em mulheres infectadas pelo HIV em comparação aos controles negativos^{4,5,6}. Em função desses achados, em 1993 o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos incorporou o câncer de colo uterino como um dos critérios diagnósticos de AIDS.

A evolução do câncer de colo uterino desde a lesão inicial até a invasão é geralmente longa. Porém, pacientes portadoras de infecção pelo HIV tendem a apresentar evolução mais rápida e agressiva da doença⁷.

Apesar da prevenção simples e de fácil acesso para a população, ainda hoje o diagnóstico de câncer de colo uterino é freqüente. Anualmente, milhares de

mulheres no mundo morrem vítimas dessa doença de terapêutica eficaz nos estágios iniciais.

A explicação da natureza agressiva das NIC em pacientes HIV-positivo ainda não foi completamente elucidada. Acredita-se que o HIV possa influenciar na patogênese do HPV através do aumento da regulação da expressão dos genes E6 e E7 ou até outro tipo de interação entre os vírus⁸.

Outra hipótese a ser considerada é a falha no sistema imunológico. Os linfócitos T citotóxicos, as principais células do sistema imune responsáveis pela eliminação de células infectadas por vírus e células tumorais, poderiam estar pouco atuantes.

Vários estudos mostraram que a ativação do linfócito T citotóxico pode ser mensurada através da pesquisa das granzimas intracitoplasmáticas^{9,10}. A granzima B, a mais importante da família das granzimas, tem aumento na sua expressão proporcional à gravidade da lesão pré-maligna e maligna no colo uterino. Além disso, a granzima B é considerada marcador tumoral de prognóstico, apresentando baixa expressão nos casos recidivantes¹¹.

Apesar da maior concentração de infiltrados linfocitários teciduais nas lesões intra-epiteliais de baixo e alto grau de pacientes HIV-positivo¹², a resposta imune celular dessas pacientes falha em alguma fase do processo de eliminação das células anormais, de forma que a doença progride.

Com a suspeita disfunção dos linfócitos T citotóxicos locais nas pacientes HIV-positivo com NIC, o presente estudo pesquisa a atividade linfocitária citotóxica através da avaliação da imuno-expressão da granzima B por Imuno-histoquímica nos produtos de biópsia e conização do colo dessas pacientes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O câncer de colo uterino

Atualmente, 500 mil mulheres em todo o mundo sofrem de câncer de colo uterino. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, desse total, aproximadamente 200 mil morrerão vítima da doença. No Brasil, são diagnosticados em torno de 20 mil casos novos por ano¹³.

O perfil epidemiológico do câncer cervical engloba mulheres no menacme com história de coitarca e paridade precoces, multiplicidade de parceiros, multiparidade, baixo nível sócio-econômico e tabagismo¹⁴.

A associação entre o desenvolvimento do câncer de colo e o Papilomavírus humano (HPV) foi demonstrada em estudos clínicos e laboratoriais. O DNA do HPV foi encontrado em 77 a 94% das NIC e em 99,7% dos carcinomas invasivos¹⁵. A presença do vírus isoladamente não é suficiente para induzir carcinogênese genital. Outros co-fatores são importantes para o desenvolvimento do câncer invasor como, por exemplo, HPV de alto risco, persistência viral, deficiências nutricionais, doenças sexualmente transmissíveis, resposta imune individual, fatores genéticos como o polimorfismo da proteína p53, tabagismo e o uso de contraceptivos orais¹⁶.

Estima-se que 75% da população sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida. No entanto, mais de 90% dessas infecções são eliminadas espontaneamente pelo sistema imune dentro de 24 meses. Assim, a prevalência da infecção clínica e subclínica é baixa, girando em

torno de 0,7 a 2,9%, sendo maior entre jovens sexualmente ativos, entre 25 e 35 anos de idade¹⁷.

O grau de infectividade varia com a idade, a quantidade das lesões, a agressividade do vírus e a imunocompetência individual¹⁸.

Nos casos de NIC, estima-se em média que a infecção pode regredir em 25% dos casos, persistir em 60% e progredir em 15% das vezes.

Apesar da alta prevalência do DNA do HPV nas neoplasias invasoras do colo uterino, apenas 1% das mulheres infectadas por um dos vários tipos virais oncogênicos desenvolve o câncer.

Quando ocorre a progressão da lesão de baixo para a de alto grau, verifica-se que o DNA viral passa da forma episomal (circular) para forma integrada (linear), incorporando-se ao DNA da célula hospedeira. O HPV codifica 8 proteínas maiores, das quais as oncoproteínas E6 e E7 apresentam relevância por promoverem o processo maligno. Essas proteínas inativam as proteínas supressoras tumorais do hospedeiro: p53 e pRB. O efeito combinado dessas ações permite a incorporação de mutações celulares, que culminará com o desenvolvimento do câncer¹⁹.

2.2. A relação HPV e HIV

As pacientes portadoras do vírus HIV apresentam maior incidência de infecção pelo HPV que a população geral e maior chance de progressão tanto das lesões pré-malignas quanto dos condilomas, com persistência ou recidiva da infecção pelo HPV, sendo proporcionais à intensidade da imunodepressão^{20,21}. A

incidência da infecção pelo HPV nas pacientes HIV soropositivas varia de 64% a 98% e a incidência de NIC nessas pacientes varia de 13% a 19%⁶.

Múltiplos tipos de HPV são detectados nas pacientes imunossuprimidas, sendo o 6, 11, 16, 18 e o 51 os mais prevalentes. As lesões geralmente são extensas, atingindo simultaneamente colo, vagina, vulva, períneo e região perianal⁶.

A relação freqüente entre HPV e HIV leva ao questionamento do real papel de cada um dos vírus, principalmente a função isolada do HIV no desenvolvimento do câncer cervical.

O HIV parece ser um co-fator na associação entre HPV e neoplasia do colo²². A evolução para câncer de colo acontece de forma mais evidente no HIV-2, conforme estudos em mulheres africanas²⁰. Acreditava-se que a associação entre HIV-1 e câncer de colo seria encontrada em um futuro próximo, devido ao aumento da expectativa de vida com as terapias anti-retrovirais²³, porém apesar da alta incidência e prevalência de NIC, não se tem observado proporcional aumento na incidência de câncer de colo em mulheres HIV-1. Questiona-se se esse fato seria devido à maior vigilância e tratamento dessas pacientes ou se haveria um incremento na resposta imune dessas pacientes que não permitiria o desenvolvimento do câncer²⁴.

O mecanismo de associação entre HPV e HIV e sua relação com a imunossupressão causada pelo HIV permanecem obscuros. Uma vez que os dois vírus não co-infectam o colo uterino, se interações moleculares ocorrem entre o HIV e o HPV, elas são provavelmente mediadas por fatores extra-celulares. A idéia de que a infecção pelo HIV induziria a replicação do HPV, intensificando o

processo infeccioso e promovendo reativação e persistência do HPV, já foi várias vezes cogitada^{8,20}. Acredita-se que o aumento da expressão de genes do HPV em mulheres infectadas pelo HIV pode potencialmente ser explicada por interações envolvendo a proteína transativadora do HIV-1 (*tat 1*) e a proteína promotora do HPV 16 (p97), levando a reversão da repressão de E2 ou aumento da expressão de E6 e E7. De outra maneira, a mesma proteína do HIV tem também demonstrado ser capaz de inibir a proliferação de células T *in vitro*¹⁶.

2.3. A prevenção do câncer nas pacientes HIV-positivo

As mulheres portadoras de infecção pelo HIV necessitam de uma vigilância ginecológica mais intensa e um tratamento mais agressivo de quaisquer processos infecciosos, a fim de prevenir um maior comprometimento do seu sistema imunológico.

O exame citopatológico cérvico-vaginal permite o diagnóstico de neoplasia cervical em estágio pré-invasivo, no qual o tratamento pode evitar a progressão a câncer invasor. A eficácia do exame citopatológico em mulheres HIV-positivo é controversa, com estudos mostrando baixa sensibilidade, condicionado pela alta prevalência de citologias anormais inespecíficas nessas mulheres, e pela maior frequência de infecções associadas^{25,26,27}. Outros autores sugerem limitações semelhantes às de mulheres HIV-negativo²⁸. Preconiza-se a complementação colposcópica rotineira, visando a minimizar os resultados falso-negativos⁸.

O American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) preconiza para mulheres HIV-positivo, com contagem de CD4 superior a 200/mm³, a realização de esfregaço citopatológico e exame colposcópico de rotina a cada

seis meses e, para aquelas com contagem inferior a esse valor, determina o teste Papanicolau trimestral e o exame colposcópico semestral²⁹.

Além do maior rigor no rastreamento, maior atenção deve ser dispensada no tratamento dessas pacientes, que deve obedecer a protocolos específicos em função das maiores taxas de progressão e recorrência das lesões.

2.4. A importância da contagem de CD4 e medida da carga viral

Dois marcadores têm sido amplamente estudados nas pacientes HIV-positivo com NIC no intuito de se avaliar a sua relação com a evolução das lesões. São eles: a contagem de células CD4 e a carga viral. A contagem de células CD4 tem amplo uso clínico como marcador geral de imunocompetência. Sua depleção indica deficiência grave na imunidade celular. Baixa carga viral, por sua vez, é considerada bom marcador prognóstico da doença viral e/ou de sobrevida³⁰.

A maioria dos autores concorda que o grau de imunossupressão contribui para o desenvolvimento da NIC, porém uma vez a lesão estabelecida, sua progressão não é afetada pela contagem plasmática do CD4. A gravidade da NIC não mostra relação com a diminuição da contagem das células CD4^{30, 31, 32}.

As dosagens da carga viral variam de valores indetectáveis até valores acima de 1×10^7 cópias/ml. Esta variabilidade permite infinitas abordagens sobre qual ponto de corte da carga viral estaria associado com o surgimento das lesões cervicais. A carga viral não indica imunodepressão, mas indica a velocidade que as células CD4 irão cair. Não existem dados na literatura que demonstrem associação direta entre quantificação da carga viral do HIV e a evolução das NIC³¹.

Apesar da imunodepressão severa relacionada ao HIV aumentar muito o risco de desenvolvimento da NIC, o tratamento com terapia anti-retroviral potente diminui esse risco, provavelmente restaurando ou preservando a função imune³³. A taxa de regressão das lesões pré-malignas nas pacientes em uso de terapia anti-retroviral potente é de 23,8%, duas vezes maior do que nas pacientes sem tratamento³⁴, enquanto que a taxa de prevalência do HPV não se altera. Esse resultado deve-se provavelmente ao aumento da contagem de CD4 observada nas pacientes que fazem o tratamento.

2.5. A função imune local

A resposta imunológica do hospedeiro, particularmente a imunocelular, parece desempenhar importante papel na eliminação de infecções virais. Há a possibilidade de persistência e eventual progressão da lesão se houver falha nessa resposta local.

O papel protetor contra tumores, na resposta imune localizada, tem sido atribuído ao linfócito T citotóxico. Infiltrados de linfócitos T citotóxicos em tecidos tumorais têm sido correlacionados com melhor evolução da doença^{35,36,37}. Além disso, infiltrados linfocitários estão correlacionados com regressão de verrugas genitais em modelos humanos e animais^{38,39}.

Os linfócitos T citotóxicos (CTL) e as células *natural killer* (NK) são as principais células efetoras no processo de erradicação das células infectadas por vírus e das células tumorais. A atividade linfocitária tem sido demonstrada em vários estudos através da avaliação das granzimas, enzimas armazenadas nos

grânulos citoplasmáticos linfocitários, as quais têm papel fundamental no processo de lise das células alvo^{9,40}.

Os mecanismos imunológicos locais começaram a ser estudados há poucos anos. A resposta imune celular na NIC de pacientes HIV-positivo e HIV-negativo vem sendo avaliada em alguns estudos. Infiltrados linfocitários aparecem com maior frequência no tecido estromal de pacientes HIV-positivo com NIC em relação àquelas HIV-negativo com NIC e no tecido normal. Proporções significativamente altas de células CD8 com fenótipo citotóxico (TIA-1+) ocorrem em todas as NIC e essas proporções são ainda mais altas na presença de infecção pelo HIV^{12,41}.

Estudo recente mostra que a lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (LIEAG) apresenta infiltrado de células localizado no estroma logo abaixo das lesões, sugerindo respostas localizadas aos eventos do epitélio. Tanto a resposta imune inata quanto a adquirida estão envolvidas. Os linfócitos CD4 e CD8 e os linfócitos B se concentram no estroma, enquanto que no epitélio, observa-se aumento da concentração dos linfócitos CD4. Também macrófagos e NK estão distribuídos em estroma e epitélio em maiores densidades que no tecido normal. Os neutrófilos, embora também mais concentrados, são exclusivos do epitélio⁴².

Nas pacientes com LIEAG infectadas pelo HIV, ocorrem algumas diferenças no microambiente imune em relação às não infectadas. A densidade média de linfócitos CD4 no estroma e no epitélio e a densidade de macrófagos no epitélio são significativamente menores. As densidades de neutrófilos e NK também estão diminuídas. Não há correlação entre a densidade de linfócito CD4 local e sua concentração no sangue periférico⁴².

A expressão de IL-2R- α , necessária para a proliferação e diferenciação do linfócito T helper-1(Th-1), é abundante nas LIEAG tanto em pacientes normais como nas infectadas pelo HIV. Células que expressam interferon gama (INF gama) estão abundantemente distribuídas no epitélio displásico de mulheres saudáveis e dramaticamente diminuídas nas HIV-positivo. Apesar da expressão do T bet (fator de transcrição necessário para a expressão do INF gama pelos linfócitos Th1) estar presente na maioria das LIEAG de pacientes HIV-positivo, a produção do IFN gama não ocorre em boa parte das pacientes. Também a produção de *transforming growth factor- β* (TGF β) secretado pelo linfócito Th1 e Th3, que regula negativamente a produção de IFN gama, e de interleucina-10 (IL-10), reguladora da resposta Th1, aparentemente estão diminuídos nas pacientes infectadas pelo HIV. Esses achados demonstram que o microambiente imune local das LIEAG apresenta algumas diferenças entre as pacientes HIV-positivo e HIV-negativo, que ainda necessitam ser melhores elucidadas⁴².

2.6. A apoptose

A apoptose é considerada um fenômeno celular individual e autônomo. Cada célula lábil ou estável decide por si própria a hora de sua morte, conforme a programação contida no seu genoma e a interação com o ambiente em que vive.

Um dos grupos de genes envolvidos no controle da apoptose mais estudados é a família bcl. Dentre os produtos da expressão destes genes, destacam-se como pró-apoptóticos as moléculas Bad, Bak, Bax, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Bod, Bok, DP5, Hrk, Mtd e Nip3 presentes nas mitocôndrias. Já as moléculas anti-apoptóticas conhecidas são Bcl-2, Bcl-w, Bcl-XL, Bfl-1, BHRF-1, Boo e Mcl-1.

A proteína Bcl-2, expressa pelo gene *bcl-2*, foi primeiramente identificada como responsável pela sobrevivência dos linfócitos no linfoma de células B^{43,44}.

A razão entre as moléculas pró e anti-apoptóticas (por exemplo: Bax ou Bcl-x/Bcl-2) vai produzir sinais que ditarão o destino da célula. Se a evolução ocorrer no sentido da apoptose, inicia-se a produção de caspases (efetores comuns), da família das Enzimas Conversoras de Interleucinas (*ICE/interleukin-1 converting enzyme*), conforme será descrito adiante.

2.7. A granzima B

As granzimas foram descobertas em 1987, quando Jenne e Tschopp isolaram seis proteínas armazenadas em grânulos intra-citoplasmáticos pelo método Percoll⁹. A proteína de maior peso molecular foi denominada *perforin* (*pore forming protein*). As demais foram conjuntamente denominadas *granzymes* (*granule associated enzymes*).

A família Granzima compreende um grupo especial de serino-proteases que permanecem armazenadas, completamente processadas e na forma ativada, em grânulos citoplasmáticos dos linfócitos T citotóxicos, diferentemente de outras serino-proteases que permanecem armazenadas na forma zimógena, como a tripsina.

As granzimas foram divididas em grupos de enzimas que compartilham algumas características estruturais: A, B, C, D, E, F, G e H. A granzima B (GrB), codificada no gene C11, e também chamada de proteinase I da célula citotóxica (CCPI), é a variedade mais abundante no linfócito T citotóxico. A sua função

fisiológica foi demonstrada por Heusel (1994), estando relacionada aos eventos proteolíticos no processo de reconhecimento de células-alvo⁴⁵.

As granzimas liberadas dos grânulos dos linfócitos T citotóxicos atuam na célula-alvo determinando o desencadeamento de uma série de eventos que culminam com a morte celular por apoptose, importante mecanismo que garante o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular.

O processo de apoptose decorrente da ação dos linfócitos T citotóxicos tem a função de destruir as células infectadas por vírus ou as células malignas antes que se alastre a infecção viral ou que ocorra um câncer. É necessário, porém, entender como essas células destroem seus alvos e como sua atividade pode ser controlada para que no futuro tal conhecimento traga o desenvolvimento de novas terapias contra doenças, como o HIV e o câncer.

Há dois mecanismos básicos de lise das células-alvo pelos linfócitos T citotóxicos: mediado por receptor (Fas – FasL) e mediado por grânulos citoplasmáticos. Este último é o mais importante mecanismo de destruição de células-alvo e envolve a liberação de moléculas efetoras citolíticas, entre elas a perforina e a granzima, que leva à rápida fragmentação do DNA da célula-alvo e apoptose.

A entrada da granzima B no citoplasma da célula-alvo ainda não é bem clara. Acreditava-se que ela entrasse na célula-alvo através dos poros formados pela perforina na membrana. Evidências recentes sugerem que a granzima B entra na célula-alvo via receptor manose-6-fosfato cátion independente (CI-MPR). Porém, a perforina é necessária para liberar a granzima B das vesículas endocíticas⁴⁰. Uma vez no citoplasma da célula-alvo, a granzima B determina a

marginação da cromatina, a dissolução da membrana nuclear e a fragmentação do DNA, em um processo de morte celular programada. Portanto, a perforina e a granzima B disparam de forma sinérgica o sinal para que ocorra apoptose na célula tumoral⁴⁶.

A granzima B age no interior da célula por meio de substratos e por diferentes vias. Na via caspase dependente, a granzima B pode clivar diretamente a pró-caspase-3, resultando na formação da caspase-3. Uma vez ativa, a caspase-3 pode clivar a *Poly (ADP ribose) polimerase (PARP)* e o inibidor da caspase ativada DNase (ICAD), levando à fragmentação do DNA e apoptose.

Na via caspase independente, a granzima B cliva a molécula Bid, formando a gtBid, que associada a Bax é translocada para a mitocôndria, resultando na liberação do citocromo c, que leva à morte celular por necrose, mesmo na ausência da caspase.

Alternativamente, na presença da atividade da caspase, o citocromo c junta-se com o fator 1 ativador da protease (APAF1) e com a pró-caspase-9 para formar o apoptossoma. Na presença de ATP, o apoptossoma é capaz de formar a caspase-9 ativa, o que ativa a caspase-3, ligando a via da mitocôndria com a via da caspase e amplificando a cascata da caspase, resultando em apoptose⁴⁰.

Como visto, a granzima B pode levar a morte celular por várias vias. Assim, mesmo em face de um vírus que pode bloquear uma rota de morte, a ação da granzima B pode ser feita de outra maneira para destruir a célula patogênica.

Em virtude da sua relevância no mecanismo da apoptose, as granzimas têm sido alvo de diversos estudos relacionados aos mais variados temas como,

por exemplo, transplantes, infecção pelo HIV e cânceres, especialmente os linfomas.

Há relatos na literatura relacionando a expressão da granzima B ao prognóstico de diversas doenças. Kim (2001) verificou que mais de 60% dos pacientes com recidiva de linfoma angioendotelioma de cabeça e pescoço cursavam com níveis elevados de granzima B e apresentavam menores taxas de sobrevivência⁴⁷. De maneira análoga, na doença de Hodgkin, observa-se evolução desfavorável quando há altas taxas de linfócitos ativados, independente das características clínicas ou histológicas⁴⁸. A granzima B também vem sendo utilizada no monitoramento de rejeição após transplantes renais, pois a destruição do tecido heterólogo é inicialmente verificada através da infiltração linfocitária⁴⁹.

A ação sinérgica entre a perforina e a granzima B culmina com a morte da célula neoplásica por apoptose. Esse mecanismo pode impedir a progressão de uma lesão pré-maligna para invasora. A granzima B e a perforina também podem ter papel decisivo na supressão de metástases de câncer de mama e de pulmão. Seus níveis são inversamente proporcionais ao status de metástases linfonodais de pacientes com câncer de mama e pulmão⁵⁰.

2.8. A granzima B em pacientes HIV-positivo

Vários estudos avaliaram a expressão linfocitária da granzima B no sangue periférico e no tecido linfóide de pacientes infectados pelo HIV^{10,51}. Além desses sítios, linfócitos T citotóxicos ativados (granzima B +) foram encontrados em grande quantidade na mucosa duodenal de pacientes HIV-positivo, entretanto sem relação com a presença ou não de diarreia nessas pacientes⁵².

Os mecanismos precisos responsáveis pela destruição do tecido linfóide na infecção pelo HIV são ainda desconhecidos. Aumento da expressão da granzima B pelos linfócitos T nos centros germinativos e nas áreas interfoliculares de pacientes HIV-positivo em relação aos controles HIV-negativo foi verificado em todas as fases da doença, demonstrando a importância dos linfócitos T citotóxicos na destruição da função imune durante a infecção pelo HIV⁵¹.

Um dos mecanismos de falência do sistema imune em pacientes HIV-positivo decorre da senescência dos linfócitos T citotóxicos HIV-1 específicos, que apresentam expressão reduzida da perforina e da granzima B e perdem sua atividade indutora de apoptose⁵³.

Além disso, a expressão do RNAm da granzima B está alterada no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV tipo-1. A maioria deles têm níveis significativamente mais baixos do que os controle. Aqueles com níveis detectáveis de RNAm de granzima, mostraram um nível muito maior do que todos os controles saudáveis. Assim, a citotoxicidade celular durante a infecção pelo HIV-1 pode ser prejudicada devido à quantidade deficiente de grânulos citotóxicos ativos ou sua regulação anormal⁵⁴.

2.9. A granzima B no colo uterino

Em 1995, verificou-se que a maioria dos carcinomas cervicais apresentava extensa infiltração de linfócitos T. Porém, houve falta de expressão da granzima B em quase todos os casos avaliados⁵⁵.

Após dois anos, resultado praticamente oposto foi encontrado em outra pesquisa. Pela primeira vez a expressão da granzima B foi avaliada nas lesões

pré-malignas⁵⁶. Baixa taxa de ativação linfocitária foi observada nas NIC, enquanto que em alguns carcinomas de colo houve maciça infiltração de linfócitos ativados.

Mais tarde, em 2005, a granzima B ganhou valor de marcador tumoral de prognóstico nas LIEAG. Expressão crescente da granzima B foi observada no colo normal, seguido da neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau e carcinoma espinocelular invasivo. A significativa diminuição na expressão da granzima B no estroma dos casos de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau recidivantes demonstrou seu valor prognóstico¹¹.

Não encontramos relatos de estudo da granzima B no colo uterino de pacientes HIV-positivo na literatura. Em função da elevada taxa de incidência e recorrência das NIC nessa população de pacientes, resolvemos investigar o assunto através da comparação da expressão da granzima B entre pacientes HIV-positivo e HIV-negativo com e sem NIC.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Avaliar a imuno-expressão da granzima B em fragmentos de tecido de colo com neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau e de alto grau de pacientes infectadas pelo HIV.
- 3.2. Comparar a imuno-expressão da granzima B no colo uterino de pacientes HIV-positivo com pacientes controle.

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRA

- I. Foram selecionadas 71 pacientes do Ambulatório de Patologia Cervical do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), no período de junho de 2005 a março de 2006.
- II. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos /CEP /UFMS (registro nº506).
- III. Foram incluídas no estudo as pacientes que apresentaram diagnóstico suspeito de neoplasia intra-epitelial cervical nos exames de citologia e colposcopia e que aceitaram participar da pesquisa, tendo assinado o Termo de consentimento livre e esclarecido.
- IV. Foram excluídas do estudo as pacientes gestantes, as pacientes imunossuprimidas por outras causas que não a infecção pelo HIV, as pacientes com câncer invasor e as pacientes que não aceitaram participar da pesquisa.
- V. As pacientes incluídas no estudo foram divididas em dois grupos:
 - a. pacientes portadoras do vírus HIV, independentemente da realização de tratamento com terapia anti-retroviral;
 - b. pacientes controle saudáveis.
- VI. As pacientes infectadas pelo HIV tiveram o diagnóstico firmado através de exames aceitos rotineiramente (ELISA e Southern Blot).
- VII. Todas as pacientes HIV-positivo estavam sendo acompanhadas pelo ambulatório de HIV no Hospital Dia Esterina Corsini do HU-UFMS, sendo que

apenas duas pacientes não estavam usando terapia anti-retroviral, pois não tinham indicação para o seu uso. Foram verificadas a contagem de linfócitos T CD4 e a carga viral (CV) de todas as pacientes infectadas pelo HIV.

4.2. MATERIAL

- I. Os espécimes avaliados constaram de amostras obtidas através de biópsia ou conização do colo uterino a CAF. Os procedimentos foram todos realizados pela própria pesquisadora.
- II. O material obtido foi fixado em formol tamponado a 10% e encaminhado ao laboratório de anatomia patológica para análise histológica.
- III. No laboratório, as peças foram incluídas em parafina (mantendo-se identificação da amostra), seguindo rotina de preparo padronizado dos procedimentos histológicos. As peças emblocadas de modo a manter a forma de um plano retificado, foram seccionadas com micrótomo em corte sagital do epitélio do colo, interessando três micrômetros de espessura. O primeiro corte foi fixado e corado pela técnica de hematoxilina-eosina e o 2º corte foi fixado em lâminas de vidro eletrostaticamente carregadas (EasyPath - Superfrost Plus®, lote 23495), para a realização da imuno-histoquímica.
- IV. As lâminas coradas pela hematoxilina-eosina para diagnóstico histológico foram revisadas por dois patologistas.
- V. A Nomenclatura histológica utilizada foi a de Richart (1967):
 - a. NIC I
 - b. NIC II
 - c. NIC III

VI. Correspondência com a Nomenclatura citológica do Sistema Bethesda (1991):

- a. lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LIEBG): atipias por efeito citopático do HPV e NIC I.
- b. lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (LIEAG): NIC II e NIC III.

VII. Neste estudo foi utilizada a Nomenclatura histológica de Richart e Wright (1993):

- a. tecido sem neoplasia: para os casos de cervicite leve ou aguda, com ou sem metaplasia .
- b. LIEBG: NIC I.
- c. LIEAG: NIC II e NIC III. As NIC II e III foram agrupadas pelo fato serem consideradas clínica, molecular e biologicamente equivalentes.

VIII. Os laudos histopatológicos foram entregues às pacientes no prazo habitual.

4.3. MÉTODO

A imuno-expressão da granzima B foi avaliada através do estudo imuno-histoquímico. O processamento imuno-histoquímico foi realizado com a utilização de anticorpo primário Anti-Granzima B, marca Dako, diluição 1:25 (Dako, produto M7235, lote 061(101) – Anticorpo monoclonal anti-Granzima B humana, clone GrB-7); anticorpo secundário anti-mouse biotinilado seguido da adição de estreptavidina-peroxidase (LSAB[®] - Dako, produto K0690, lote 125028r, diluição 1:15 em tampão PBS: Solução I (“Link”: Anticorpo secundário anti-mouse biotinilado) e solução II (Estreptavidina-peroxidase – Sistema HRP); revelador de cor DAB- Dako, produto K34767-1, lote 09381, diluição 1:20 (Diaminobenzidina)

com obtenção de expressão da positividade na coloração marrom, em forma de grânulos citoplasmáticos.

Seqüência de coloração imuno-histoquímica:

- I. preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação):
 - Xilol a 60°C por 15 minutos;
 - Xilol a temperatura ambiente por 15 minutos;
 - Etanol 100% (3X) por 30 segundos cada;
 - Etanol 95% por 30 segundos;
 - Etanol 80% por 30 segundos;
 - Etanol 70% por 30 segundos;
 - Lavagem com água corrente e destilada.
- II. recuperação antigênica com incubação das lâminas em solução de recuperação antigênica (Dako, produto S1699, lote 074270) em panela a vapor a 95° na diluição 1:10 , durante 20 minutos;
- III. bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, em 2 banhos de 10 minutos cada, seguido de lavagem em água corrente e destilada e tampão PBS (Solução Salina tamponada com fosfatos 0,01M/pH 7,4);
- IV. diluição do anticorpo primário anti-Granzima B a 1:25 com diluente de anticorpo Dako, código S1699;
- V. aplicação do anticorpo primário anti-Granzima B (Dako) nas lâminas por 30 minutos;
- VI. lavagem em tampão PBS;

- VII. aplicação do anticorpo secundário biotinilado anti-mouse (solução 1 do kit LSAB[®]) e incubação por 10 minutos;
- VIII. lavagem em tampão PBS;
- IX. aplicação de Estreptavidina-peroxidase (solução 2 do kit_LSAB[®]) e incubação por 10 minutos;
- X. lavagem em tampão PBS;
- XI. aplicação da solução de substrato-cromógeno DAB, diluída a 1:10 por 5 minutos;
- XII. lavagem em água destilada;
- XIII. contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Qeel[®]) por 1 minuto;
- XIV. lavagem das lâminas em água destilada por 2 minutos;
- XV. desidratação das lâminas em passagem em etanol por 30 segundos em cada solução com concentrações progressivas, conforme passo (a) da seqüência de coloração;
- XVI. montagem com lamínula com resina Entellan neu (Merck).

As células que adquiriram coloração acastanhada citoplasmática foram consideradas positivas para granzima B.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi aplicado o teste para duas amostras independentes de Mann Whitney, pois o coeficiente de variação mostrou que a distribuição dos dados não é normal, devendo ser utilizado um teste não-paramétrico.

Em todos os casos, o nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual a 0,05 (0,5%).

O desvio padrão não foi calculado, pois a utilização de testes não paramétricos pressupõe que as variáveis em causa não se comportam como curva de Gauss, não havendo assim sentido o seu cálculo.

4.5. INTERPRETAÇÃO DA EXPRESSÃO DA GRANZIMA B

A imuno-expressão da granzima B foi analisada no Laboratório de Anatomia Patológica Screenlab.

Para a leitura, utilizou-se microscópio óptico Olympus BX50 com aumento de 400 vezes. A contagem foi realizada manualmente. Na análise de cada caso, selecionaram-se 10 campos microscópicos (0,22m²) consecutivos do epitélio e 10 campos consecutivos do estroma adjacente, padronizados nas áreas de maior concentração de células que apresentavam positividade para a granzima B. Nos casos de algumas biópsias que não totalizaram os 10 campos, foi analisado todo o tecido obtido.

A expressão da granzima B foi considerada positiva nas células cuja coloração citoplasmática apresentou-se acastanhada e, negativa, na sua ausência ou naquelas fracamente coradas.

5. RESULTADOS

A análise das lâminas submetidas à reação imuno-histoquímica para granzima B não mostrou positividade de linfócitos ativados em todos os casos, variando de zero a 888 células (Anexo 1).

No grupo de pacientes infectadas pelo HIV, observou-se maior número de linfócitos marcados na lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, seguido da lesão intra-epitelial escamosa de alto grau e da cervicite. Notou-se intensa quantidade de linfócitos marcados nos casos de cervicite aguda.

Enquanto que no grupo controle, houve expressão crescente da granzima B, segundo os casos de cervicite leve, lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (Tabela 1).

TABELA 1 - Intervalo e média dos linfócitos marcados por imuno-histoquímica para a granzima B nos grupos HIV e controle, segundo o resultado anatomopatológico

Grupo	AP	N	Intervalo	GrB total
HIV	LIEAG	15	5 - 192	36,0
	LIEBG	13	3-138	54,0
	Cervicite leve	4	7 - 36	20,5
	Cervicite aguda	4	119-888	550,5
Controle	LIEAG	16	3-217	58,7
	LIEBG	15	0 - 204	40,3
	Cervicite leve	4	1-5	4,6

GrB – Granzima B

AP – Anatomopatológico

LIEBG – Lesão intra-epitelial de baixo grau

LIEAG – Lesão intra-epitelial de alto grau

N – número de casos

Teste de Mann Whitney

GrB total LIEBG HIV x GrB total LIEBG controle p=0,3814

GrB total LIEAG HIV x GrB total LIEAG controle p=0,9056

Nos casos de NIC, houve predominância estromal nas lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau no grupo HIV e nas lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau no grupo controle (Tabela 2).

TABELA 2 - Média dos linfócitos marcados por imuno-histoquímica para a granzima B no epitélio e no estroma nos grupos HIV e controle, segundo o resultado anatomopatológico

Grupo	AP	GrB epitélio	GrB estroma
HIV	LIEAG	19,7	16,2
	LIEBG	20,8	33,1
	Cervicite leve	12,5	8
	Cervicite aguda	156	394,5
Controle	LIEAG	16,9	41,8
	LIEBG	25,8	14,5
	Cervicite leve	3,3	1,3

GrB – Granzima B

AP – Anatomopatológico

N – número de casos

Teste de Mann Whitney

GrB epitélio LIEBG HIV x GrB epitélio LIEBG controle $p=0,9266$

GrB estroma LIEBG HIV x GrB estroma LIEBG controle $p=0,2617$

GrB epitélio LIEAG HIV x GrB epitélio LIEAG controle $p=0,5271$

GrB estroma LIEAG HIV x GrB estroma LIEAG controle $p=0,1057$

A análise da distribuição da granzima B nos casos de NIC não mostrou diferença estatística entre os grupos HIV e controle. Os resultados de cervicite de ambos os grupos não foram estudados estatisticamente em função do pequeno número de casos.

Nas figuras de 1 a 8 mostram-se fotomicrografias com a imuno-expressão da granzima B nos diversos grupos estudados.

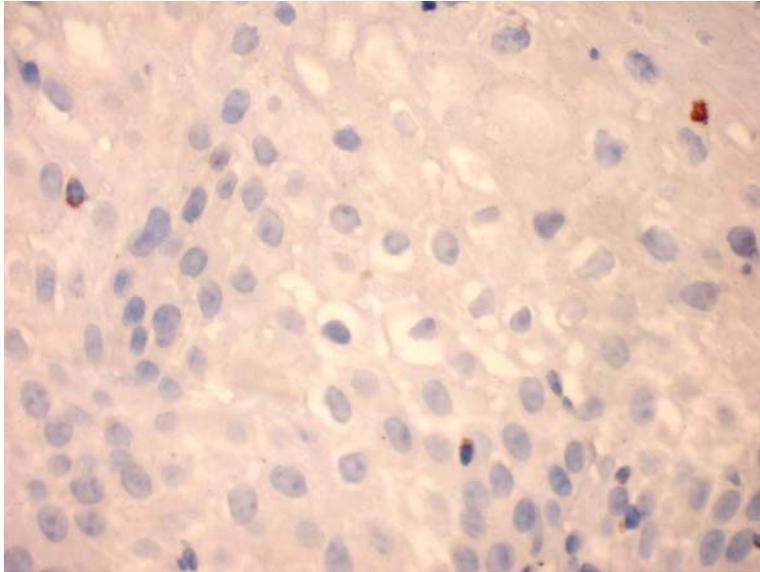


Figura 1- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de LIEBG do grupo controle

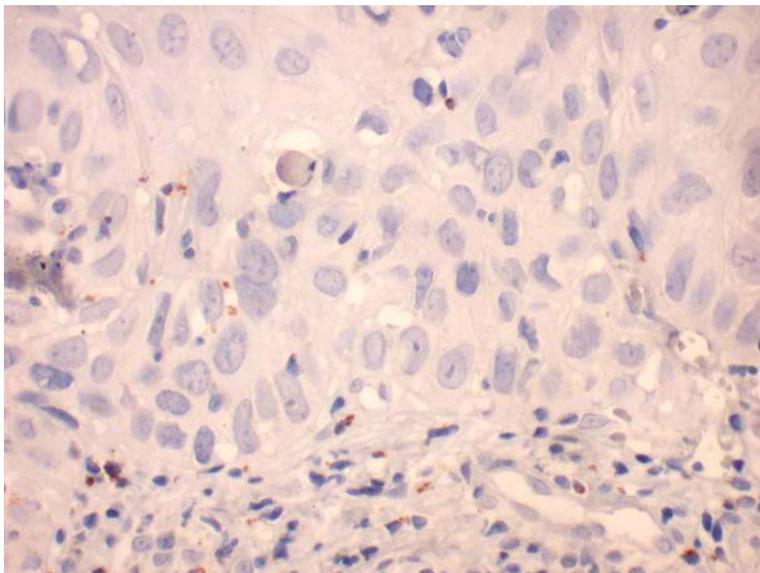


Figura 2- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de LIEAG do grupo controle

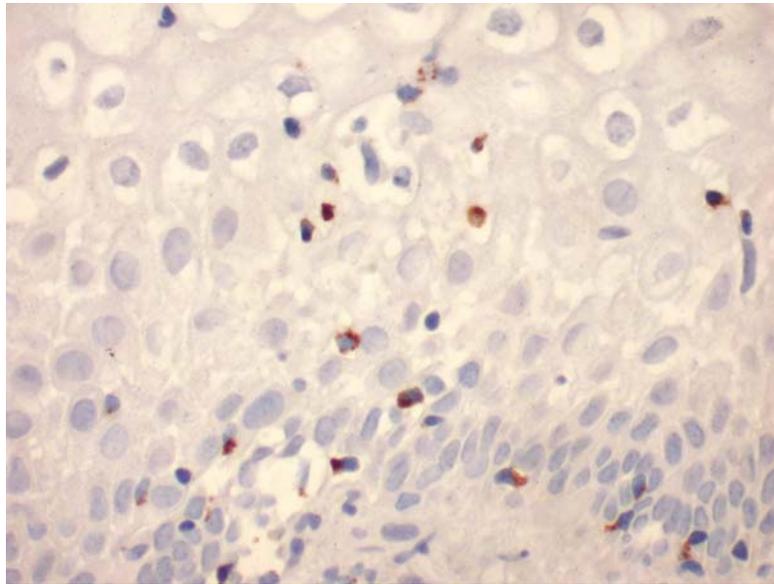


Figura 3- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de LIEBG do grupo HIV-positivo

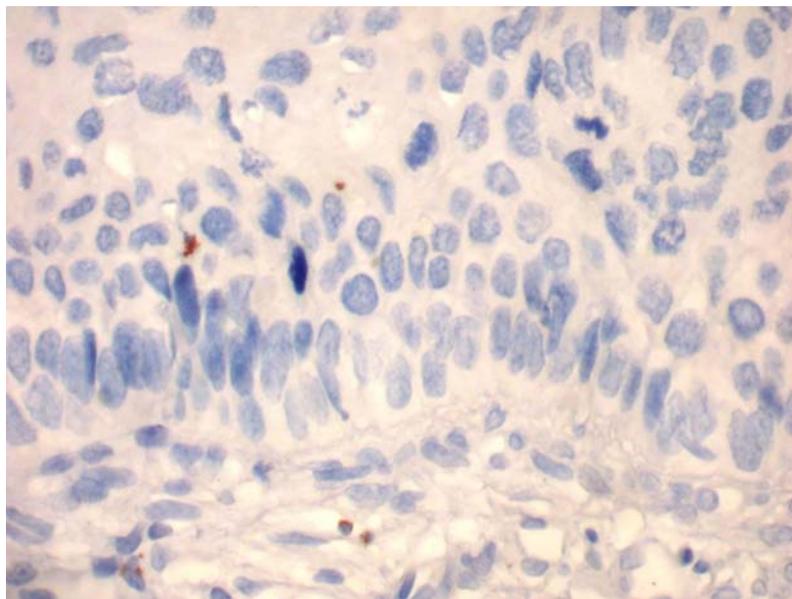


Figura 4- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de LIEAG do grupo HIV-positivo

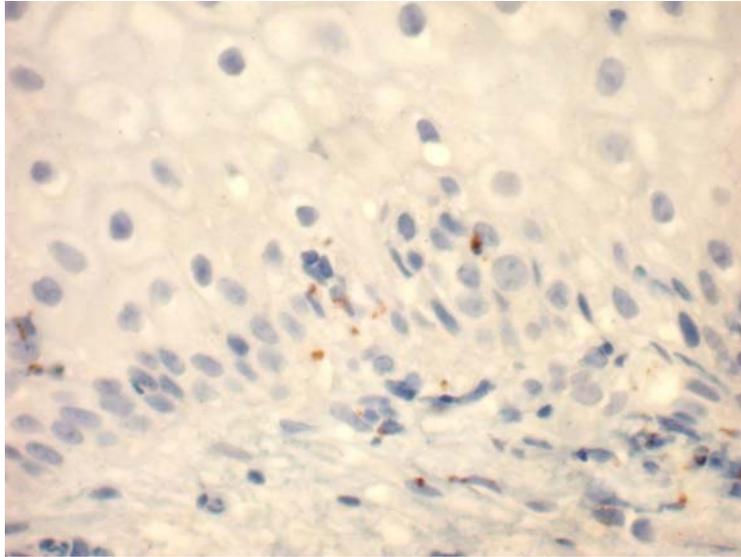


Figura 5- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de cervicite leve do grupo HIV-positivo

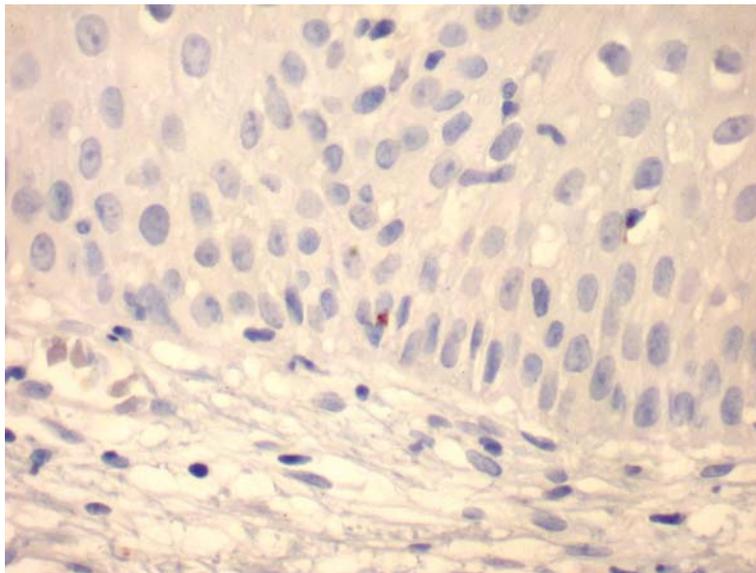


Figura 6- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de cervicite leve do grupo controle

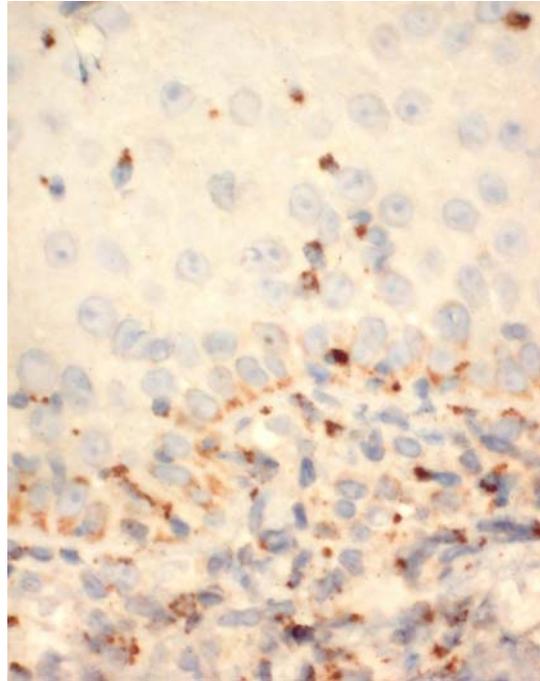


Figura 7- Fotomicrografia evidenciando vários linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) de cervicite aguda do grupo HIV-positivo

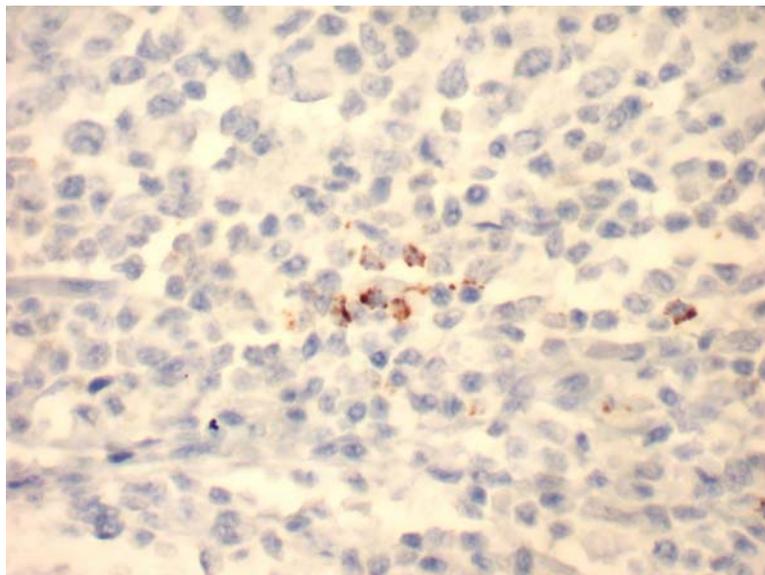


Figura 8- Fotomicrografia evidenciando linfócitos positivos para a granzima B em corte histológico de Imuno-histoquímica (HPF 400X) do grupo controle de tonsila

Foram verificadas a contagem de linfócitos T CD4 e a carga viral de todas as pacientes infectadas pelo HIV. Nas pacientes HIV positivo com NIC, observou-se que 22 (78,57%) pacientes tinham $CD4 > 200/mm^3$ e 10 (35,7%) pacientes tinham carga viral indetectável na época da realização da biópsia ou da conização.

Não houve diferença estatística na comparação entre o número de células marcadas com granzima B das pacientes com contagem de linfócitos T $CD4 > 200/mm^3$ com o daquelas com contagem $\leq 200/mm^3$ (Tabela 3).

TABELA 3 - Média dos linfócitos marcados por imuno-histoquímica para a granzima B no epitélio e no estroma no grupo HIV de acordo com a contagem de CD4

CD4	N	GrB epitélio	GrB estroma	GrB total
>200	22	16,2	22,0	38,2
≤ 200	6	34,8	20,8	55,6

GrB – Granzima B

N – número de casos

CD4 – contagem dos linfócitos T $CD4/mm^3$

Teste de Mann Whitney

GrB epitélio $CD4 > 200$ x GrB epitélio $CD4 > 200$ $p=0,1236$

GrB estroma $CD4 > 200$ x GrB estroma $CD4 > 200$ $p=0,4840$

GrB total $CD4 > 200$ x GrB total $CD4 > 200$ $p=0,5380$

Comparando-se as células marcadas pela granzima B de acordo com a carga viral detectável e indetectável, observou-se predominância da granzima B nas pacientes com carga viral detectável, porém sem diferença estatística (Tabela 4).

TABELA 4 - Média dos linfócitos marcados por imuno-histoquímica para a granzima B no epitélio e no estroma no grupo HIV de acordo com a carga viral

CV	N	GrB epitélio	GrB estroma	GrB total
Indetectável	10	16,6	8,4	25,0
Detectável	18	22,2	29,1	51,4

GrB – Granzima B

N – número de casos

CV – contagem da carga viral pelo método NASBA

Teste de Mann Whitney

GrB epitélio CV detectável x GrB epitélio CV indetectável $p=0,4574$

GrB estroma CV detectável x GrB estroma CV indetectável $p=0,1693$

GrB total CV detectável x GrB total CV indetectável $p=0,2701$

6. DISCUSSÃO

A paciente infectada pelo HIV é sabidamente mais propensa a desenvolver a neoplasia intra-epitelial cervical e o câncer cervical. Não se sabe ao certo como a imunodepressão sistêmica ou o próprio HIV atuam para que fatores imunológicos locais permitam falha no sistema de imunovigilância e o crescimento de células tumorais.

Alguns fatores devem ser levados em consideração nas pacientes infectadas pelo HIV: (a) a alta incidência do vírus HPV, devido a uma provável interação entre os vírus HPV e HIV ou também em função de fatores epidemiológicos como a promiscuidade^{16,57}; (b) a comprovação de alterações ainda não totalmente elucidadas no microambiente imunológico local⁴²; (c) a relativa baixa proporção de câncer de colo nessas pacientes^{20,58}, - há dez anos previa-se que esse câncer atingisse proporções epidêmicas em um futuro próximo²⁸; e (d) o uso de terapia anti-retroviral, que apesar de não eliminar a infecção, tem mudado muito o curso clínico da doença e melhorado significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

Dentre os fatores acima descritos, a presente pesquisa avaliou um parâmetro do microambiente imunológico local: a expressão linfocitária da granzima B na lesão intra-epitelial escamosa cervical. Acreditava-se que a expressão da granzima B estivesse diminuída no colo displásico das pacientes HIV-positivo, já que foi comprovado que essa enzima está diminuída no estroma

das pacientes imunocompetentes que apresentam recidiva da doença, demonstrando seu papel como marcador tumoral de prognóstico.

Observou-se, porém, que não houve diferença estatística no número de células marcadas com a granzima B entre os grupos HIV e controle com NIC. Uma série de outros fatores deve estar envolvida nas pacientes HIV para que elas desenvolvam mais NIC que as pacientes saudáveis, conforme veremos adiante.

Das 71 pacientes estudadas, houve um caso de lesão de baixo grau do grupo controle que não expressou a granzima B, o que também ocorreu no estudo de Bontkes (1997). Reversamente, observou-se infiltração maciça de linfócitos ativados (média de 27 células marcadas por campo de grande aumento) em alguns casos de pacientes infectadas pelo HIV que apresentavam cervicite aguda. Esses valores são muito superiores aos encontrados nos casos de invasão, que variam de 7 a 15 células por campo de grande aumento. É possível que esses valores tenham sido encontrados no processo inflamatório agudo devido ao grande influxo de células mediado por fatores quimiotáticos locais.

No grupo controle, a expressão da granzima B comportou-se conforme já demonstrado na literatura^{11,56}. Houve uma expressão crescente dos linfócitos marcados à medida que se aumenta o grau da lesão (Tabela 1). A baixa expressão ocorrida nos casos sem neoplasia (cervicite leve) confirma os achados da literatura e, apesar do aumento do número de células marcadas nos casos de NIC, a grande variação na quantidade média dos linfócitos marcados: zero a 204 na LIEBG e três a 217 na LIEAG, não permitiu que houvesse diferença estatística entre os valores. É provável que haja diferença estatística das NIC em relação ao

tecido normal, mas esse cálculo não foi realizado em função do pequeno número de pacientes.

No grupo HIV, a menor média de células marcadas encontrada nos casos sem neoplasia (cervicite leve) (Tabela 1), se assemelhou ao ocorrido no grupo controle, conforme esperado. A grande variação no número de células marcadas nos casos de NIC: de três a 138 na LIEBG e de cinco a 192 na LIEAG, também não permitiu que houvesse diferença estatística entre os valores. Apesar dos linfócitos marcados terem atingido maiores proporções na LIEAG, a maioria dos casos demonstrou baixa expressão da granzima B, trazendo a média para valores inferiores. Essa baixa expressão poderia ser decorrente de um alto índice de recidivas nessa população, o que seria interessante objeto para novo estudo.

Dados da literatura mostram que a expressão da granzima B no colo pode variar muito a depender de fatores ainda desconhecidos^{11,55,56}. Ela costuma ser alta nos carcinomas cervicais, mas é muito pouco freqüente nas lesões intra-epiteliais, e talvez por isso, ela ainda não tenha sido comparada entre lesões de alto e baixo grau.

Vários autores têm demonstrado que infiltrados de células se localizam preferencialmente no estroma logo abaixo das lesões displásicas, sugerindo respostas localizadas aos eventos do epitélio^{12,41}. Nessa pesquisa, a quantidade de células marcadas no estroma geralmente se assemelhou aos números do epitélio, sugerindo que apesar do extenso infiltrado que ocorre no estroma, poucas células são ativadas.

As lesões displásicas cervicais na paciente HIV-positivo apresentam grande infiltração linfocitária de células B e T no seu estroma. Em comparação

com as pacientes HIV-negativo, a concentração de linfócitos T citotóxicos no estroma logo abaixo do epitélio displásico é maior nas pacientes HIV positivo¹².

Os linfócitos T citotóxicos TIA-1+ tendem a estar mais concentrados nas NIC de pacientes infectadas pelo HIV. A expressão da TIA-1 ocorre em 80% dos linfócitos T citotóxicos do epitélio e 90% dos do estroma dessas pacientes, enquanto que no grupo sem HIV sua expressão ocorre em 81 e 65% e no grupo normal em 64 e 62%, respectivamente⁴¹.

Bontkes já havia notado em sua pesquisa que nos casos de câncer, a grande maioria dos linfócitos T citotóxicos expressam TIA-1, enquanto que nos casos de NIC essa expressão ocorre em aproximadamente metade dos linfócitos T citotóxicos. Dentre os linfócitos T citotóxicos com fenótipo citotóxico (TIA-1+), a grande maioria realmente estão ativados (GrB+) nos casos de câncer e apenas uma pequena parcela está realmente ativada nos casos de NIC.

Assim, como as pacientes HIV positivo com NIC apresentam mais altas concentrações de linfócitos T citotóxicos TIA-1+, seria de se supor que a quantidade de expressão da granzima B também estivesse aumentada. Por outro lado, como os casos HIV-positivo recidivam mais, poderia se supor que a expressão da granzima B fosse baixa. Talvez a somatória desses fatores tenha deixado sua expressão nos níveis semelhantes ao grupo HIV-negativo, conforme encontrado.

Vários autores já demonstraram que as pacientes HIV-positivo evoluem de forma diferente das HIV-negativo após tratamento padrão para a NIC e que essas pacientes devem ser acompanhadas por protocolos diferentes das demais^{59,60,61,62}.

O risco de recorrência após tratamento ou de progressão na conduta expectante na lesão de baixo grau do colo uterino de paciente HIV-positivo é quatro a cinco vezes maior que na paciente HIV-negativo, principalmente, quando consideramos a contagem de $CD4 < 200/mm^3$. Enquanto nas pacientes HIV-negativo, a recorrência está associada, entre outros fatores, com o grau da lesão, nas pacientes HIV-positivo ela está relacionada ao grau de imunossupressão.

Porém, para Heard e colaboradores, a contagem de $CD4 < 200/mm^3$ se associa a maior risco de recorrência na lesão de alto grau, mas não na de baixo grau⁶⁰.

Procedimentos excisionais são preferidos a tratamentos ablativos ou conduta expectante, para não expor a paciente a maior risco⁶². A conização, embora seja muito efetiva nas pacientes imunocompetentes, parece ser efetiva apenas para prevenir a progressão para câncer e não para erradicar a NIC em pacientes HIV-positivo⁶³.

A introdução dos inibidores da protease e dos inibidores da transcriptase reversa não-nucleotídeos aos regimes de tratamento anti-retroviral em 1995 marcou o início da era de terapia anti-retroviral potente e resultou em melhora drástica nas taxas de morbidade e mortalidade da AIDS, com diminuição da incidência de infecções oportunistas e tumores. No colo uterino, já foi demonstrado efeito protetor da terapia anti-retroviral potente na evolução da NIC. As pacientes em uso adequado da terapia anti-retroviral potente têm menos recorrência da doença do que aquelas que falham no seu uso^{59,60}.

Nesse estudo, todas as pacientes faziam acompanhamento no ambulatório da DIP - HIV, sendo que a maioria delas fazia uso de terapia anti-

retroviral potente e tinha contagem de $CD4 > 200/mm^3$. Esses dados sugerem que essa população deve apresentar menores índices de recidiva da doença, que os normalmente esperados nas pacientes HIV-positivo. Daí, pode-se advir outra possível explicação para a ausência de baixa expressão da granzima B nas pacientes HIV-positivo.

Apesar da falta de relatos da expressão da granzima B nas NIC de pacientes infectadas pelo HIV, alguns autores já estudaram a presença de marcadores de apoptose no colo displásico dessas pacientes^{24,64}, o que em última análise representaria a função das próprias granzimas.

O desequilíbrio do balanço entre proliferação celular e apoptose culmina com a proteção contra o câncer ou o desenvolvimento dele a depender de qual fator se sobressai. Estudos sobre a proliferação celular e apoptose na mucosa cervical normal e patológica mostraram que o índice de apoptose aumenta significativamente com a progressão do NIC para o câncer^{65,66}.

No HIV, a apoptose ocorre nos linfócitos $CD4$ ^{67,68}, levando à imunodepressão. Recentemente, foi descrito aumento da apoptose em doenças ligadas ao HIV entre os neurônios, células endoteliais e cardiomiócitos²⁴.

A fragmentação do DNA, um marcador de apoptose, é mais intensa em biópsias cervicais de epitélio normal e displásico de pacientes HIV-positivo usuárias de drogas injetáveis comparado aos controles HIV-negativo⁶⁴. Além disso, aumento do índice apoptótico das células epiteliais e maior expressão das caspases ocorre nas lesões intra-epiteliais cervicais de pacientes infectadas pelo HIV em relação aos controles HIV-negativo antes do advento da terapia anti-retroviral potente²⁴.

Esses achados contrastam com o resultado da presente pesquisa, pois se há mais apoptose nas lesões displásicas de pacientes infectadas pelo HIV, seria de se esperar que a granzima B, importante mediador da apoptose, teria sua expressão aumentada no colo dessas pacientes. Entretanto, há de se lembrar que o estudo de Walker foi feito antes do advento da terapia anti-retroviral potente, e que o trabalho de Spinillo foi realizado em pacientes HIV-positivo usuárias de drogas injetáveis, população essa que geralmente não adere ao tratamento anti-retroviral.

Os benefícios dos inibidores da protease e inibidores da transcriptase reversa não-nucleotídeos em melhorar o número de linfócitos CD4 parece não ser devido apenas a sua atividade anti-viral, mas a um efeito anti-apoptótico direto. A apoptose linfocitária está significativamente aumentada em indivíduos não tratados, enquanto que o nível de apoptose de pacientes tratados cai a valores similares ao de pacientes controles não infectados pelo HIV⁶⁹.

A expressão da granzima B não mostrou relação com a contagem de células CD4 no sangue periférico. Em outros estudos, os eventos imunológicos locais não demonstram correlação com o grau de imunodepressão^{12,42}.

A contagem de células CD8 no sangue periférico não foi utilizada devido ao fato de que as células CD8 *naive* vêm sendo depletadas desde o estágio assintomático da infecção pelo HIV. O aumento inicial das células CD8 corresponde a expansão clonal dos linfócitos de memória contra o HIV⁷⁰.

Em relação à carga viral, verificou-se que a quantidade de granzima B esteve maior nos casos de carga viral detectável, apesar da ausência de significância estatística. Esse achado concorda com os resultados dos estudos de

apoptose no colo de pacientes HIV- positivo de Walker e Spinillo, que encontraram altas taxas de apoptose em populações de pacientes que provavelmente possuíam alta carga viral, já que não utilizavam terapia anti-retroviral potente e eram usuárias de drogas injetáveis, respectivamente.

Apesar do vírus HIV não infectar as células epiteliais escamosas, ele pode infectar as células de Langerhans dos tecidos escamosos. A eliminação das células apoptóticas pode ser feita por fagócitos como os macrófagos ou outras células dendríticas, como as células de Langerhans. Na NIC de pacientes infectadas pelo HIV, a quantidade de células de Langerhans está diminuída e sua morfologia alterada⁷¹. É possível que suas funções de apresentação de antígeno e eliminação das células apoptóticas estejam prejudicadas. O acúmulo de células apoptóticas seria favorecido por: diminuição do número de células de Langerhans, diminuição do processo fagocítico e a ação citotóxica de proteínas apresentadas pelas células TCD4 e células de Langerhans²⁴.

A atuação do sistema imunológico é essencial na vigilância contra o desenvolvimento de clones tumorais em todo o organismo. A resposta imune inata e adquirida ocorre no tecido displásico do colo. Parece haver linfócitos T supressores contribuindo para a formação de um microambiente imunossupressor. A infecção sistêmica pelo HIV suprime propriedades funcionais da resposta imune cervical, incluindo a produção de INF gama e citocinas regulatórias⁴². As alterações no microambiente imunológico local das pacientes HIV-positivo ainda necessitam serem mais bem elucidadas.

A presente pesquisa demonstra que na resposta imune adquirida, a ativação linfocitária, medida quantitativamente pela expressão da granzima B,

parece ser semelhante entre as lesões pré-malignas de pacientes infectadas pelo HIV e não infectadas. Então, a alta incidência e recorrência da neoplasia intra-epitelial cervical em pacientes infectadas pelo HIV não parecem ser decorrentes de alteração da função dos linfócitos T citotóxicos. Diante da complexidade da resposta imune e das evidências do seu valor na evolução e prognóstico das lesões pré-malignas, novos estudos seriam úteis para se avaliar a possibilidade de valor prognóstico da granzima B no colo uterino de pacientes infectadas pelo HIV.

7. CONCLUSÕES

Do exposto pode-se concluir que:

1. Houve imuno-expressão de granzima B nas células epiteliais e estromais do colo sem neoplasia, do colo com neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau e do colo com neoplasia intra-epitelial de alto grau de pacientes infectadas pelo HIV.
2. Não houve imuno-expressão de granzima B em todos os casos do grupo HIV-negativo. A imuno-expressão da granzima B obedeceu a valores crescentes no tecido de colo sem neoplasia, na neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau e na neoplasia intra-epitelial de alto grau no grupo HIV-negativo.
3. Não houve diferença significativa na imuno-expressão de granzima B entre os casos de neoplasia intra-epitelial cervical das pacientes HIV-positivo e HIV-negativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Guia de tratamento. Recomendações para a profilaxia da transmissão materno-infantil do HIV e terapia anti-retroviral em gestantes. 2001;09.

2 Linhares IM, Duarte G, Giraldo PC. Manual de orientação FEBRASGO DST/AIDS. São Paulo:Ed Ponto, 2004.

3 Maiman M, Fruchter RG, Serur E, Remy JC, Feuer G, Boyce J. Human immunodeficiency virus infection and cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 1990;38:377-82.

4 Boccalon M, Tirelli U, Sopracordevole F, Vaccher E. Intra-epithelial e invasive cervical neoplasia during HIV infection. *European Journal of Cancer* 1996;32(13):2212-17.

5 Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer*. 1994 Jun 15; 57(6):836-40.

6 Levi JE, Kleter B, Quint WGV, Fink MCS, Canto CLM, Matsubara R, et al. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002,Sept; 40(9)3341-5.

7 Kuhn L, Sun XW, Wright TC. HIV infection and female genital tract malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999; 21: 31-41.

8 Mollo A. Infecção por papilomavírus humano em mulheres HIV soropositivas: relação entre a estimativa da carga viral de HPV e os achados citopatológicos cervicovaginais, a quantificação de células CD4 positivas e a carga viral do vírus da imunodeficiência humana [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2002.

9 Jenne DE, Tschopp J. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytotoxic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol Rev* 1988;103:53-71.

10 Espersen C, Pakkenberg B, Harder E, Pallesen G, Gerstoff J, Pedersen BK, Ullum H. High levels of CD8-positive lymphocytes expressing CD45RO, granzyme B, and Ki-67 in lymph nodes of HIV infected individuals are not

associated with increased mortality. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Mar 1;17(4):287-93.

11 Kondo MC, Ribalta JC, da Silva ID, Alves MT, de Azevedo Focchi GR, Martins NV, Focchi J, Granzima B as a prognostic marker of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005;26(1):87-9.

12 Bell MC, Schmidt-Grimminger D, Turbat-Herrera E, Tucker A, Harkins L, Prentice N, Crowley-Nowick PA. HIV+ patients have increased lymphocyte infiltrates in CIN lesions. *Gynecol Oncol* 2000;76(3):315-9.

13 http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326

14 Schiffman MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1345-47.

15 Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB. Oncogenic associations of specific papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Nat Cancer Institute* 1987;79:671-7.

16 Pinto, Álvaro P, Tulio, Siumara e Cruz, Olívia R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2002 jan./mar.;48(1):73-8.

17 Riethmuller D, Schaal JP, Mouglin C. Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus. *Gynecol Obstet Fertil*. 2002 Feb;30(2): 139-46.

18 Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia (SBPTGIC). Manual de Normas e Rotinas em Patologia do Trato Genital Inferior e em Colposcopia. Infecção por Papilomavírus humano.2000,43-51.

19 Shah KV. Biology of human genital tract papillomaviruses. In: Holmes KK, Mårdh PA, Sparling PF, Wiesner PJ, eds *Sexually transmitted diseases*. 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill Inc; 1990: 425-31.

20 La Ruche G, Ramon R, Mensah-Ado I, Bergeron C, Diomande M, Sylla-Koko F, et al. Squamous intraepithelial lesions of the cervix, invasive cervical carcinoma and immunosuppression induced by human immunodeficiency virus in Africa. *Cancer* 1998;82(12):2401-8.

21 Naud PSV, Becker JRE, Matos JC, Fedrizzi EN, Chaves EM. Infecção pelo HIV na mulher. In: *Tratado de Ginecologia da FEBRASGO*. Ed Revinter,2000, p.754-8.

22 Mandelblatt JS, Kanetsky P, Eggert L, Gold K. Is HIV infections a cofactor for cervical squamous cell neoplasia? *Cancer Epidemiol Biom and Prev*

1999;8:97-106.

23 Palefsky JM, Minkoff H, Critchlow CW. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:226-36.

24 Walker F, Adle-Biassette H, Madelenat P, Hénin D, Lehy T. Increased apoptosis in cervical intraepithelial neoplasia associated with HIV infection: implication of oncogenic human papillomavirus, caspases, and Langerhans cells. *Clinical Cancer Research* 2005 April;11:2451-58.

25 Auge APF, Piato S, Frade AB, et al. Frequência de neoplasia intra-epitelial em portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2000;22:573-77.

26 Maiman M, Fruchter RG, Sedlis A, et al. Prevalence, risk factors, and accuracy of cytologic screening for cervical intraepithelial neoplasia in woman with the human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol* 1998;68:233-9.

27 Robinson WR, Barnes SE, Adams S, Perrin MS. Histology/cytology discrepancies in HIV-infected obstetric patients with normal pap smears. *Gynecol Oncol* 1997;65:430-3.

28 Boardman LA, Peipert JF, Cooper AS, Cu-Uvin S, Flanigan T, Raphael SI. Cytologic-histologic discrepancy in human immunodeficiency virus-positive women referred to a colposcopy clinic. *Gynecol Oncol* 1994;84:1016-20.

29 Coelho RA, Facundo MKF, Nogueira AL, Sakano CRSB, Ribalta JCL, Baracat EC. Relação entre diagnóstico citopatológico de neoplasia intra-epitelial cervical e índices de células CD4+ e de carga viral em pacientes HIV-soropositivas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2004;26:97-102.

30 Saag MS. Quantitation of HIV viral load: a tool for clinical practice? In: Sande MA, Volberding PA, editors. *The medical management of AIDS*. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997. p.57-74.

31 Araújo ACL, Melo VH, Castro LPF, Aleixo AV. Carga viral do HIV como fator de risco das lesões intra-epiteliais escamosas cervicais. *Femina* 2004;32:517-21.

32 Cardillo M, Hagan R, Abadi J, Abadi MA. CD4 T-cell count, viral load, and squamous intraepithelial lesions in women infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer* 2001 Apr 25;93(2):111-4.

33 Delmas MC, Larsen C, Van Benthem B, Hamers FF, Bergeron C, Poveda JD, et al. Cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women:

prevalence, incidence and regression. European Study Group on Natural History of HIV Infection in Women. *AIDS* 2000 Aug 18;14(12):1775-84.

34 Heard I, Tassie JM, Kazatchkine MD, Orth G. Highly active antiretroviral therapy enhances regression of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive women. *AIDS* 2002;16(13):1799-1802.

35 Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 2003;348:203-13.

36 Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res*, 2001;61:3932-6.

37 Oshikiri T, Miyamoto M, Shichinohe T, et al Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J Surg Oncol*, 2003;84:224-8.

38 Selvakumar R, Schmitt A, Iftner T, Ahmed R, Wettstein FO. Regression of papillomas induced by cottontail rabbit papillomavirus is associated with infiltration of CD8+ cells and persistence of viral DNA after regression. *J Virol*, 1997;71:5540-8.

39 Knowles G, O'Neil BW, Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol*, 1996;70:8451-8.

40 Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol rev*. 2003; 193(1): 31-8.

41 Ahmed SM, Al-Doujaily H, Reid WNM, Johnson MA, Poulter LW. The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects. *Scand J Immunol* 2002;56:204-11.

42 Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer research* 2004 September 15;64:6766-74.

43 Vasconcelos AC, Machado DO, Frasson MC, Oréfice F. Apoptose. In: Oréfice F. Uveíte. 2nd ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro-RJ;2005: 79-84.

44 Munakata S, Watanabe O, Ohashi K, Morino H. Expression of Fas ligand and bcl-2 in cervical carcinoma and their prognostic significance. *Am J Clin Pathol*. 2005 Jun; 123(6): 879-85.

45 Heusel JW, Wesselschmidt SS, Russel JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require Granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogenic target cells. *Cell* 1994;76:977-87.

46 Blink EJ, Trapani JÁ, Jans DA. Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes; a central in the nuclear events of granule exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol Cell Biol* 1999;77(3):206-15.

47 Kim GE, Yang WI, Lee S, Suh CO, Yoon JH, Chung HC, Kim BS. The significance of granzyme B expression in patients with angiocentric lymphoma of the head and neck. *Cancer*. 2001 Jun 15; 91(12): 2343-52.

48 ten Berge RL, Oudejans JJ, Dukers DF, Meijer JW, Ossenkoppele GJ, Meijer, CJ. Percentage of activated cytotoxic T-lymphocytes in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's disease: an independent biological prognostic marker. *Leukemia*. 2001 Mar;15(3):458-64.

49 Hong SW, Jeong HJ, Kim SI, Moon JI, Kim YS, Park K. Granzyme B and TIA-1 expression in chronic and acute on chronic renal allograft rejection. *Yonsei Med J*. 2001 Jun; 42 (3);285-90.

50 Kotani K, Sawai S, Hanaoka J, Tezuka N, Inoue S, Fujino S. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. *Eur J Oncol* 2001 Mar;27(2):180-6.

51 Koopman G, Wever PC, Rankema MD, Bellot F, Reiss P, Keehnen RM, Ten Berge IJ, Pals ST. Expression of granzyme B by cytotoxic T lymphocytes in the lymph nodes of HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997 Feb 10;13(3):227-33.

52 Snijders F, Wever PC, Danner SA, Hack CE, ten Kate FJ, ten Berge IJ. Increased numbers of granzyme-B-expressing cytotoxic T-lymphocytes in the small intestine of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996 Jul;12(3):276-81.

53 Yang OO, Lin H, Dagarag M, Ng HL, Effros RB, Uittenbogaart CH. Decreased perforin and granzyme B expression in senescent HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Virology* 2005;332:16-19.

54 Jaspan HB, Gaumer HR, Garry RF. Expression of granzyme B mRNA is altered in human immunodeficiency virus infected patients. *Exp Mol Pathol* 2003 Feb;74(1):13-6.

55 Cromme FV, Walboomers JM, Van Oostveen JW, Stukart MJ, De Gruijil TD, Kummer JA, Leonhart AM, Helmerhorst TJ, Meijer CJ. Lack of granzyme B expression in T lymphocytes indicates poor cytotoxic T lymphocyte activation in

human papillomavirus associated cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 1995 Sep; 5(5):366-73.

56 Bontkes HJ, Gruijl TD, Walboomers JMM, Van Den Muysenberg AJC, Gunther AW, Scheper RJ. Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA I in cervical neoplastic lesions. *Brit J Cancer* 1997;76(10):1353-60.

57 Levi JE, Fink MC, Canto CL, Carretiero N, Matsubara R, Linhares I, et al. Human papillomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Cancer Epidemiol Biom & Prev* 1999 Aug;8:729-30.

58 Phelps RM, Smith DK, Heilig CM, Gardner LI, Carpenter CCJ, Klein RS, Jamieson DJ, Vlahov D, Schuman P, Holmberg SD. Cancer incidence in woman with or at risk for HIV. *Int J Cancer*.2001;94:753-57.

59 Gilles C, Manigart Y, Konopnicki D, Barlow P, Rozenberg S. Management and outcome of cervical intraepithelial neoplasia lesions: a study of matched cases according to HIV status. *Gynecol Oncol*. 2005 Jan;96(1):112-8.

60 Heard I, Potard V, Foulot H, Chapron C, Costagliola D, Kazatchkine MD. High rate of recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after surgery in HIV-positive women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Aug 1;39(4):412-8.

61 Massad LS, Evans CT, Minkoff H, Watts DH, Strickler HD, Darragh T, et al. Natural history of grade 1 cervical intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*. 2004 Nov;104(5 Pt 1):1077-85.

62 Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Elsevier* 2005 Aug 1;121(2):226-32.

63 Holcomb K, Matthews RP, Chapman JE, Abulafia O, Lee YC, Borges A, Buhl A. The efficacy of cervical conization in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-positive women. *Gynecol oncology*.1999; 74:428-31.

64 Spinillo A, Zara F, Sappatore R, Cesari S, Bergante C, Morbini P. Apoptosis-related proteins and cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Gynecol Oncol*. 2004 Dec;95(3):500-5.

65 Duttagupta C, Basu J, Ray M, Romney SL. Apoptotic changes in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52:38-42.

66 Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Lee MC, Park CS. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in progression of cervical neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 2002;24:103–13.

67 Muthumani K, Hwang DS, Desai BM, et al. HIV-1 Vpr apoptosis induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 2002;277:37820–31.

68 Bartz SR, Emerman M. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *J Virol* 1999;73:1956–63.

69 Benito JM, Lopez M, Martin JC, et al. Differences in cellular activation and apoptosis in HIV-infected patients receiving protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1379–88.

70 Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5): 2061-6.

71 Olaitan O, Johnson MA, MacLean A, Poulter LW. The distribution of immunocompetent cells in the genital tract of HIV-positive women. *AIDS* 1996;10:759–64.

ANEXO 1

TABELA 5 - Distribuição das 71 pacientes segundo a identificação, número de linfócitos com a coloração imuno-histoquímica para a granzima B, em localização epitelial e estromal, seguido por resultado anatomopatológico, grupo HIV ou controle e valores da carga viral e contagem de CD4/mm³ no grupo HIV

Caso	GrB epitélio	GrB estroma	AP	Grupo	CV	CD4
1	4	1	LIEBG	HIV	<80	152
2	6	2	LIEBG	HIV	<80	608
3	11	3	LIEBG	HIV	<80	714
4	4	19	LIEBG	HIV	<80	275
5	71	67	LIEBG	HIV	30000	293
6	91	cnr	LIEBG	HIV	<80	632
7	5	7	LIEBG	HIV	59000	200
8	3	cnr	LIEBG	HIV	32000	405
9	1	10	LIEBG	HIV	200	752
10	28	54	LIEBG	HIV	1200	317
11	16	84	LIEBG	HIV	2000	320
12	27	89	LIEBG	HIV	1500	450
13	4	29	LIEBG	HIV	<80	454
14	14	5	LIEAG	HIV	650	278
15	8	4	LIEAG	HIV	160	670
16	59	6	LIEAG	HIV	4500	160
17	32	9	LIEAG	HIV	<80	490
18	8	11	LIEAG	HIV	<80	551
19	3	2	LIEAG	HIV	580	346
20	34	2	LIEAG	HIV	6000	18
21	4	6	LIEAG	HIV	<80	448
22	93	99	LIEAG	HIV	1800	192
23	3	27	LIEAG	HIV	850	675
24	14	10	LIEAG	HIV	3600	147
25	14	49	LIEAG	HIV	590	550
26	2	4	LIEAG	HIV	<80	603
27	2	6	LIEAG	HIV	870	390
28	6	4	LIEAG	HIV	1000	460
29	7	15	Cervicite leve	HIV	2600	440
30	4	3	Cervicite leve	HIV	<80	649
31	36	cnr	Cervicite leve	HIV	<80	528
32	3	6	Cervicite leve	HIV	1700	491
33	59	60	Cervicite aguda	HIV	<80	453
34	44	736	Cervicite aguda	HIV	1200	390
35	463	425	Cervicite aguda	HIV	<80	583
36	58	357	Cervicite aguda	HIV	70000	172

37	0	0	LIEBG	Controle
38	10	12	LIEBG	Controle
39	27	19	LIEBG	Controle
40	4	cnr	LIEBG	Controle
41	8	12	LIEBG	Controle
42	5	2	LIEBG	Controle
43	142	62	LIEBG	Controle
44	4	5	LIEBG	Controle
45	17	26	LIEBG	Controle
46	68	30	LIEBG	Controle
47	1	3	LIEBG	Controle
48	4	2	LIEBG	Controle
49	1	7	LIEBG	Controle
50	64	17	LIEBG	Controle
51	32	6	LIEBG	Controle
52	62	155	LIEAG	Controle
53	45	72	LIEAG	Controle
54	39	125	LIEAG	Controle
55	8	7	LIEAG	Controle
56	61	60	LIEAG	Controle
57	12	89	LIEAG	Controle
58	10	cnr	LIEAG	Controle
59	4	12	LIEAG	Controle
60	5	22	LIEAG	Controle
61	3	8	LIEAG	Controle
62	0	6	LIEAG	Controle
63	6	12	LIEAG	Controle
64	2	3	LIEAG	Controle
65	1	2	LIEAG	Controle
66	1	2	LIEAG	Controle
67	12	94	LIEAG	Controle
68	3	2	Cervicite leve	Controle
69	3	cnr	Cervicite leve	Controle
70	1	1	Cervicite leve	Controle
71	enr	1	Cervicite leve	Controle

GrB – Granzima B

AP – Anatomopatológico

LIEBG – Lesão intra-epitelial de baixo grau

LIEAG – Lesão intra-epitelial de alto grau

CD4 – contagem dos linfócitos T CD4/mm³

CV – contagem da carga viral pelo método NASBA

enr – epitélio não representativo

cnr – córion não representativo

ANEXO 2

Data _____

Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Este estudo está sendo conduzido pela Dra Klissia Pires Souza Piccinin.

Por que o estudo está sendo feito?

A finalidade deste estudo é pesquisar a função dos linfócitos, nossas células de defesa, na doença pré-maligna do colo do útero de pessoas infectadas pelo vírus HIV e comparar os resultados com pessoas não infectadas pelo vírus. Esses resultados ajudarão no entendimento de como fica o sistema de defesa do colo uterino na presença do vírus da AIDS para possibilitar o tratamento adequado.

O que se sabe sobre esse assunto?

Sabe-se que os linfócitos, nossas células de defesa, eliminam as células cancerígenas do organismo. Os linfócitos estão presentes em quantidades aumentadas no colo uterino de pessoas portadoras do vírus HIV, porém não há estudos sobre a função dessas células no colo uterino. Acredita-se que a função dos linfócitos esteja prejudicada na presença do vírus HIV.

Quem participará deste estudo?

Poderão participar deste estudo as mulheres portadoras ou não do HIV, que apresentarem alteração no exame de preventivo e/ou colposcopia e necessitarem de biópsia do colo do útero para confirmação diagnóstica e tratamento, ou aquelas que já realizaram a biópsia e necessitam de conização do colo uterino para tratamento.

Quem não pode ou não deve participar do estudo?

Pessoas que não atendam aos critérios estipulados pela pesquisadora, conforme acima descrito.

O que serei solicitada a fazer?

Você será solicitada a autorizar que após a análise da peça de biópsia ou conização pelo patologista, o material seja usado para o estudo dessa pesquisa.

Quanto tempo estarei no estudo?

Você estará no estudo apenas durante o tempo habitual de uma biópsia ou conização, em torno de 5 a 10 minutos.

Quantas outras pessoas estarão participando do estudo?

Um grupo de 60 pessoas será estudado.

Que prejuízos (ou efeitos adversos) podem acontecer comigo se eu participar desse estudo?

Você poderá sentir cólica ou não sentir nada. Após o procedimento poucas pessoas sentem cólicas leves por um período breve de uma a duas horas.

Que benefício eu posso esperar?

Você estará colaborando para melhorarmos o conhecimento sobre o sistema imune de portadoras do HIV e com isso facilitar um tratamento efetivo para as pessoas doentes num futuro próximo. Além disso, você poderá ter acesso às informações do estudo quando desejar.

Quem poderá ver os meus registros e saber que estou participando do estudo?

Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei, somente a pesquisadora e o Comitê de Ética independente terão acesso aos seus dados para verificar as informações do estudo.

Quem devo chamar se tiver qualquer dúvida ou algum problema?

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo, ligue para 345-3098. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFMS, no telefone 387-3093 – ramal 2299.

Eu posso recusar a participar do estudo?

Sim, sua participação é voluntária. Caso você não queira participar do estudo, não haverá qualquer prejuízo no seu acompanhamento e tratamento.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntária a tomar parte neste estudo.

Assinatura do voluntário _____

Assinatura da pesquisadora _____

ANEXO 3 – Carta de aprovação do Comitê de Ética