



Ministério da Saúde

**Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS**

ANA TERESA GOMES FERNANDES

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO GÊNICA
DE MARCADORES DE APOPTOSE LIGADOS
CARCINOGENESE CERVICAL INDUZIDA PELO HPV EM
MULHERES INFECTADAS OU NÃO PELO HIV**

**Rio de Janeiro
2011**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO GÊNICA
DE MARCADORES DE APOPTOSE LIGADOS
CARCINOGENESE CERVICAL INDUZIDA PELO HPV EM
MULHERES INFECTADAS OU NÃO PELO HIV**

ANA TERESA GOMES FERNANDES

**Tese apresentada ao Curso de
Doutorado do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro
Chagas para obtenção do grau
de doutor em Pesquisa Clínica
em Doenças Infecciosas
Orientadora: Dra Maria da
Glória Bonecini de Almeida**

Rio de Janeiro

Outubro/2011

ANA TERESA GOMES FERNANDES

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO GÊNICA
DE MARCADORES DE APOPTOSE LIGADOS
CARCINOGENESE CERVICAL INDUZIDA PELO HPV EM
MULHERES INFECTADAS OU NÃO PELO HIV**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado do Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de doutor em
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas

Orientadora: Dra Maria da Glória Bonecini de Almeida

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora

Dra. Maria José Andrade Serpa – IPEC/Fiocruz (Presidente da banca)

Dra. Dra. Rosely Zancopé Oliveira – IPEC/Fiocruz

Dra. Fátima Conceição Silva – IOC/Fiocruz

Dr Fabio Russomano – IFF/Fiocruz

Dr. Rodrigo da Cunha Bisaggio – IFRJ

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por mais uma bênção na minha vida, e aos meus pais Ernani e Francisca, por todo o amor, carinho e força imprescindíveis neste período.

Agradecimentos

Nesse momento, gostaria de agradecer a todos que me ajudaram e incentivaram a completar mais uma etapa de minha vida profissional e pessoal neste período tão turbulento e emocionante da minha vida. Caso não lembre de todos, me perdoem, mas se sintam homenageados da mesma forma.

- Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu Deus Vivo, que tem sido a minha fonte de vida, força e esperança, o meu Verdadeiro Amigo e Pai, onde encontrei toda paz e sossego principalmente em que me vi sozinha. *Acima de todas as coisas, te amo, meu Paizinho querido;*
- Aos meus pais, Ernani e Francisca, exemplos de vida para mim em tudo. Não há palavras que possam ser expressas aqui para agradecer tamanho carinho e amor, que com certeza foram essenciais para a conclusão de mais uma etapa da minha vida;
- Ao meu “maninho” André, pelo seu amor, carinho e companheirismo nesses anos todos de vida. Ter um irmão que nem o meu é um privilégio que poucos têm;
- À minha orientadora, Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida, por ter mais uma vez me confiado um trabalho tão lindo e importante, e ter me ensinado, como ser uma pessoa melhor tanto na profissão quanto na vida;
- Ao Dr. Fábio Russomano (IFF) e à Dra. Beatriz Grinsztejn (IPEC) pela obtenção do material biológico das pacientes com lesões cervicais utilizado neste presente estudo;
- À Dra. Jacyara Macedo e ao Dr. Evandro Klumb (UERJ) pela obtenção do material biológico do grupo controle utilizado neste presente estudo;
- À Elyzabeth Avvad, por sua importante ajuda tanto na inclusão das mulheres atendidas no IFF, agilizando consideravelmente nosso trabalho, quanto na obtenção das amostras parafenizadas para avaliação da expressão gênica;
- Aos membros da banca examinadora: Dra. Maria José Serpa Andrade, Dra. Rosely Zancopé Oliveira, Dr. Fábio Russomano, Dra. Fátima Conceição

Silva e Dr. Rodrigo da Cunha Bisaggio, por terem aceitado a participar da avaliação do presente estudo;

- À Dra. Cynthia Horn, pelas inúmeras conversas e conselhos sobre minha vida profissional e, também, pessoal. Seu carinho e amizade, sempre presentes, foram e serão muito importantes para mim;
- Ao Dr. Otoniel Martinez Maza, pela excelente oportunidade de realizar parte deste doutorado na UCLA, onde pude crescer profissional e pessoalmente;
- À Diretora Prof^a. Leopoldina Souza Marques, por ter me liberado da ministração das aulas do curso de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Fundação Técnico Educacional Souza Marques, e incentivado a realizar parte deste estudo fora;
- À Elena Vendrame, por ter me treinado para realizar a avaliação e análise da expressão gênica realizada neste estudo e ter me dado todo o apoio dentro da UCLA;
- À Natália Rocha, por seu companheirismo e por ser os meus braços direito e esquerdo na execução deste estudo nos momentos em que estava fora do país ou enrolada na dissertação da tese e artigos;
- À Ana Cristina CS Leandro, companheira nesses quinze anos de estrada na profissão. Obrigada, amiga, por sua amizade e carinho que foram especiais e imprescindíveis na conclusão de mais uma etapa na minha vida tanto aqui quanto nos EUA;
- À minha amiga mais do que especial, Márcia Rocha, que viveu intensamente cada alegria e tristeza desta fase. Não tenho palavras para agradecer tamanho amor e carinho;
- À Monique Lima, por seu companheirismo e amizade que foram importantes e essenciais na conclusão deste estudo;
- À Carla Blal, minha amiga irmã, por todo o carinho e amizade que foram sem sombra de dúvidas primordiais nessa etapa da minha vida. *Te amo!*;
- Aos demais colegas do Laboratório de Imunologia: Igor, Andreia, Larissa, Marcio, Thiago, Paulo, Dyego, Davi, Ana Carolini e Eduardo, pelos vários momentos de descontração, que para mim foram importantíssimos;
- À minha amiga e irmã Rosane por seu companheirismo e apoio nos 7 meses que estive em LA. Eu não tenho palavras para agradecer tamanho

carinho, apoio e amor que recebi dela. *Eu agradeço a Deus novamente por ter me posto você na minha vida. Obrigada por tudo, essa vitória também é sua;*

- A Maristela e Eduardo, por sua amizade e carinho mesmo fora do laboratório, passando mensagens sempre carinhosas de incentivo;
- Aos meus amados amigos Priscila, Ana Paula, Claudinha, Fernanda e Julinho por estarem sempre presente em todos os momentos marcantes, e até os não marcantes da minha vida;
- À minha cunhada querida Patrícia e sobrinho de consideração Matheus, por alegrar mais a minha vida nesta etapa final;
- Aos meus alunos da Souza Marques por todo apoio, carinho e torcida principalmente nessa etapa final do trabalho;
- Em especial a todas as pacientes que aceitaram a participar deste estudo, contribuindo, assim, para melhor compreensão a respeito das infecções estudadas.

**“Bem-aventurado o homem que acha
sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento”
(Provérbios 3.13)**

RESUMO

A citotoxicidade mediada por células desempenha um importante papel na regulação da infecção pelo HPV e na formação de tumores. Apoptose é regulada por diferentes vias envolvendo genes que promovem (*BAX*) ou inibem (*BCL2*) a morte celular. Avaliamos a presença de células cervicais inflamatórias, marcadores apoptóticos (*BAX*, *BCL-2*, *FasL*, *NOS2*, perforina) e o marcador de degranulação (*CD107a*) em mulheres HPV e HPV/HIV através da técnica de imunohistoquímica. Uma alta porcentagem de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ foram observadas em ambos os grupos, com baixa contagem de células T $CD4^+$ em mulheres HPV/HIV. Houve poucas células expressando *FasL*, *BAX* e *BCL-2* em ambos os grupos. A expressão de *NOS2* estava presente especialmente em queratinócitos na camada basal do epitélio em ambos os grupos. Perforina foi identificada em poucas células cervicais. Contudo, *CD107a* foi detectado na camada basal do epitélio e estroma, principalmente em mulheres HPV. Determinamos se os SNPs em promotores dos genes *BCL2* (-938C>A) e *BAX* (-248G>A) estariam associados com o risco de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). A frequência observada desses SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos casos e controles. Nenhuma diferença estatística na frequência genotípica e alélica do polimorfismo de *BCL-2* (-938C>A) foi observada entre casos e controles. Contudo, uma forte associação foi identificada na frequência do genótipo GG de *BAX* (-248G>A) entre os casos e controles. Quando os grupos de LSIL e HSIL foram comparados, nenhuma diferença estatística foi observada, indicando que o genótipo GG pode influenciar no aparecimento de lesões cervicais, mas não na gravidade da doença. Analisamos a expressão de RNAm de genes associados a apoptose (*BAX*, *BCL2*, *p53* e *pRb*) e citotoxicidade (perforina e *Fas*). Quando a expressão de RNAm de Perforina e *Fas* foram avaliadas, diferença estatística foi observadas em pacientes portadoras de NIC III e câncer. Observamos diferença estatística entre os controles e todos os casos, quando analisamos a expressão de RNAm de *p53*, mas não de *pRb*, sendo observada diferença apenas nos controles e NIC II e III. Na análise de RNAm de *BCL2*, notamos uma baixa expressão no grupo de câncer quando comparado com NIC II, III e controle. Em conclusão, a infecção pelo HIV pode induzir redução na degranulação de células inflamatórias, corroborando para a progressão de infecção pelo HPV, e que carreadoras do alelo G na região promotora de *BAX* (-248G>A) pode estar associado ao desenvolvimento de NIC quando comparado com as carreadoras do alelo A, possuindo papel protetor; contudo o alelo G não está correlacionado com a gravidade da doença.

ABSTRACT

Cell-mediated cytotoxicity plays an important role in the regulation of HPV infection, and in tumor formation. Apoptosis is regulated by different pathways involving a number of genes that either promote (*BAX* gene) or inhibit (*BCL2* gene) the cell death. We evaluated the presence of cervical inflammatory cells, apoptotic (Bax, Bcl-2, FasL, NOS2, perforin) markers and the degranulating expressing cell marker (CD107a) from HPV and HPV/HIV women. Higher percentage of cervical CD4⁺ and CD8⁺T cells were observed in both groups, with lower CD4⁺T cells count observed in HPV/HIV women. There were few FasL, Bax and Bcl-2 inflammatory cervical expressing cells in both groups. NOS2 expression was present especially in the epithelium basal layer on keratinocytes in both groups. Perforin was identified in few cervical cells. However, CD107a was detected in the epithelium basal layer and stroma, mainly on HPV women. We determined whether the SNPs of *BCL2* (-938C>A) and *BAX* (-248G>A) promoters are associated with risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) outcome. The observed genotype frequencies of these SNPs were in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium in cases and control groups. No statistical difference in genotype and allelic frequency of *BCL2* (-938C>A) polymorphism was observed between all cases and control groups. However, a strong association was identified in GG genotype frequency of *BAX* (-248G>A) polymorphism between cases and controls. When LSIL and HSIL groups were compared, no statistical difference was observed, indicating that GG genotype may influence the risk of CIN but not the lesion severity. We analyzed the mRNA expression of apoptosis-associated genes (*BAX*, *BCL2*, *p53* and *pRb*) and cytotoxicity-related genes (*perforin* and *Fas*). When Fas and Perforin mRNA expressions were evaluated, the statistical difference between CIN III and cancer was seen. We observed a statistical difference between control and all cases, when we analyzed p53 mRNA, but in pRb mRNA, we observed difference between control group and CIN II or CIN III. In *BCL2* mRNA evaluation, we observed low expression in cancer group when compare with CIN II, III and control. In relation to *BAX* mRNA, a statistical difference was evaluated with all cases and control. In conclusion, HIV infection may induce reduction on inflammatory cervical cells degranulation corroborating to HPV progression and allele G carriers in the promoter regions of *BAX* (-248G>A) can be related to CIN development when compared with allele A carriers that play a protective role; however, allele G was not correlated with the disease severity.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Detecção de DNA viral por hibridização <i>in situ</i> em lesão cervical.	01
2. Desenho esquemático exemplificando os tipos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em grau 1, 2 e 3 e câncer cervical (CaCx). A lesão de NIC1 é denominada lesão escamosa de baixo grau (LSIL) e as lesões de NIC2 e 3 são denominadas lesões escamosas de alto grau. As setas vermelhas, verdes e azuis, indicam respectivamente a expressão das proteínas E7, E4 e DNA viral do HPV na carcinogênese	02
3. Modelo esquemático da infecção pelo HPV	04
4. Células T citotóxicas em processo de eliminação da célula alvo	06
5. Análise imunohistoquímica da presença da expressão de TNF- α em biópsias da cérvix uterina de mulheres infectadas somente pelo HPV (figura A) e co-infectadas pelo HIV (figura B)	11
6. Expressão de RNAm das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle.	64
7. Expressão de RNAm de Fas e Perforina em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle.	65
8. Porcentagem de expressão de RNAm de pRb e p53 em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle.	66
9. Porcentagem de expressão de RNAm de BAX e BCL2 em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle.	67

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Relação dos anticorpos monoclonais	18
2. Dados comportamentais em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical	62
3. Expressão gênica dos genes relacionados ao ciclo celular e citotoxicidade	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP – *Adenosine monophosphate* (adenosina monofostato)
- CD – *Cluster of Differentiation* (marcadores de diferenciação)
- CDK – *Cyclin-dependent Kinase* (quinase dependente de ciclina)
- CIN – *Cervical intraepithelial neoplasia* (Neoplasia Intraepitelial Cervical)
- CTL – *Cytotoxic T Lymphocytes* (linfócitos T citotóxicos)
- DISC - *death-inducing signaling complex* (complexo funcional de sinalização para morte celular)
- DNA – *Desoxyribonucleotide acid* (Ácido Dexoribonucleotídeo)
- DST – Doença Sexualmente Transmissível
- eNOS - *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintase endotelial)
- FADD – *Fas-associated death domain* (domínio de morte associado ao Fas)
- Fas-L – *Fas Ligand* (ligante de Fas)
- HE – Hematoxilina e Eosina
- HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HPV – *Human Papilloma Virus* (Vírus do Papiloma Humano)
- HSIL - *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelial de alto grau)
- ICAM – *Intercellular adhesion molecules* (molécula de adesão intracelular)
- IFF – Instituto Fernandes Figueira
- IFN – Interferon
- IL – *Interleukin* (Interleucina)
- INOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintase induzida)
- IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- LFA – *Lymphocyte function-associated antigen*
- LCC – Leucemia Linfocítica Crônica
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LSIL - *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepitelial de baixo grau)
- MHC - *Major histocompatibility complex* (Complexo de histocompatibilidade principal)

- NIC – Neoplasia Intra-epitelial Celular
- NK- *natural killer*
- NO – *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)
- NOS – *Nitric Oxide Synthase*
- p53 – proteína 53
- PCR - *Polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)
- PUMA - *p53-upregulated modulator of apoptosis* (modulador de apoptose regulado por p53)
- pRb – proteína do retinoblastoma
- RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
- RNOS – *Reactive Nitrogen Oxygen Species* (espécies de óxido reativo)
- TBS – *Tris Base Saline*
- TCR – *T cell receptor* (receptor de células T)
- Th – *T Help* (célula T auxiliar)
- TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
- TNFR- *TNF receptor* (receptor de TNF)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
O Vírus do Papiloma Humano e sua associação ao câncer cervical	01
O HPV e o sistema imune	04
Óxido Nítrico	08
O HPV e a indução de Apoptose	10
OBJETIVOS	14
METODOLOGIA	15
1. Metodologia do manuscrito 1 submetido a revista <i>Experimental and Molecular Pathology</i>	15
1.1. Seleção de pacientes	15
1.2. Identificação do HPV	16
1.3. Identificação das células inflamatórias e seus papéis citotóxicos	16
1.3.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina	16
1.3.2. Fenotipagem das células inflamatórias	17
1.3.3. Avaliação e expressão de marcadores de atividade celular, incluindo ou não a morte celular	18
1.3.4. Quantificação das células positivas	19
1.4. Análise estatística	19
2. Metodologia do manuscrito 2 submetido a revista <i>Apoptosis</i>	20
2.1. Seleção de pacientes	20
2.2. Determinação dos polimorfismos em <i>BAX</i> e <i>BCL2</i>	21
2.2.1. Extração de DNA	21
2.2.2. Análise PCR-RFLP	21
2.2.2.1 <i>BAX</i>	21
2.2.2.2 <i>BCL2</i>	22
2.3. Análise estatística	22
3. Estudo de expressão gênica de RNAm de genes associados ao ciclo celular	23
3.1. Seleção de pacientes	23
3.2. Expressão de RNAm em genes associados a citotoxicidade e apoptose realizada no artigo 3.	23
RESULTADOS	24
1. Manuscrito 1 - submetido a revista <i>Experimental and Molecular Pathology</i>	24
2. Manuscrito 2 submetido a revista <i>Apoptosis</i>	42
3. Expressão de RNAm de genes associados a citotoxicidade e apoptose	61
Casuística	61
Expressão de RNAm para genes relacionados as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16	63
Expressão de RNAm de genes associados a citotoxicidade – Fas e Perforina	64
Expressão de RNAm de proteínas controladoras do ciclo celular	66
p53 e pRb	66
BAX e BCL2	66
Associação dos polimorfismos dos genes controladores do ciclo celular BAX e BCL2 e sua expressão na cérvix uterina	67
DISCUSSÃO	69

CONCLUSÕES	73
PERSPECTIVAS	74
REFERENCIAS	75

INTRODUÇÃO

O Vírus do Papiloma Humano e sua associação ao câncer cervical

O câncer cervical é um câncer de origem infecciosa, causado pelo vírus do papiloma humano (HPV), e sua associação foi observada inicialmente na década de 70 onde houve interesse por este vírus (Meisels et al., 1977). Atualmente, é descrito que o HPV faz parte da família *Papillomaviridae* e é espécie-específico, causando lesões típicas em vários tecidos (Figura 1). Com o advento de técnicas moléculas, um número crescente de tipos e subtipos de HPV tem sido isolado e identificado, chegando, atualmente, a 100 subtipos conhecidos, caracterizados como cutâneos ou mucosos. Dentre estes, 15 subtipos são associados ao câncer cervical, especialmente os subtipos 16 e 18 (Smith et al., 2007; Johnson et al., 2011), que estão presentes em cerca de 70% de todos os cânceres cervicais, seguidos dos tipos 45 e 31, responsáveis por 10%. Os subtipos de HPV 6 e 11 estão associados a 90% das verrugas genitais (Shah et al., 2006).

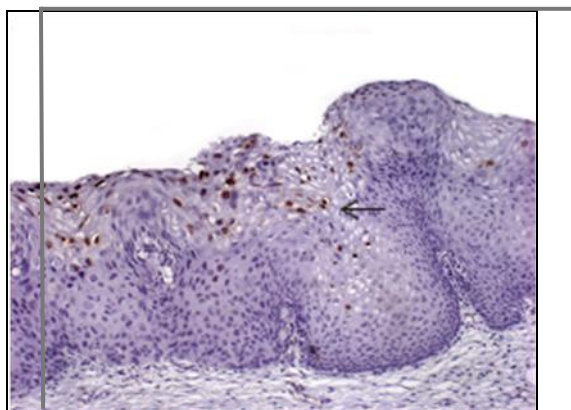


Figura 1. Detecção de DNA viral por hibridização *in situ* em lesão cervical (Fernandes et al, 2011). A marcação acastanhada representa a presença do HPV (seta).

De acordo com as lesões causadas pelo subtipo, os HPV são classificados de acordo com seu potencial oncogênico em: *baixo risco*, associados com o condiloma acuminado e a neoplasia intracelular cervical (NIC) de baixo grau ou do tipo I (NIC I), como os HPV 6 e 11; *médio risco*, associados ao NIC de alto grau, porém não relacionado com o câncer invasivo, e *alto risco*, encontrados em pacientes com NIC de alto grau (NIC II ou III) ou

carcinoma invasivo cervical, do ânus ou pênis, como os HPV 16, 18, 31, 33, 45 (Man & Fiander, 2001), como ilustrado na Figura 2.

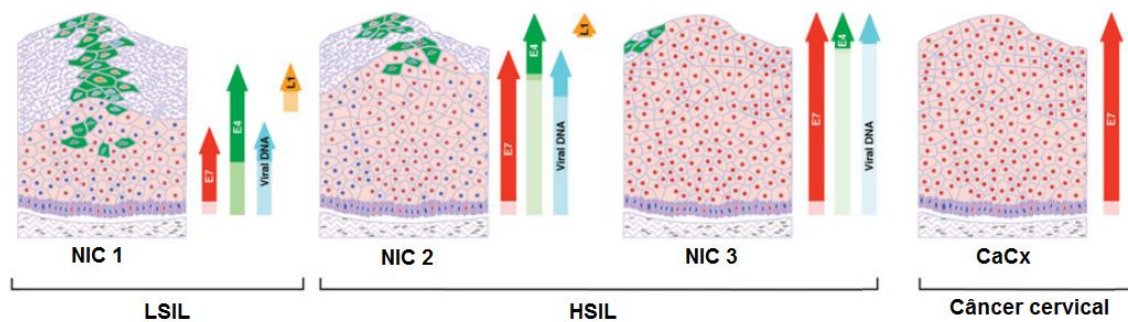


Figura 2. Desenho esquemático exemplificando os tipos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em grau 1, 2 e 3 e câncer cervical (CaCx). A lesão de NIC1 é denominada lesão escamosa de baixo grau (LSIL) e as lesões de NIC2 e 3 são denominadas lesões escamosas de alto grau. As setas vermelhas, verdes e azuis, indicam respectivamente a expressão das proteínas E7, E4 e DNA viral do HPV na carcinogênese (adaptado de Doorbar, 2006)

Há evidências de que a frequência das infecções por HPV têm aumentado progressivamente durante essas últimas décadas, sendo consideradas como uma das doenças sexualmente transmissíveis mais prevalentes no mundo (Smith and Travis, 2011). Metaanálises de estudos com mulheres com citologia cervical normal demonstram uma prevalência mundial da infecção pelo HPV em aproximadamente 11%, com altas prevalências na África (21,4%), no Oeste Europeu (21,45%) e América Latina (16,1%) (De Sanjosé et al., 2007; Bruni et al 2010). A metaanálise, realizada por Ayres e Silva (2010) demonstrou que a prevalência da infecção pelo HPV no Brasil variava de 7,1 a 43% (Sudeste – 43%; Sul – 21,4%; Nordeste 21,4% e Norte 7,1%). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer do colo do útero é o segundo tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama, e a quarta causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. Por ano, faz 4.800 vítimas fatais e apresenta 18.430 novos casos. Um dos grandes avanços alcançados foi a melhoria na capacidade de realizar diagnóstico precoce, pois na década de 1990 cerca de 70% dos casos diagnosticados eram da doença invasiva. Atualmente, 44% dos casos são de lesão precursora do câncer. Mulheres diagnosticadas precocemente, quando tratadas, têm quase 100% de chance de cura (INCA, 2011).

O HPV é um vírus DNA de fita dupla que infecta células epiteliais escamosas induzindo lesões proliferativas. O ciclo de replicação viral é a chave para entender a patogênese e imunobiologia deste vírus (Figura 3). As observações deste ciclo são realizadas em infecções naturais, particularmente em modelos experimentais (coelhos, vacas, cachorros e roedores, revisto por Stanley et al., 2009), e observações quanto a maturação celular e efeitos biológicos, realizados em linhagens celulares (HeLa, SiHa, CasKi) de queratinócitos infectados pelo HPV (18, 16 e 16, respectivamente) ou *ex vivo* em culturas organotípicas e em fragmentos de cérvix uterina (Conway & Meyers, 2009). A infecção pode ocorrer na cérvix, vulva, ânus, pênis, laringe e pele (Casolati et al., 2003; Aubin et al., 2003; Bekkers et al., 2004; Einstein et al., 2004; Hagensee et al., 2004; Heard et al., 2005). Inicialmente, a infecção e o ciclo vegetativo são dependentes da diferenciação dos queratinócitos. O HPV infecta a camada mais basal dos queratinócitos no epitélio, contudo, a expressão das proteínas virais e a montagem de novas partículas somente ocorrem nas camadas mais elevadas do extrato. A expressão do gene viral é restrita aos queratinócitos e não há evidências da expressão em qualquer outra célula. O ciclo celular pode durar um longo período, acredita-se que cerca de três semanas, pois este é o período para a completa diferenciação do queratinócito e sua escamação. Contudo o período entre a infecção e o aparecimento das lesões é descrito entre semanas e meses, sendo extremamente variável (Koutsky et al., 1992), indicando que o vírus pode escapar do sistema imune. Outra característica da infecção pelo HPV é a ausência de citólise e efeitos citopáticos (morte celular) durante a montagem do vírus. Os queratinócitos infectados (ou não) destinados à morte e escamação estão longe do sistema imune “ativado”. O vírus prolonga a vida celular (condensação nuclear) induzindo os coilócitos, célula característica da infecção pelo HPV, sendo as proteínas oncogênicas E6 e E7 responsáveis pela inibição da apoptose. Com a maturação viral, a célula infectada é deixada a sua sorte para morrer e descamar. Uma possível consequência desta replicação tão peculiar poderia ser a inexistência de instalação de um processo inflamatório, surgindo assim lesões crônicas que não sinalizariam para o sistema imune – logo, uma adaptação viral. Contudo, infecções crônicas ou avançadas podem levar a ativação do sistema imune. Entretanto, ainda não há respostas para

como e quando o sistema imune é ativado e qual o papel da imunidade humoral e celular da história natural de doenças genitais associadas ao HPV.

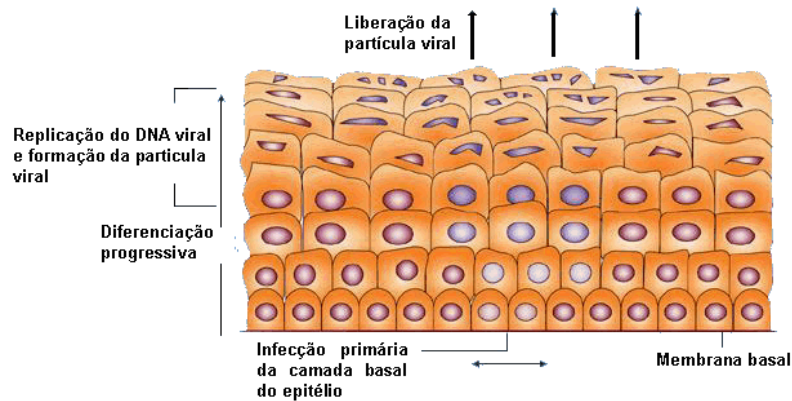


Figura 3. Modelo esquemático da infecção pelo HPV (Moody & Laimins, 2010)

O HPV e o sistema imune

Na maioria dos casos, a infecção viral é eliminada após a ativação da resposta imune. Ocasionalmente, as lesões não regridem e a progressão maligna da doença pode ocorrer sob condições apropriadas. A história natural da infecção pelo HPV ainda não está bem esclarecida. A maioria das infecções não apresenta lesões visíveis, que tanto podem ser graves quanto controladas pelo sistema imune dentro de um curto período de tempo. Indivíduos com grave comprometimento nas funções imunológicas podem apresentar uma alta prevalência de infecções clinicamente aparentes causadas pelo HPV. O exemplo mais claro do papel da resposta imune em controlar a replicação viral está no aumento da incidência de lesões causadas pelo HPV em pacientes imunossuprimidas pelo HIV (Levi et al., 2002). Pacientes infectadas pelo HIV mostram infecções recorrentes pelo HPV, o que parece refletir um aumento no risco para progressão de uma infecção subclínica para o aparecimento de lesões, sugerindo que células T $CD4^+$ desempenham papel central na resolução e controle da infecção pelo HPV (Syrjänen, 2011). Trabalhos demonstram que pacientes HIV positivas que receberam o tratamento

antiretroviral apresentam redução nas lesões (Taylor et al., 2004; Del Mistro et al., 2004, de Andrade et al., 2011).

Se a imunossupressão causada pelo HIV-1 é fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, qual seria a faixa limítrofe de células T CD4⁺ a ser considerada como ponto de intervenção no acompanhamento ginecológico destas pacientes? Estudo realizado por Harris e cols. (2005) mostrou que em acompanhamento longitudinal (dois anos) de mulheres negativas para o HPV (HPV-DNA oncogênico ou não) e pareadas pela contagem de células T CD4⁺, a incidência de lesões causadas pelo HPV não difere entre mulheres HIV-positivas e negativas, mesmo naquelas com contagem abaixo de 200 células/mm³. Contudo, nenhuma mulher HIV-negativa apresentou lesões de alto grau após três anos de acompanhamento (Harris et al., 2005). Assim, o surgimento das lesões parece ser independente da resposta imune, mas uma vez instaladas, sua resolução ou o desenvolvimento de lesões malignas parece ser dependente do sistema imune.

Alguns estudos demonstram a associação significativa entre o número de células imunocompetentes e o grau da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) indicando que a resposta imune no estroma da cérvix uterina é um fator chave para a regressão da lesão ou sua progressão para o câncer cervical (Bollen et al., 2006; Maluf et al., 2008; de Andrade et al., 2011). Monnier-Benoit e cols. (2006) avaliaram populações celulares em lesões malignas e pré-malignas da cérvix uterina e verificaram que a percentual de linfócitos T CD4⁺ era maior em lesões de baixo grau e menor nas lesões de alto grau e câncer invasivo. Em nossos estudos prévios (Nicol et al., 2005), observamos a presença marcante dessas células em lesões cervicais de mulheres infectadas pelo HPV. No entanto, essa distribuição era diminuída em mulheres co-infectadas pelo HIV.

A indução de células T citotóxicas (CTLs) é um importante mecanismo de defesa contra vários microrganismos, especialmente vírus, e sua distribuição está diretamente associada ao controle das infecções, incluindo as infecções pelo HIV e HPV (Stanley et al., 2009). Contudo, os mecanismos exatos ainda são desconhecidos. A liberação de mediadores solúveis pelas CTLs em resposta à apresentação de antígenos por parte de células apresentadoras de antígenos é importante no controle de infecções. Alternadamente, as CTLs podem fazer contato diretamente com a célula alvo utilizando a maquinaria de

reconhecimento celular provenientes de receptores de célula T (TCR) e membros da família das integrinas. Esses mecanismos de contato são inicialmente classificados como dependentes ou independentes de cálcio. Os mecanismos que dependem de cálcio, resultam na liberação de grânulos citotóxicos na superfície das células alvo. As que não dependem, estimulam a morte celular através da interação do Fas Ligante (Fas-L) das CTLs com o receptor Fas das células alvo (Hassin et al., 2011).

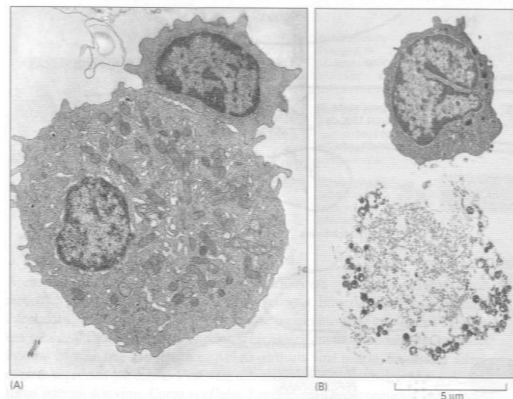


Figura 4. Células T citotóxicas em processo de eliminação da célula alvo (Zagury et al., 1975).

Ao avaliar a presença destas células em lesões de colo uterino, nosso grupo (Nicol et al., 2005) identificou um expressivo número de linfócitos em mulheres co-infectadas pelo HPV e HIV. É descrito na literatura, que estas células com atividade citotóxica são essenciais no controle imunológico da infecção viral e células tumorais através de duas importantes vias: perforina/granzima e Fas/FasL (Hoves et al., 2011). A primeira requer a expressão de FasL nas CTLs e Fas na célula alvo, enquanto a segunda, é mediada por exocitose dos grânulos citotóxicos, pelas células CTL após o reconhecimento antigenico via MHC-I. Estudos demonstram que a resposta à infecção pelo HPV é efetivamente celular, e especialmente contra as oncoproteínas E6 e E7, por estarem envolvidas na manutenção da transformação celular (Ishiji, 2000). Por apresentarem epítomos dominantes, estas proteínas representam alvos ideais para o desenvolvimento de vacinas (Peng et al., 2004; Nakagawa et al., 2005). Estudos histológicos revelaram um importante infiltrado de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e macrófagos presentes no estroma e epitélio de lesões regressivas. Estes linfócitos expressaram

marcadores de ativação e citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ (Stanley et al., 2003), como característica de uma resposta imune celular do tipo Th1.

Maluf e cols (2008) observaram que pacientes com lesões de alto grau recorrentes possuíam números elevados de linfócitos T CD8⁺. Da mesma forma, Alves e cols. (2010) observaram que, em relação à presença de linfócitos T CD4⁺, estes se distribuíam quase que equitativamente entre as amostras de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) II/III e carcinoma, diminuindo significativamente sua presença em lesões sem malignidade.

Outro mecanismo de citotoxicidade é a interação entre o receptor FasL das células citotóxicas e o receptor Fas das células alvo, que induz a apoptose destas células (Pirzad et al., 2010). Este fenômeno é observado na deleção periférica de células T maduras e na morte de células infectadas, tumorais e inflamatórias (Gomes et al., 2011; Seitz et al., 2011).

A molécula Fas é um membro da família de receptores de TNF, expresso em vários tecidos normais e neoplásicos, e o seu ligante (Fas-L) é expresso durante a ativação dos linfócitos T, embora esse mecanismo de morte seja importante na eliminação dessas células ativadas como forma de controlar a resposta imune (Jenkins et al., 2011). Em circunstâncias patológicas, a expressão de Fas-L pode ser induzida fora do sistema imune, o que pode ser observada em certas células tumorais, tais como células do colo uterino, como uma forma de escape da reação imune, pois essas eliminariam as células que expressam Fas (O'Connell et al., 1996).

Muitas similaridades e diferenças marcantes aparecem entre essas duas vias (Perforina e Fas). A via dependente de perforina é realizada predominantemente por células T CD8⁺ citotóxicas e células natural-killer – NK (Kagi et al., 1994). Nestas últimas, os grânulos são pré-formados, contudo sua atividade pode ser aumentada por citocinas, como IL-2 e IFN- γ , fazendo com que se tornem células constitutivamente armadas, podendo matar rapidamente na primeira estimulação. Entretanto, as células NK não proliferam significativamente em resposta a essa estimulação.

Em contraste, os precursores virgens das células T CD8⁺ não possuem atividade citotóxica e precisam sofrer ativação, que requer estímulo da molécula de TCR mediada pela ativação de citocinas, tais como, IL-2 e IL-6, os quais induzem a expressão de grânulos, incluindo as perforinas e as

granzimas. Os mesmos sinais que ativam as células T CD8⁺ estimulam sua proliferação (Doherty & Christensen, 2000). A partir desse momento essas células estarão preparadas para um posterior encontro com células infectadas, às quais são específicas.

Quando as células T ativadas reconhecem o seu alvo, uma forte junção é formada entre elas e mantida posteriormente por moléculas de adesão (ex. LFA-1 e ICAM-1), e um sinal é gerado na célula efetora, levando os seus grânulos a migrarem para o sítio de contato, e liberando-os sobre a célula alvo.

A via Fas é similar, pois requer uma ativação inicial das células efectoras. Essa via parece ser ativa em todos os tipos celulares, contudo é mais preponderante nas células T CD4⁺, especialmente naquelas com fenótipo de Th1 (Jenkins et al., 2010). Uma importante diferença entre esta via e a da perforina é a velocidade do evento citotóxico. Uma vez formados, os grânulos podem ser reorientados e liberados imediatamente após a estimulação do TCR. Em contraste, o Fas-L é estocado, mesmo quando as células estão ativadas. Portanto, sua atividade máxima requer a ativação por um novo ligante depois de um período de 1 a 2 horas após a estimulação do TCR. Essa ativação permanece enquanto existir a estimulação por parte do TCR e o FasL é expresso na superfície, ou por proteólise ou por endocitose, dependendo da célula efetora (Nguyen, 2000). A meia-vida longa do Fas-L na superfície permite que as células efectoras disparem a atividade citotóxica, mesmo na ausência da estimulação pelo TCR, levando à morte, qualquer célula que esteja expressando Fas no sítio de infecção. Isso é especialmente importante para as células T CD4⁺, uma vez que o MHC II não é expresso em todas as linhagens celulares, eliminando assim as células infectadas e que não expressam essa molécula (MHC II) em sua superfície. Dessa forma, essa via é considerada mais promíscua do que a via da perforina.

Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um importante e versátil mediador nos sistemas biológicos. Esta molécula é conhecida por executar importantes funções na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos. Este radical é biossintetizado a partir da L-arginina pela enzima NO sintase (NOS) em uma

reação de duas etapas de oxidação, sendo os produtos formados a L-Citrulina e o NO, este com meia-vida extremamente curta (Ghafourifar et al., 2008).

A família de enzimas de NOS é composta de três isoformas distintas: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS endotelial (eNOS ou NOS3) e NOS induzido (iNOS ou NOS2). Os dois primeiros são constitutivamente expressos e regulados na fase pós-transcricional e dependentes de cálcio (Forstermann et al., 1994, Xie & Nathan, 1994), já o iNOS é regulado na fase transcricional e é independente de cálcio. Este produz NO por prolongados períodos de tempo e em várias células, é regulado pelo TNF- α , IFN- γ , lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e AMP cíclico (Hanafy et al., 2001).

O NO é uma molécula instável e pode desempenhar importantes funções biológicas tanto na célula em que é sintetizado, como na interação com as células e moléculas vizinhas. Uma vez difundida na membrana e no ambiente celular, por suas propriedades lipofílicas, pode ser estabilizado ou degradado por sua interação com diversos resíduos moleculares intra e extracelulares.

O papel fisiológico do radical NO envolve imunidade celular, inibição da agregação plaquetária, dilatação de vesículas sanguíneas e neurotransmissão. Células do sistema imune utilizam NO como arma citotóxica ou citostática na destruição de patógenos e células tumorais, sendo um mecanismo importante na imunidade não específica (Singh et al., 2011).

A localização de NOS, no interior da célula, pode influenciar a função biológica do NO produzido (Dudzinski et al., 2007). Tem sido encontrada dentro da mitocôndria (Lopez-Figueroa et al 2000), possuindo efeito modulador tanto na obtenção de energia, como no processo de morte celular.

As espécies de óxido nítrico reativos (RNOS), tais como o peroxinitrito e trióxido de nitrogênio, produzindo a partir do NO, e espécies de oxigênio reativo (ROS) podem lesar o DNA diretamente. Existem três mecanismos químicos pelos quais o NO pode danificar o DNA: reação direta do RNOS na estrutura do DNA; inibição do processo de reparo do DNA; o aumento da produção de substâncias genotóxicas, tais como, agentes alquilantes e peróxido de hidrogênio (Morán et al., 2011).

Em meios aeróbicos, o RNOS causa a quebra do DNA com a desaminação da citosina, adenina e guanina (Liu et al., 1996). Como descrito na literatura, o NO e o superóxido reagem rapidamente com o peroxinitrito, o

qual produz modificações profundas no DNA, incluindo a indução da quebra do mesmo. Isso acontece, particularmente, nas fases de replicação e transcrição do DNA, quando o mesmo é mais vulnerável, por se apresentar na forma de fita simples. O trióxido de nitrogênio se apresenta na forma de nitrosamina, que potencializa a formação de tumor, metabolizando substâncias mutagênicas, que danificam o DNA. Isso leva a efeitos secundários incluindo a estimulação da p53, promovendo, assim, a mutagênese e apoptose (Lonkar et al., 2011).

Apesar de todo o conhecimento sobre o papel do óxido nítrico no câncer, não há nada na literatura a respeito do carcinoma cervical, seja sobre sua correlação com a infecção causada pelo HPV ou na sua co-infecção com HIV.

O HPV e a indução de Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo geneticamente programado que resulta na fragmentação do DNA e morte celular. É observado no desenvolvimento embrionário e durante a vida adulta, desempenhando papel importante em vários processos fisiológicos, tais como remodelagem dos tecidos, e na manutenção do sistema imune. A sua desregulação pode acarretar malformações e doenças, como é observado no desenvolvimento e progressão do câncer, onde a célula falha ao iniciar o processo de apoptose em resposta ao dano do DNA. A apoptose envolve uma cascata de eventos enzimáticos altamente regulados por diversos sinais extracelulares e intracelulares (Takekawa et al., 2011).

As oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco estão associadas ao desenvolvimento do carcinoma cervical, principalmente pela inativação de duas proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb, respectivamente. Estas proteínas são membros de família que regula o ciclo celular e mantém a estabilidade genômica (Burkhart & Sage, 2008)

A p53 controla o ciclo celular principalmente pela regulação da transcrição de alguns genes alvos (Levrero et al., 2000). Um dos principais alvos da p53 é a p21, que é o inibidor universal de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK) (Takahashi et al., 2011), incluindo as ciclinas A e E, os quais são importantes na transição da fase G1 e S da mitose (Cobrinik, 2005). A p53 é degradada pela oncoproteína E6 de tipos oncogênicos do HPV, levando ao bloqueio da apoptose e a permanência do ciclo celular.

Recentemente, tem sido descrito que o polimorfismo no gene da p53 possa estar associado com o aumento da susceptibilidade ao câncer cervical, relacionado à infecção pelo HPV. O homocigoto dominante (arginina/arginina) na posição 72 do gene p53 está associado ao aumento em sete do risco para câncer cervical (Ferreira da Silva et al., 2010). Contudo, outros autores têm falhado em identificar esta associação (Abba et al., 2003; Comar et al., 2004; Fonseca-Moutinho et al., 2004; Ueda et al., 2005), o que pode ser explicado pelas populações estudadas, que apresentam diferentes perfis genéticos (japoneses, italianos, argentinos, portugueses e ingleses).

Outras vias podem estar associadas à indução de apoptose em queratinócitos infectados, tais como a interação entre TNF- α e seu receptor. Vários estudos sugerem que TNF- α pode atuar como um promotor tumoral em vários tipos de câncer, tais como mama (Guo et al., 2011) e próstata (Lopes & Callera, 2011). Em resultados prévios (Nicol et al., 2005), identificamos a presença abundante de células produtoras de TNF- α na cérvix uterina durante a infecção pelo HPV, distribuídas preferencialmente no estroma, com morfologia característica de macrófagos. A associação com o HIV leva a uma diminuição marcante da expressão de TNF- α (Figura 4). Curiosamente, demonstramos que TNF- α , juntamente com IL-1 e IL-6 são responsáveis pela indução da replicação do HIV em células de linhagens celulares de origem linfocítica, mas não monocítica *in vitro* (Gage et al., 2000). Desta forma, durante a infecção pelo HPV há a expressão e liberação de TNF- α , mas não a indução de morte celular, como será pontuado posteriormente.

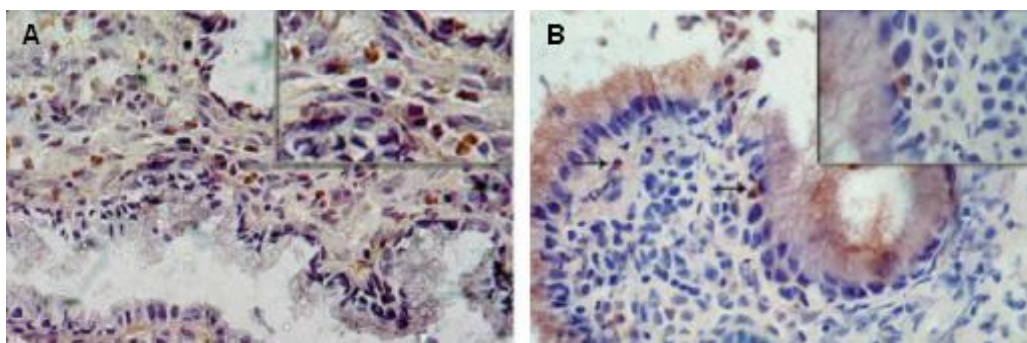


Figura 5. Análise imunohistoquímica da presença da expressão de TNF- α em biópsias da cérvix uterina de mulheres infectadas somente pelo HPV (figura A) e co-infectadas pelo HIV (figura B – Nicol et al., 2005)

As atividades celulares de TNF- α são mediadas por suas interações com seus receptores (TNFR1 e R2), membros da superfamília de receptores caracterizados pelo motivo extracelular conservado e rico em cisteína. Ambos os receptores possuem papel crucial na indução da apoptose. O TNF-R1 traduz diretamente o sinal apoptótico induzido por TNF- α , através da trimerização do receptor (White et al., 2006) e o TNF-R2 é importante na modulação da intensidade do sinal enviado. A oncoproteína E6 do HPV16 se liga ao receptor TNF-R1, interferindo na transmissão do sinal pro-apoptótico induzido por TNF- α , sugerindo, assim, que esta ligação impeça as interações subsequentes requeridas para a formação do complexo funcional de sinalização para morte celular (DISC, em inglês) como a ativação da cascata de caspase (tais como caspase 8). Estudos em linhagens de células provenientes de carcinoma cervical, HPV16 positivas, comprovam que estas células não são sensíveis à morte mediada por Fas ou TNF- α por não formarem o DISC (Aguilar-Lemarroy et al., 2001). Assim, é possível que algumas proteínas virais interajam com os receptores de morte, evitando que as células morram por apoptose induzida por FasL ou TNF- α (Filippova et al., 2002). No entanto, não há nenhum trabalho na literatura que comprove este fato *in vivo* ou se o HPV possa regular, ou não, transcricionalmente a expressão destes receptores.

As células controlam a apoptose por reguladores internos representados pela família BCL-2. Os membros desta família se dividem em dois grupos: os anti-apoptóticos (proteínas BCL-2 e BCL-X_L), que estão envolvidos na sobrevivência celular; e os pro-apoptóticos (BAX e Bid), envolvidos no processo de morte celular (Zinkel et al., 2006). Esta via intrínseca é ativada em resposta ao *stress* celular ou dano do DNA, e é caracterizada pela liberação de citocromo c da mitocôndria após a ativação de BAX (Gross et al., 1998), e a consequente clivagem de caspase 9, que inicia a cascata proteolítica pela ativação das caspases 3 e 7 (Srinivasula et al., 1998). Pode ser regulada por membros da família BCL-2, como a proteína BCL-2, que é expressa constitutivamente, e regulada transcricionalmente pela proteína p53 e pelo modulador de apoptose (PUMA) identificado como um novo gene induzido por p53 que se une as proteínas com forte atividade apoptótica e que contenham domínios BH3 (Michalak et al., 2005). A indução rápida do RNAm de PUMA e a

presença do sítio de ligação para p53 no primeiro íntron deste gene indica que ele seja um alvo transcricional direto de p53.

Tem sido descrito na literatura, polimorfismos nos genes *BAX* e *BCL2* e suas associações com o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres. Saxena e cols. (2002) demonstraram que o polimorfismo *BAX* -248G<A, presente em indivíduos com leucemia linfocítica crônica, estava associado à redução da proteína BAX, progressão a câncer e a falha do tratamento convencional. Da mesma forma, Starczynski e cols. (2005) observaram, em um grupo maior de indivíduos, que a presença deste polimorfismo influenciava na resposta ao tratamento e a sobrevivência destes indivíduos.

Não há nada descrito na literatura sobre o papel dos polimorfismos de *BAX* (-248G>A) e *BCL2* (-938C>A) no aparecimento de lesões cervicais associadas à infecção pelo HPV.

OBJETIVOS

Nosso objetivo geral foi demonstrar a expressão de moléculas e genes relacionados a indução de apoptose na neoplasia intraepitelial cervical durante a infecção pelo HPV e associá-los a progressão para lesões de alto risco e câncer.

Dessa forma, os objetivos específicos são:

1- Identificar a expressão de marcadores de apoptose (BAX, BCL2, FasL e NOS2 e perforina) na cérvix uterina em pacientes com lesões cervicais induzidas pelo HPV, infectadas ou não pelo HIV.

2- Avaliar polimorfismos em genes responsáveis pelo controle da apoptose e potencializadores de atividade tumoral (*BCL2-938C>A* e *BAX-248G>A*) em coorte de mulheres infectadas pelo HPV, co-infectadas ou não pelo HIV.

3- Avaliar a expressão transcripcional dos genes *BAX*, *BCL-2*, *perforina*, p53, FasL e pRb através da quantificação de mRNA em lesões cervicais de mulheres infectadas pelo HPV.

4- Comparar se os diferentes fenótipos e genótipos para os genes em questão se correlacionam com a atividade celular *in situ* e a progressão da lesão cervical.

METODOLOGIA

A metodologia está apresentada em três tópicos referentes:

- 1- A identificação da expressão de marcadores de apoptose (BAX, BCL2, FasL e NOS2 e perforina) na cérvix uterina em pacientes HIV-positivas e negativas com lesões cervicais induzidas pelo HPV. Resultados submetidos ao *Experimental and Molecular Pathology*
- 2- A avaliação de polimorfismos em genes responsáveis pelo controle da apoptose e potencializadores de atividade tumoral (*BCL2-938C>A* e *BAX-248G>A*) em grupo de mulheres com histórico de lesões cervicais co-infectadas ou não pelo HIV. Resultados submetidos à Revista *Apoptosis*, e
- 3- A descrição da expressão transcripcional dos genes *BAX*, *BCL-2*, *perforina*, p53, FasL e pRb em lesões cervicais de mulheres infectadas pelo HPV. Resultados ainda não submetidos.

1. Metodologia do manuscrito 1 submetido a revista *Experimental and Molecular Pathology*

“HPV cervical infection induces a balance of apoptotic and anti-apoptotic markers and perforin granules release. HIV co-infection leads to a decreasing on perforin degranulation”

1.1. Seleção de pacientes

Neste trabalho, foram incluídas mulheres integrantes de dois grupos de pacientes do sexo feminino. Uma proveniente do Serviço de Ginecologia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), da Fiocruz, onde as pacientes eram HIV-1 negativas ou com sorologia desconhecida para o HIV-1; a outra de uma coorte de acompanhamento de DST em mulheres infectadas pelo HIV-1, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fiocruz. Mulheres identificadas no rastreio citológico como parte do programa de controle do

câncer do colo do útero, residentes na Zona Sul do Rio de Janeiro ou, eventualmente, de outras regiões ou municípios, possivelmente portadoras de lesões cervicais pré-invasivas ou invasivas, foram encaminhadas para confirmação diagnóstica e tratamento no IFF. As pacientes que concordaram em participar do presente estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. A presente proposta estava inserida no projeto “Caracterização da imunidade cervical em mulheres infectadas pelo vírus do papiloma humano: influência da co-infecção pelo HIV”, em colaboração com a Universidade da Califórnia - UCLA. O projeto acima mencionado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC em setembro de 2001.

1.2. Identificação do HPV

Para a identificação da presença do HPV em mulheres incluídas no artigo 1, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* em fragmentos de lesões cervicais parafinizados através do kit GenPoint™ (DakoCytomation) utilizando sondas de amplo espectro para diversos subtipos de HPV seguindo as instruções do fabricante.

1.3. Identificação das células inflamatórias e seus papéis citotóxicos.

1.3.1. Coloração com Hematoxilina-Eosina (H.E.)

Para este estudo, cortes seriados (3 µm) foram realizados nos blocos congelados, usando o criostato (Leica, EUA), e foram aplicados em lâminas previamente filmadas a 2% de silano em acetona (pura) (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). Os cortes foram fixados em acetona (PA) para a posterior utilização nas técnicas de imunohistoquímica. Cortes extras de cada caso foram armazenados em freezer -70°C, para posterior utilização.

A primeira lâmina de cada caso foi corada com hematoxilina de Mayer's (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) por 2 minutos e lavada em água corrente. Logo após, ela era mergulhada em álcool e contracorada com eosina alcóolica

(VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). Após 1 minuto, a lâmina foi desidratada em 3 lavagens com álcoois gradativos (10 minutos cada) e diafinizada em 2 lavagens em xilol (10 minutos cada). Posteriormente, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá (Merck, Darmstadt, Alemanha) e lamínulas.

A coloração com H.E. foi feita para confirmar se a biópsia foi incluída de forma correta e se havia a presença de epitélio no corte.

1.3.2. Fenotipagem das Células Inflamatórias

Para determinar o fenótipo das células inflamatórias, analisamos a presença de macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, utilizando-se a técnica da imunoperoxidase indireta. Inicialmente, as lâminas foram hidratadas utilizando o tampão de lavagem Tris base salina (TBS pH 7,4) (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) por 10 minutos. Logo após, foi feita a inibição da peroxidase dos cortes em peróxido de hidrogênio 30% em TBS (diluição 1:1) por 15 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente, sendo a última lavagem feita em TBS. As lâminas foram incubadas em soro normal de cavalo (1:75, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) diluído em TBS, com o objetivo de diminuir as ligações inespecíficas, e colocadas em câmara úmida. Após 30 minutos, o excesso do soro de cavalo foi removido e foram realizadas as incubações com os anticorpos monoclonais primários diluídos em TBS e no corte de controle negativo com TBS. Os anticorpos primários utilizados estão especificados na Tabela 1.

Após a incubação por 1 hora em temperatura ambiente, os cortes foram lavados em TBS (dois banhos de 5 minutos), e incubados com o anticorpo secundário biotilado anti-camundongo (1:200, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) diluído em TBS por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em TBS (dois banhos de 5 minutos) e incubadas com o complexo avidina-biotina conjugado com peroxidase (1:100, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) por 30 minutos. Após a lavagem em TBS (dois banhos de 5 minutos), as lâminas foram reveladas com 3'3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) na presença de peróxido de hidrogênio. Ao apresentar precipitados de coloração castanha, finaliza-se a reação colocando as lâminas em água destilada e logo

após lavamos em água corrente abundantemente. Após essa lavagem, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em 3 lavagens com álcoois gradativos (10 minutos cada) e diafinizadas em 2 lavagens em xilol (10 minutos cada). E finalizamos, montando as lâminas com bálsamo do Canadá e lamínulas.

1.3.3. Avaliação da expressão de marcadores de atividade celular, incluindo ou não morte celular

Para determinar um possível papel citotóxico das células que compõem o infiltrado inflamatório, a presença de receptores de FasL, grânulos de perforina, Bax e Bcl2 foram analisadas. Além disto, determinamos a presença da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), através da técnica de imunohistoquímica, como descrita detalhadamente no tópico anterior. Os anticorpos monoclonais utilizados estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos anticorpos monoclonais.

<u>Anticorpo</u>	<u>Alvo</u>	<u>Diluição</u>	<u>Procedência</u>
Anti-CD4	Linfócitos T CD4 ⁺	1:20	Sigma
Anti-CD8	Linfócitos TCD8 ⁺	1:20	Sigma
Anti-CD68	Macrófagos	1:150	DAKO
Anti-iNOS	Óxido nítrico sintase induzida	1:100	Transduction BD
Anti-Perforina	Perforina	1:50	Pharmacia
Anti-FasL	FasL	1:50	Apotech
Anti-Bcl2	Bcl2	1:50	Pharmigen
Anti-Bax	Bax	1:50	Zymed

1.3.4. Quantificação das células positivas

A presença de positividade das células existentes no epitélio, camada basal do mesmo, córion e a na região periglandular do material biopsiado (a lâmina foi analisada para os respectivos receptores de superfície em pelo

menos 20 campos). Para a contagem, foi utilizado microscópio ótico composto por uma objetiva com aumento de 40 vezes e uma ocular gradeada com aumento de 10 vezes. Em cada campo foi registrado o número total de células positivas para o marcador a ser analisado. Todos os casos foram fotografados para permitir futuras avaliações e servirem como forma de ilustração para este trabalho.

1.4. Análise estatística

Após o exame das distribuições, as comparações entre as diversas variáveis contínuas de acordo com as categorias em estudo, foram realizadas pelo teste ANOVA (teste paramétrico). No estudo das variáveis discretas, utilizou-se o teste de Qui-quadrado (Yates) sempre que todas as células da tabela apresentavam valor esperado maior do que cinco. Caso contrário, utilizou-se o teste de Fisher. Da mesma forma, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman para examinar as relações entre diversas variáveis analisadas no epitélio, camada basal do epitélio, córion e região periglandular. Foi considerado estatisticamente significativo valores de $p < 0,05$. Contudo, valores entre 0,051 e 0,061 foram considerados dentro de margem de significância.

2. Metodologia do manuscrito 2 submetido a revista *Apoptosis*

“Cervical intraepithelial neoplasia is associated with polymorphism on apoptotic *BAX* (-248G>A) gene but not on antiapoptotic *BCL2* (-938 C>A) gene”

2.1. Seleção de pacientes

Para realizar este estudo, mulheres oriundas de quatro grupos de pessoas de sexo feminino foram recrutadas. A primeira foi proveniente da coorte de acompanhamento de DST em mulheres infectadas pelo HIV-1, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, da Fiocruz. O segundo foi proveniente do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), da Fiocruz, onde as pacientes eram soronegativas ou com sorologia desconhecida para o HIV. O terceiro grupo incluído foi composta de mulheres atendidas no Serviço de Ginecologia do Ambulatório Piquet Carneiro/UERJ e na Disciplina de Ginecologia do Hospital Pedro Ernesto/UERJ, que apresentavam citologia normal, sem lesões sugestivas de infecção pelo HPV e/ou histórico de lesões cervicais e a quarta, composta de profissionais de Saúde do IPEC, que apresentavam citologia normal, sem lesões sugestivas de infecção pelo HPV e/ou histórico de lesões cervicais.

Esta proposta não interveio com o método diagnóstico e a conduta médica. Todas as pacientes foram atendidas pelos médicos ginecologistas que indicaram e fizeram, quando necessário, a intervenção clínica necessária para o atendimento e tratamento das pacientes. Todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, após serem informadas dos objetivos do estudo pelos pesquisadores. A presente proposta estava inserida no projeto “Identificação da prevalência de infecção e doença causada por subtipos de HPV indutores de câncer cervical e sua correlação com fatores de prognósticos genéticos – ligados a indução de carcinogênese – e ambientais em coorte de mulheres HIV-1 positivas”, aprovado pelos CEPs do IPEC em 2005 (CEP nº 0001.0.009.000-05) e IFF em 2008 (CEP 0051.0.008.008-08).

Dados sócio-demográficos foram obtidos do banco de dados da coorte de mulheres do IPEC-Fiocruz ou solicitados às pacientes provenientes do IFF-Fiocruz. Foram realizadas perguntas como número de parceiros, início de atividades sexuais, número de gestações, tabagismo e etilismo. Estes dados foram armazenados em planilha Excell e analisados usando o programa SPSS versão 16.

2.2. Determinação dos polimorfismos em *BAX* e *BCL2*

2.2.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o kit comercial da Qiagen® a partir de 5 ml de sangue total coletado em tubos contendo EDTA. O protocolo descrito pelo fabricante foi seguido. A qualidade do DNA extraído foi verificada através da visualização de banda única em gel de agarose a 1%, e armazenado a -70 C até a sua utilização.

2.2.2. Análise PCR-RFLP

A avaliação do polimorfismos nos genes *BAX* e *BCL2* foi realizada através da técnica PCR, seguida da RFLP.

2.2.2.1. *BAX*

O polimorfismo -248G/A localizado na região promotora do gene do *Bax* foi identificado seguindo o protocolo de Chen e cols. (2007). Os primers (5'-CATTAGAGCTGCGATTGGACCG-3' e 5'-GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT-3') amplificaram um produto de 109pb. Este foi digerido usando a enzima de restrição *Msp1* por 16h à 37°C e separado utilizando o gel de agarose Nusieve 2,5%, (FMC BioProducts, Rockland, ME) com brometo de etídeo e fotografado no aparelho Locus, usando o programa LPIX.

O genótipo homozigoto para o alelo selvagem (GG) produziu duas bandas: 89 e 20 pb; o heterozigoto (GA) produziu três bandas: 20, 89 e 109 pb e o homozigoto com o alelo variante (AA) produziu uma banda: 109pb.

2.2.2.2. *BCL2*

O polimorfismo -938C/A localizado na região promotora do gene *BCL2* foi identificado seguindo o protocolo de Chen e cols. (2007). Os primers (5'-CTGCCTTCATTTATCCAGCA-3' e 5-GGCGGCAGATGAATTACAA-3') amplificaram um produto de 300pb. Este foi digerido usando a enzima de restrição *BccI* (New England BioLabs, Beverly, MA) por 16h à 37°C e separado utilizando o gel de agarose 2%, com brometo de etídeo e fotografado no aparelho Locus, usando o programa LPIX.

O genótipo homozigoto para o alelo selvagem (CC) produziu duas bandas: 189 e 111 pb; o heterozigoto (CA) produziu três bandas: 300, 189 e 111 pb e o homozigoto com o alelo variante (AA) produziu uma banda (300pb).

2.3. Análise estatística

O teste para o equilíbrio para o Hardy-Weinberg foi determinado pelo teste do qui-quadrado (χ^2) nos grupos de casos e controles. Da mesma forma, o teste χ^2 foi usado para comparar as diferenças da frequência de cada alelo e genótipo dos polimorfismos de *BCL2* e *BAX*. Além disso, foram utilizados análises de regressão logística uni e multivariada para examinar as associações entre os polimorfismos e o risco de NIC pela *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95%, com e sem ajuste para idade, etnia, tabagismo, etilismo, números de gravidezes, menarca e a idade de primeira relação sexual (sexarca) entre casos e controles. O valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo para os testes estatísticos usando os programas Epi Info 6 (versão 6.04), SNPStats e SPSS (versão 16)

3. Estudo de expressão gênica de RNAm de genes associados ao ciclo celular

3.1. Seleção de pacientes

Selecionamos para este estudo, voluntárias incluídas no estudo de polimorfismo nos genes *BAX* (-248G>A) e *BCL2* (-938 C>A), como descrito no item 2.1, atendidas no Serviço de Ginecologia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), da Fiocruz e que apresentaram lesões cervicais com diagnóstico histopatológico de NIC I, II, III, sem a co-infecção pelo HIV. Dois grupos foram também incluídos, sendo estes compostos de pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer cervical e mulheres submetidas a histerectomia, sem lesões cervicais relacionadas ao HPV. Esta proposta não interveio com o método diagnóstico e a conduta clínica adotada no IFF. Todas as pacientes foram atendidas pelos médicos ginecologistas que indicaram e fizeram, quando necessário, a devida intervenção clínica.

3.2. Expressão de RNAm em genes associados a citotoxicidade e apoptose

A partir de fragmentos parafenizados de colo uterino foi realizada a análise das expressões gênicas dos genes associados com controle do ciclo celular, bem como com a citotoxicidade através do sistema Quantigene Plex 2.0 (Panomics, Fremont, CA, EUA), utilizando o aparelho de Luminex, seguindo as instruções dos fabricantes.

Trata-se de uma nova técnica que combina a amplificação do *branched DNA (bDNA)* e *beads* magnéticos multi-analíticos capazes de detectar a expressão gênica em diversos tipos materiais humanos, inclusive em tecido parafinado, onde há uma alta taxa de degradação de RNA. Para o presente estudo, 6 genes associados com controle do ciclo celular e da apoptose (*perforina*, *Fas*, *bax*, *bcl-2*, *pRb* e *p53*), bem como os genes *E6* e *E7* do HPV 16, e o gene constitutivo GADPH foram analisados.

RESULTADOS

Da mesma forma que a Metodologia, os resultados estão apresentados em três partes. Um artigo submetido a *Experimental and Molecular Pathology*, um artigo submetido a *Apoptosis*, e uma terceira parte onde estão apresentados os resultados da expressão de RNAm.

1. Manuscrito 1 submetido à revista *Experimental and Molecular Pathology*

“HPV cervical infection induces a balance of apoptotic and anti-apoptotic markers and perforin granules release. HIV co-infection leads to a decreasing on perforin degranulation”

Objetivando identificar a presença de células citotóxicas no processo inflamatório nas lesões do colo uterino, causadas pela associação entre as infecções pelo HPV e HIV, procuramos neste artigo, determinar o perfil de células inflamatórias no trato genital de mulheres infectadas pelo HPV, infectadas ou não pelo HIV-1, através da determinação da frequência de macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Além disso, determinar a localização e quantificar o número de células T citotóxicas através da presença de Fas L e grânulos de perforinas, correlacionar a presença das células inflamatórias e de células citotóxicas com a gravidade das lesões uterinas causadas pelo HPV em mulheres HIV positivas e negativas e caracterizar os marcadores de atividade celular envolvidos ou não na morte celular (BAX, BCL2 e iNOS) presentes nas lesões causadas pelo HPV infectadas ou não pelo HIV.

HPV CERVICAL INFECTION INDUCES A BALANCE OF APOPTOTIC AND ANTI-APOPTOTIC MARKERS AND PERFORIN GRANULES RELEASE. HIV CO-INFECTION LEADS TO A DECREASING ON PERFORIN DEGRANULATION

Ana Teresa G. Fernandes¹, Beatriz J. Grinsztejn², Fabio Russomano³, Aparecida Tristão⁴, Mauricio A. Perez⁵, Fátima Conceição-Silva⁶ & Maria da Gloria Bonecini-Almeida¹

Laboratory of Immunology and Immunogenetic in Infectious Diseases¹ and STD/AIDS Clinical Research Laboratory² at Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; Department of Gynaecology³ and Department of Pathologic Anatomy⁴ at Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; Núcleo de Estudos em Saúde Coletiva, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil⁵; Laboratory of Immunoparasitology at Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil⁶.

Corresponding author: Maria da Glória Bonecini-Almeida, Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-900, e-mail: gloria.bonecini@ipecc.fiocruz.br and bonecini@gmail.com, Phone number: (+55 21) 3865-9531, Fax number: (+55 21) 2590-9988

Abstract

Cell-mediated cytotoxicity plays an important role in the regulation of HPV infection. HIV co-infection is associated with a poorer prognosis and more rapid clinical progression of HPV-associated intraepithelial neoplasia and cancer. We evaluated the presence of cervical inflammatory cells, apoptotic (BAX, BCL-2, FasL, NOS2, perforin) markers and the degranulating expressing cell marker (CD107a) from HPV and HPV/HIV women. Higher percentage of cervical CD4⁺ and CD8⁺T cells were observed in both groups, with lower CD4⁺T cells count observed in HPV/HIV women. There were few FasL, Bax and Bcl-2 inflammatory cervical expressing cells in both groups. A balance between pro- and anti-apoptotic protein expression was verified. Interestingly, NOS2 expression was present especially in the epithelium basal layer on keratinocytes in both groups. Perforin was identified in few cervical cells. However, CD107a a surface marker for cellular degranulation, was detected in the epithelium basal layer and stroma, mainly on HPV women. These results support the conclusion that CD8⁺T cells may be dysfunctional in cervical lesion induced by HPV and HPV/HIV infection, independently of cervical intraepithelial neoplasia grade, leading to the failure to recognize HPV infected keratinocytes, and the subsequent release of lytic granules, as perforin. HIV infection may induce reduction on inflammatory cervical cells degranulation corroborating to HPV progression.

Keywords: CTL, cytotoxic dysfunction, apoptosis, uterine cévice, HPV and HIV co-infection

Introduction

Cervical cancer was the 4th cause of cancer death in 2010 (Jernal 2011). Globally, cervical cancer is the second most common cause of cancer death in women, with an estimated 510,000 new diagnosed cases and 280,000 deaths annually (Pagliusi et al., 2006). Infection with oncogenic types of human papillomavirus (HPV) is the main causal factor for cervical cancer and its precursor lesion, cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Many women are infected with HPV, but only a minority will develop CIN or cervical cancer (Bosch and Munoz, 2002). The mechanisms that control transition from latent infection to cervical cancer are unknown, although it is believed that cell-mediated cytotoxic T cells play an important role in the immunoregulation of HPV infection.

Specific types of HPV, mainly types 16 and 18, have been associated with a significantly increased in cancer risk (Sigurdsson et al., 2007). Since the E6 and E7 HPV oncoproteins are consistently retained and co-expressed in cervical cancer, they can be considered tumor-associated antigens for cervical cancer (Huh et al., 2007; Manuri et al., 2007). Therapeutic vaccines have been designed to prime antigen-specific T cell responses directed against virus-infected cells. The constitutive expression of E6 and/or E7 proteins is necessary for the maintenance of a transformed phenotype (Kotecha et al., 2003; Frazer 2004). In spite of the expected role of CTL in the regulation of HPV infection, there have been few reports of *in vivo* specific CTL responses against viral antigens in women with cervical cancer.

Another proposed mechanism for the evasion of the immune system by malignant cells is the modulation of Fas/FasL molecules. Fas is an inducer of extrinsic cell death responsible for cell-mediated cytotoxicity, immune regulation and counterattack of malignant tumor cells against the host immune system. On the other hand, resistance to apoptosis through the Fas pathway might enable many tumor cells to escape host immune responses (De Bruijn et al., 1998; Beverly et al., 1994). The Fas/FasL interaction plays an important role in cytotoxic T lymphocyte and NK cell-mediated apoptosis against tumor cells (Waterhouse et al., 2004). In addition, it has been reported that tumor cells can express FasL, and can induce apoptosis in tumor-infiltrating lymphocytes, thereby escaping host immune surveillance (Wu et al., 1996).

The higher rates of HPV infection, high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), and cervical cancer among immunosuppressed individuals, specifically HIV-infected women, underscore the importance of immune control in HPV infection. Studies of adult women have consistently shown that the prevalence of HPV infection and HSIL are greater among HIV infected women and that these differences are marked among women with lower CD4⁺ cell count (Denny et al., 2008; Lehtovirta et al., 2008).

Bcl2 is considered to be an important protein in the development of cervical cancer (El-Ghobashy et al., 2007). The anti-apoptotic Bcl2 protein, and the pro-apoptotic Bax protein, are thought to function by forming homo- and heterodimers that modulate apoptosis.

Other pathways regulate apoptosis, including nitric oxide (NO), which is induced in response to microbial infection and inflammatory cytokines in many cell types, including keratinocytes. The NO effects have been conflicting, inducing immune cells activation and inhibition. HIV-1 infection has been associated with the NO metabolites accumulation in patients with central nervous system complications (Jiménez et al., 2001), an association between high HIV load and increased NO production (De Andrea et al., 2006; Machida et al., 2004) and large amounts of NO by macrophages has been proposed to lead to the inactivation of lymphocytes and to the induction of a persistent immunosuppression (Groeneveld et al., 1996; Torre and Ferrario, 1996). There is little information on the role of NO in the pathogenesis of cervical carcinoma, and even less about its correlation with HPV infection.

The central goal of this study was to localize cytotoxic markers in cervical uterine lesions from HPV and HPV/HIV co-infected women.

Material and Methods

Patients

Twenty HPV-infected women were consecutively enrolled from two groups from Fiocruz Clinical Care Units: Fernandes Figueira Institute (IFF) and Evandro Chagas Research Institute (IPEC). All patients received free appropriated treatment (Brazilian Ministry of Health, 2006) and were invited to sign the consent form, approved by the Institutional Review-Board of IPEC/Fiocruz.

All patients were subjected to a gynecological exam with colposcopy. Cervical biopsies were performed in cases where epithelial atypia was observed. For immunohistochemical analysis, biopsies were immediately snap-frozen in liquid nitrogen embedded in OCT compound (Jung, Nussloch, Germany).

Histopathologic examination

Conventional histological sections were made of paraffin-embedded tissue and routinely stained with hematoxylin-eosin (HE). Premalignant cervical lesions were classified as CIN 2 or 3, characterized by the stage of epithelial differentiation, maturation and nuclear atypia.

HPV detection by *in situ* hybridization (ISH)

ISH was performed using the GenPoint™ HPV biotinylated wide spectrum DNA probe (DakoCytomation, Carpinteria, USA) according to the manufacturer's instructions.

Inflammatory cell phenotype

Serial cryostat sections (3 µm) were fixed with acetone in silane-coated slides. To determine the phenotype of inflammatory cells, immunoperoxidase staining was used for analyzing the presence of macrophages, CD4 and CD8 T lymphocytes, according to the manufacturer's instructions (ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were incubated overnight at 4°C with specific antibodies against CD4 (Sigma), CD8 (Sigma), CD68 (Dakocytomation), CD107 (BD Pharmigen, Heidelberg, Germany), NOS2 (BD Pharmigen), FasL (Apotech, Geneva, Switzerland.), Perforin (Pharmacia, Buckinghamshire, England), Bcl2 (BD Pharmigen) and Bax (Zymed, South San Francisco, California, EUA).

Cell count

Positive stained cells in the epithelium, basal layer of epithelium, stroma and glandular fields of uterine cervix were counted in twenty fields (400x). Counts were performed using a grid (1 cm² divided into 10x10 mm²) by two different observers.

Statistical analysis

Data analysis was carried out using the SPSS (version 11.0). Student *t* test was used to compare means of the percentage of positive cells in a particular area of tissue. Pearson correlation coefficient and *Spearman's rho* were used to investigate correlation between high grade CIN and the markers expression. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

HPV and HPV/HIV patients

The patient age ranged from 18 to 48 (33.7 ± 3.2) years. According to the results of the cervical histological analysis and HIV-1 serology the patients were divided in HPV (n=9) and HPV/HIV patients (n=11). In HPV patients, the age average was 33.6 ± 3.2 years and in HPV/HIV patients was 33.8 ± 2.5 years. We observed high degree CIN (2-3) lesions in both groups studied: in 8 of 9 (88.9%) of the HPV patients and in 7 of 11 (63.6%) of the HPV/HIV women (Table 1). Previous sexually transmitted diseases (STDs) were identified in 4 (20%) women. These patients were treated before the collection of the cervical samples. Of these patients, 1 (11.1%)

was HPV and 3 (27.2%) were HPV/HIV. *Gardnerella vaginalis*, trichomoniasis, genital simplex herpes and syphilis were observed in these women (Table 1).

HPV DNA detection

Eleven of the twenty samples were available for HPV DNA detection. From these, ten (90.9%) showed positive detection of HPV DNA. One HIV-positive woman was negative (Table 1).

Cellular inflammatory cells

Cell-mediated immune response plays an important role in controlling HPV-associated neoplasia. The total number of CD4⁺T cells observed in the uterine cervix ranged from 9.9 to 25.2 (17.1±1.9) and 6.5 to 22.2 (13.5±1.5) cells/mm² in the HPV and HPV/HIV patients, respectively ($p>0.05$). When epithelium (6.0±0.8; 6.1±1.2 cells/mm²) and stroma (9.5±1.2 vs 5.7±0.8 cells/mm²; $p=0.02$) area were independently analyzed, an intense infiltration of CD4⁺T cells to the epithelium area was observed in both groups; being less intense in stroma from HPV/HIV patients, suggesting an association with the decreased CD4⁺T cells in circulation (Figure 1). A statistical significance among the groups studied ($p=0.04$) in the CD8⁺T cells count was observed, ranging from 9.0 to 33.1 (16.1±2.4) and 13.2 to 28.2 (21.5±1.2) cells/mm² in HPV and HPV/HIV patients. CD8⁺T cells were strongly distributed in the basal layer of the epithelium (7.0±1.5; 10.1±0.9) and stroma (6.4±0.7; 8.6±0.4) in both groups (Figure 1), no statistical significance was found. However, a positive correlation between the number of cells in the epithelium and in the basal layer of the epithelium was verified in HPV ($r=0.9$) and HPV/HIV patients ($r=0.7$).

Macrophages ranged from 9.5 to 20.2 cells/mm² (13.9 ±1.1) in the HPV and 8.8 to 15.8 (13.3±0.6) cells/mm² in HPV/HIV patients, without statistical difference. Interestingly there was a high number of positive cells in the basal layer of epithelium (6.1±1.0; 5.9±0.4) and in the stroma (5.8±0.6; 6.0±0.5) in the HPV and HPV/HIV women respectively, although no statistical significance was found (Figure 1).

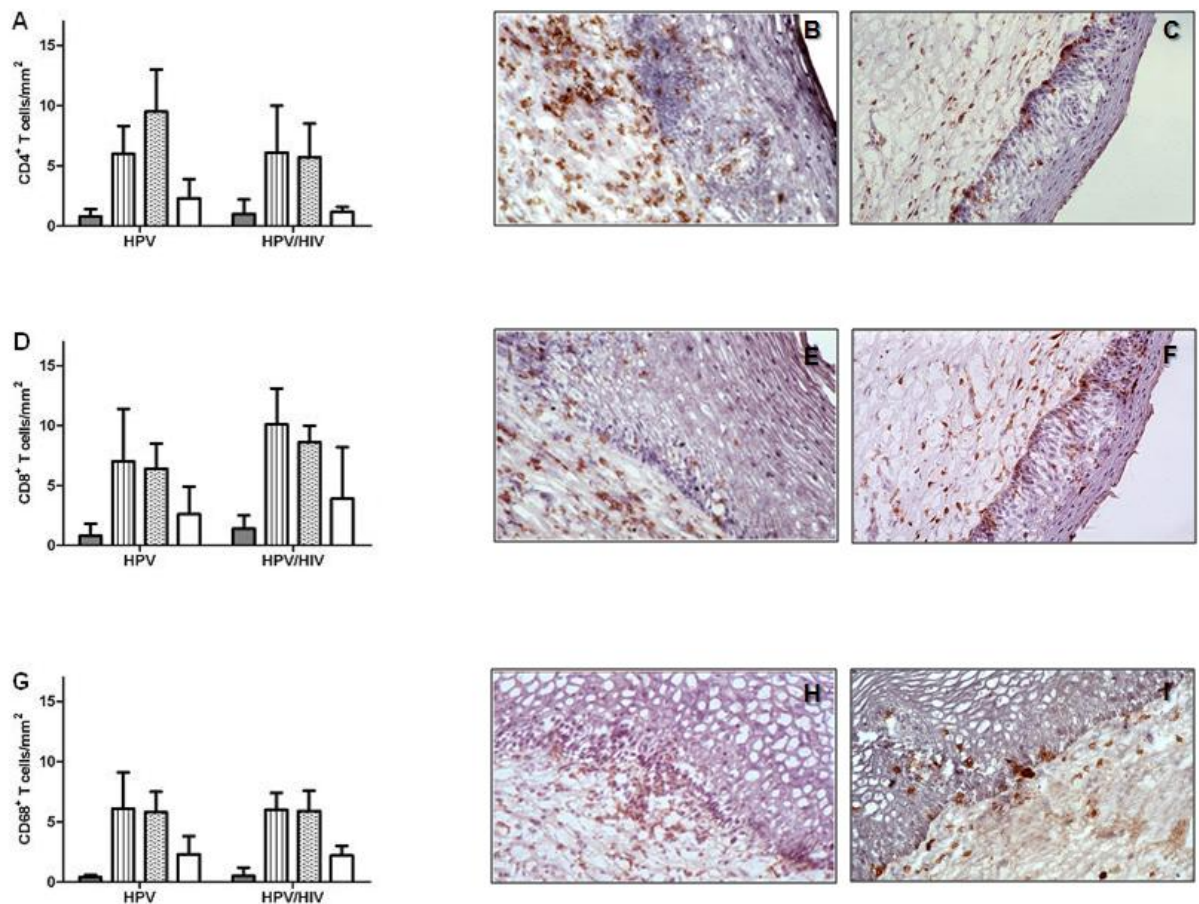


Figure 1: Distribution of CD4 (A, B, C), CD8 T cells (D, E, F), and macrophages (G, H, I) in uterine cervix from HPV (B, E, H) and HPV/HIV co-infected patients (C, F, I). The number of positive cells was demonstrated in epithelium , basal layer of epithelium , stroma and periglandular area (magnitude 400x, *p<0.05)

Apoptosis markers

The *bcl-2* gene family acts as regulators of the apoptotic pathway. The two most important apoptosis regulating proteins of this family are most likely Bax and Bcl2. The total number of cells that showed Bax expression ranged from 9.6 to 45.7 (21.1 ± 3.7) cells/mm² in HPV patients and 5.7 to 30.0 (18.2 ± 2.3) cells/mm² in HPV/HIV women (not statistically significant). No statistical significance was observed in Bax expression relative to the degree of CIN (low or high grade - Figure 2).

The total number of Bcl2-expressing cells ranged from 11.7 to 39.8 (23.6 ± 2.8) in the HPV and from 6.9 to 38.2 (19.4 ± 2.6) in the HPV/HIV women, with no statistical significant difference. No statistical significance was observed in Bcl2 expression relative to the degree of CIN (low or high grade - Figure 2). We further analyzed the Bax/Bcl2 expression ration in all cervical areas to determine whether there is a tendency for apoptotic and/or anti-apoptotic protein expression. However, we observed

a balance on Bax/Bcl2 expression on inflammatory cervical cells under HPV-infection ($r=0.18$, 0.36 and 0.20 , respectively on epithelium, basal layer of epithelium and stroma) and there is no HIV-1 interference on co-infected patients ($r= 0.02$, -0.14 and -0.44).

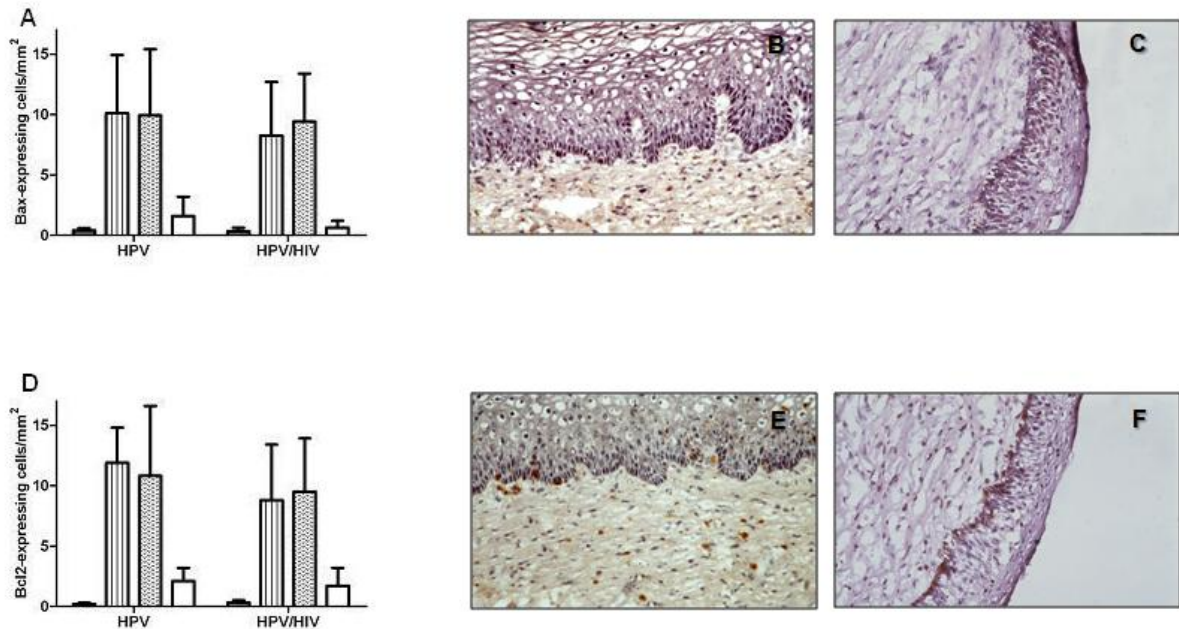






Figure 2: Distribution of Bax- (A, B, C) and Bcl2-expressing cells (D, E, F) in uterine cervix from HPV (B, E) and HPV/HIV co-infected patients (C, F). The number of positive cells was demonstrated in epithelium , basal layer of epithelium , stroma  and periglandular area .

Nitric oxide synthase

As macrophages are the major inflammatory cervix cells during HPV and HIV infection, we investigated the NOS2 expression to identify this important microbicidal product. Interestingly, NOS2 expression was located on basal layer of epithelium, suggesting expression by keratinocytes. The total number of cells/mm² that expressed NOS2 isoform, ranged from 12.0 to 22.2 (15.5 ± 1.2) in HPV patients, and from 12.9 to 16.2 (14.4 ± 0.4) in HPV/HIV women, which was not a statistical significant difference. There is no statistical significance among the NOS2 expression and CIN degree in both groups (Figure 3).

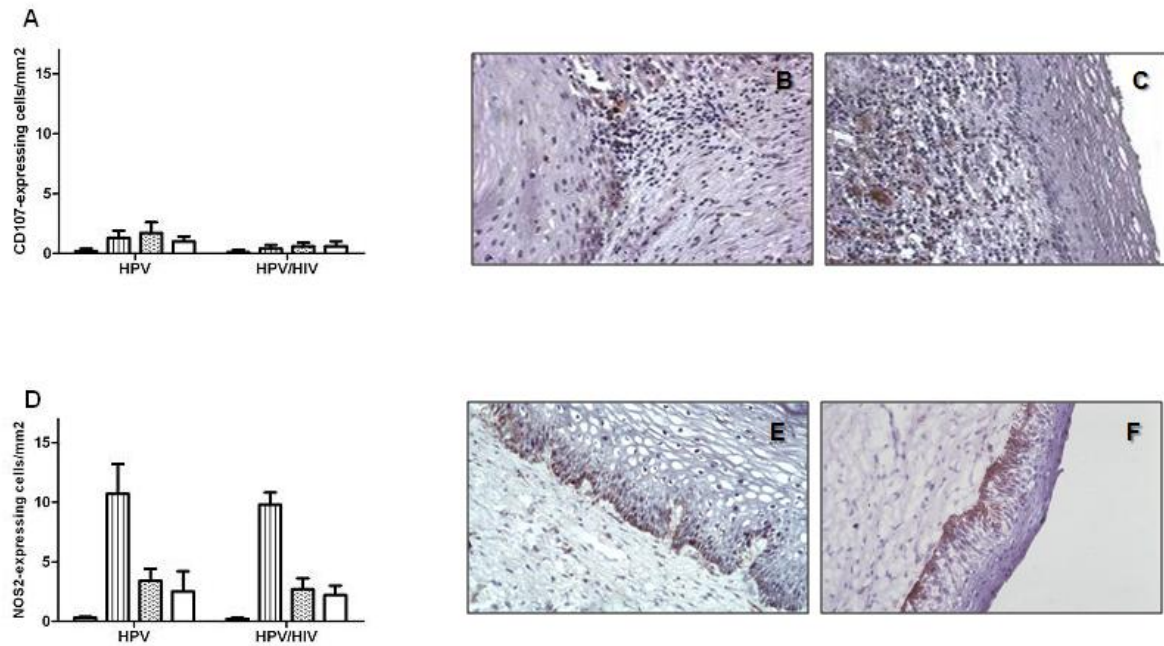


Figure 3: Distribution of CD107-(A, B, C) and NOS2-expressing cells (D, E, F) in uterine cervix from HPV (B, E) and HPV/HIV co-infected patients (C, F). The number of positive cells was demonstrated in epithelium , basal layer of epithelium , stroma and periglandular area .

Cytotoxicity mechanisms on uterine cervix

Fas and Perforin-based pathways account for most of T-cell-mediated cytotoxicity. However we observed few FasL-expressing cells in both groups (data not shown). Similarly, perforin expression was rare in both groups (< 1%).

For monitoring the exocytosis of lytic granules in CD8⁺ T cells, the expression of CD107a was analyzed in 6 HPV and 5 HPV/HIV women, when cervical biopsies were available. We observed that CD107a-expressing cells were identified in all HPV or HPV/HIV women. The total number of CD107a-expressing cells/mm² ranging from 1.3 to 6.2 (4.2±0.5) and 0.1 to 2.9 (1.6±0.5), respectively from HPV and HPV/HIV women (no statistical difference). However, analyzing the distribution of these cells, we observed a predominant localization in the basal layer of the epithelium (1.3±0.2 vs 0.5±0.1; *p*=0.04) and in stroma (2.0±0.3 vs 0.6±0.2; *p*=0.05) in HPV women (Figure 3). Beside CD107a marker could be expressed on NK, macrophages and activated T cells as a degranulation marker, we attempted to co-identify CD107a and CD8⁺T expression on cervical cells. The relation on both markers were more frequently identified in HPV infection (43.2±38.2% vs 9.5±20.6%) compared with HPV/HIV co-infection. These results could indicated

that HIV infection at cervical cells may abrogate inflammatory cells degranulation, including the perforin granules released by cervical CD8⁺T cells during HPV/HIV co-infection.

Discussion

The induction of cytotoxic cells is a central defense mechanism against viral infections, with the distribution of potentially cytotoxic cells being directly associated to the control of HPV-associated lesions (Scholten et al., 2005). In this study, the presence of inflammatory cells and their possible cytotoxic role were evaluated by measuring the number of Bax and Bcl-2-expressing cells as well as FasL and perforin in the uterine cervix of both HPV and HPV/HIV women.

CD4⁺T cells are involved in the prevention or limitation of lesions associated with HPV, based on the observed frequency of cervical neoplasias in HIV-infected patients (Nappi et al., 2005; Levi et al., 2002). We previously demonstrated (Nicol et al., 2005) an enhancement of cervical CD4⁺T cells in HPV compared to HPV/HIV group, indicating a possible correlation with peripheral cell count and reflecting cellular migration to the cervix. We further analyzed whether these inflammatory cells have a cytotoxic role by assessing FasL expression. This marker was only rarely identified in HPV inflammatory sites, independently of HIV co-infection, in both cervical lymphocytes and keratinocytes. This decrease could be related to the inhibition of the expression of Fas molecule on infected keratinocytes, since previous work had described (Kabsch and Alonso, 2002) that HPV-6 E5 was able to impair the formation of the death-inducing signaling complex on transfected keratinocytes pretreated with FasL by down regulating Fas expression. Otherwise, less pronounced Fas expression has been reported in adenosquamous carcinoma and squamous cell carcinoma (Mikaelsdottir et al., 2003). This death pathway may not have an important role in the host immunity induced by HPV infection. A robust peripheral cell migration to cervix, as demonstrated here, may not reflect a HPV specific-cell mediated immune response in those HPV patients.

No difference was seen in the number of macrophages in the cervical lesions from HPV and HPV/HIV patients. Tay (1987) has suggested that macrophage would be a first line of defense against HPV infection. In contrast, Hammes et al (2007) demonstrated a strong association between the malignant transformation of the cervix and an increase in the number of tumor-associated macrophages in the stroma and in the epithelium. They detected an increasing migration of macrophages into the epithelium along with the progression of CIN to invasive cancer, suggesting that these

cells are closely related to progression of CIN, and can be used as an applicable marker of disease progression.

NOS2 expression was assessed to define the possible cellular microbicidal activity of macrophages. Surprisingly, NOS2 expression was notably strong in the basal layer of the epithelium in both groups, which was not the same as the distribution of macrophages. We did not observe NOS2 up-regulation in HPV/HIV co-infection, suggesting that HIV-1 does not have any influence on NOS2 expression in these tissues. Oka et al. (2003) investigated biopsy specimens before radiotherapy from patients with squamous cell carcinoma of the cervix and detected NOS2 expression in tumor cells, showing a cytoplasmic staining pattern. There is some controversy about the role of NOS2 in HIV-1 immunopathogenesis. Meyaard et al (1994) demonstrated that there was no correlation between apoptosis and disease progression. Similarly, Hermann et al [31] confirmed this, observing a spontaneous decrease in NO delivery in PBMC cultures from HIV-1 patients, when compared to healthy donors, while their apoptosis levels remained elevated. De Andrea et al demonstrated that E6/E7 transduction enhanced the production of nitrites and nitrates as a result of NOS2 activation in cells transduced with the E6 and E7 genes from HPV 5,16 and 38 (De Andrea et al., 2007). The present results are, to our knowledge, the first to demonstrate NOS2 expression in cervical cells from women with HPV infection and HPV/HIV co-infection.

When the cellular markers of apoptosis were evaluated, similar expression of Bax and Bcl-2 was observed independently of HIV infection. Spinillo et al. (2004) showed an increase Bcl-2 expression correlated with the severity of CIN. The Tat protein of HIV-1 is capable of interfering also with Bcl-2 production. In particular, Tat modulates Bcl-2 production of neoplastic cell lines from AIDS Kaposi's sarcoma or other experimental carcinomas (Ariumi et al., 2001). However, Zheng et al. (2007) demonstrated that HIV Tat increased Bcl-2 expression in monocytes in a dose-dependent manner, under exposure of recombinant TRAIL, 51.54% of monocytes underwent apoptosis. Fernández-Larrosa et al. (2008) analyzed the expression of Bcl-2 and Bax in cell lines and their respective HIV-1 persistently-infected cell lines and observed the same level of expression of Bcl-2; however, expression of Bax was dramatically reduced in the mitochondria of persistently-infected cells when apoptosis was induced.

Regarding CD8⁺T cells, a previous study (Nicol et al., 2005) documented the presence of great numbers of these cells in the uterine cervix of HPV/HIV co-infected patients, suggesting that these lesions developed in spite of the presence of potentially cytotoxic T cells. Cytotoxic CD8⁺T lymphocytes (CTL) are essential for the immune control of viral pathogens. Cytotoxicity is mediated mainly by the release of pre-formed

cytolytic granules (Kagi et al., 1994; Barry and Bleackley, 2002). Perforin granules are released by cytotoxic cells after antigen recognition via MHC-I molecules. During the process of perforin degranulation, the soluble lytic agents are stored in a dense core, while the membrane that encloses the granules includes lysosomal glycoproteins such as lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) and LAMP-2 (Peters et al., 2001). Here, we note the rare presence of perforin granules in HPV infection, independent of the degree of CIN. In order to exploit the incorporation of LAMP into the plasma membrane following exocytosis to monitor lytic granule exocytosis, the expression of CD107a was analyzed. Although CD107-expressing cells have been identified in both groups, this marker was not present in the majority of inflammatory cervical cells, suggesting that HPV can somehow avoid the induction of an effective cellular immunity as well as the immune surveillance. One of the possible explanation was described by Tao et al. (2007) that observed a concomitant decrease in the expression of both TAP-1 and MHC-I antigen in condiloma acuminatum compared with normal cervix. These observations suggested that HPV might block TAP-1 expression and thereby decrease MHC-I assembly and expression by limiting peptide entry into the rough endoplasmic reticulum, abrogating the CD8 T cell recognition. However, the mechanism exploited by HPV that is responsible for down regulation of TAP-1 is still unclear. Another possible mechanism should be due to the direct effect of HPV on cells degranulation as recently described in the decrease of perforin degranulation in NK cells and in HIV-specific CD8⁺ T cells in HIV infected patients (Hong et al., 2010; Hersperger et al., 2010). Our results should a less pronounced expression of degranulating cells on HPV/HIV co-infected women. Further works need to be addressed to determine the direct effect of HPV on cell degranulation, but so far HIV may corroborate with the decreasing of perforin degranulation in cervical lesion.

While there are many remaining questions regarding the immunopathogenesis of HPV-associated neoplasia, a central question that still remain to be elucidate is how cytotoxic T cells are deactivated by HPV infection, and the effect of HIV-coinfection on host cellular immunity to HPV. Acquisition of such information may enable us to better understand the advancement of malignant intraepithelial lesions and lead to the design of therapeutic vaccines against HPV.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Mrs. MaryJo Avaliotis for the English review and Rodrigo Mexas for technical assistance with the pictures. We also thank Dr. Otoniel Martínez-Maza for reviewing of this manuscript. This work was funded by IPEC/Fiocruz and FAPERJ (E-26/170.485/2006), Rio de Janeiro, Brazil.

Table I. Characteristics of HPV infected women

Patients	Age (years)	Previous STD	CIN Classification	HPV DNA detection
<i>HIV-negative</i>				
A	22	<i>Gardnerella vaginalis</i>	I	ND
B	18	No	II	Positive
C	32	No	II	Positive
D	30	No	III	ND
E	46	No	III	Positive
F	27	No	II	Positive
G	33	No	II	ND
H	40	No	III	ND
I	43	No	III	Positive
<i>Media</i>	<i>31±3.1</i>			
<i>HIV-positive</i>				
J	37	No	III	Positive
K	33	No	II	Negative
L	21	No	I	Positive
M	32	Herpes Simplex	II	Positive
N	36	<i>Trychomonas vaginalis</i>	III	ND
O	40	No	II	ND
P	38	No	I	ND
Q	48	No	I	ND
R	24	Syphilis	III	Positive
S	23	No	II	Positive
T	40	No	I	ND
<i>Media</i>	<i>34±2.5</i>			

STD, sexual transmitted disease; CIN – Cervical Intraepithelial Neoplasia; ND – not determinated

References

- Ariumi, Y., Kaida, A., Hatanaka, M., Shimotohno, K, 2001. Functional cross-talk of HIV-1 Tat with p53 through its C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 556-561.
- Barry, M., Bleackley, R.C., 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 401–409.
- Beverly, P.C., Sadovnikova, E., Zhu, X., Hickling, J., Gao, L., Collins, S., Crawford, L., Vousden, K., Stauss, H.J., 1994. Strategies for studying mouse and human immune responses to human papillomavirus type 16. *Ciba. Found. Symp.* 187, 78–86.
- Bosch, F.X., Munoz, N., 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 89, 183–189.
- Brazilian Ministry of Health: Brazilian nomenclature for cervical cytology reports and guidelines. *Rev Bras Cancer* 2006, 52, 213-236.
- De Andrea, M., Mondini, M., Azzimonti, B., Dell'Oste, V., Germano, S., Gaudino, G., Musso, T., Landolfo, S., Gariglio, M., 2007. Alpha- and betapapillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. *Virus Res.* 124, 220-225.
- De Bruijn, M.L.H., Schuurhuis, D.H., Vierboom, M.P.M., Vermeulen, H., de Cock, K.A.J., Ooms, M.E., Rensing, M.E., Toebe, M., Franken, K.L.M.C, Drijfhout, J.W., Ottenhoff, T.H.M, Offringa, R., Melief, C.J.M. 1998. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res.* 58, 724–731.
- Denny, L., Boa, R., Williamson, A.L., Allan, B., Hardie, D., Stan, R., Myer, L., 2008. Human papillomavirus infection and cervical disease in human immunodeficiency virus-1-infected women. *Obstet. Gynecol.* 111, 1380-1387.
- El-Ghobashy, A.A., Shaaban, A.M., Innes, J., Prime, W., Herrington, C.S., 2007. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and apoptosis-related proteins in endocervical lesions. *Eur. J. Cancer* 43, 2011-2018.
- Fernández-Larrosa, P.N., Croci, D.O., Riva, D.A., Bibini, M., Luzzi, R., Saracco, M., Mersich, S.E., Rabinovich, G.A., Peralta, L.M., 2008. Apoptosis resistance in HIV-1 persistently-infected cells is independent of active viral replication and involves modulation of the apoptotic mitochondrial pathway. *Retrovirology* 5, 19-30.
- Frazer, I.H., 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 46-54.
- Groeneveld, P.H., Kroon, F.P., Nibbering, P.H., Bruisten, S.M., van Swieten, P., van Furth, R., 1996. Increased production of nitric oxide correlates with viral load and activation of mononuclear phagocytes in HIV-infected patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 28, 341–345.

Hammes, L.S., Tekmal, R.R., Naud, P., Edelweiss, M.I., Kirma, N., Valente, P.T., Syrjänen, K.J., Cunha-Filho, J.S., 2007. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. *Gynecol. Oncol.* 105, 157-165.

Hermann, E., Idziorek, T., Kusnierz, J.P., Mouton, Y., Capron, A., Bahr, G.M., 1997. Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 387-397.

Hersperger, A.R., Pereyra, F., Nason, M., Demers, K., Sheth, P., Shin, L.Y., Kovacs, C.M., Rodriguez, B., Sieg, S.F., Teixeira-Johnson, L., Gudonis, D., Goepfert, P.A., Lederman, M.M., Frank, I., Makedonas, G., Kaul, R., Walker, B.D., Betts, M.R., 2010. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PloS. Pathog.* 6, 1-13.

Hong, H.S., Eberhard, J.M., Keudel, P., Bollmann, B.A., Ahmad, F., Ballmaier, M., Bhatnagar, N., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R.E., Meyer-Olson, D., 2010. Phenotypically and functionally distinct subsets contribute to the expansion of CD56-/CD16+ natural killer cells in HIV infection. *AIDS* 24, 1823-1834.

Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.Y., Libermann, T.A., Jin, J., Harper, J.W., Munger, K., 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Virol.* 81, 9737-9747.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69-90.

Jiménez, J.L., González-Nicolás, J., Alvarez, S., Fresno, M., Muñoz-Fernández, M.A., 2001. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. *J Virol* 75, 4655-4663.

Kabsch, K., Alonso, A., 2002. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J. Virol.* 76, 2162-2172.

Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., Golstein, P., 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-530.

Kotecha, M.T., Afghan, R.K., Vasilikopoulou, E., Wilson, E., Marsh, P., Kast, W.M., Davies, D.H., Caparros-Wanderley, W., 2003. Enhanced tumour growth after DNA vaccination against human papilloma virus E7 oncoprotein: evidence for tumour-induced immune deviation. *Vaccine* 21, 2506-2515.

Lehtovirta, P., Paavonen, J., Heikinheimo, O., 2008. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Int. J. STD. AIDS* 19, 37-41.

- Levi, J.E., Kleter, B., Quint, W.G., Fink, M.C., Canto, C.L., Matsubara, R., Linhares, I., Segurado, A., Vanderborght, B., Neto, J.E., Van Doorn, L.J., 2002. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3341-3345.
- Machida, K., Cheng, K.T., Sung, V.M., Shimodaira, S., Lindsay, K.L., Levine, A.M., Lai, M.Y., Lai, M.M., 2004. Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 4262–4267.
- Manuri, P.R., Nehete, B., Nehete, P.N., Reisenauer, R., Wardell, S., Courtney, A.N., Gambhira, R., Lomada, D., Chopra, A.K., Sastry, K.J., 2007. Intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16 induces systemic and mucosal cellular immune responses and tumor protection. *Vaccine* 25, 3302-3310.
- Meyaard, L., Otto, S.A., Keet, I.P., Roos, M.T., Miedema, F., 1994. Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J Clin Invest* 93, 982-988.
- Mikaelsdottir, E.K., Benediktsdottir, K.R., Olafsdottir, K., Arnadottir, T., Ragnarsson, G.B., Olafsson, K., Sigurdsson, K., Kristjansdottir, G.S., Inslund, A.K., Ogmundsdottir, H.M., Rafnar, T., 2003. HPV subtypes and immunological parameters of cervical cancer in Iceland during two time periods, 1958-1960 and 1995-1996. *Gynecol. Oncol.* 89, 22-30.
- Nappi, L., Carriero, C., Bettocchi, S., Herrero, J., Vimercati, A., Putignano, G., 2005. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 121, 226-32.
- Nicol, A.F., Fernandes, A.T.G., Grinsztejn, B.G., Russomano, F., Lapa e Silva, J.R., Tristão, A., Pérez, M., Maza, O.M, Bonecini-Almeida, M.G., 2005. Distribution of immune cell subsets and cytokine producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV) infected women: Influence of HIV-1 co-infection. *Diagn. Mol. Pathol.* 14: 39-47.
- Oka, K., Suzuki, Y., Iida, H., Nakano, T., 2003. Pd-ECGF positivity correlates with better survival, while iNOS has no predictive value for cervical carcinomas treated with radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57, 217-221.
- Pagliusi, S. World Health Organization. Human papillomavirus infection and cervical cancer Available at: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/. Accessed October 26, 2006
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 173, 1099–1109.

- Scholten, K.B., Schreurs, M.W., Ruizendaal, J.J., Kueter, E.W., Kramer, D., Veenbergen, S., Meijer, C.J., Hooijberg, E., 2005. Preservation and redirection of HPV16E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer. *Clin. Immunol.* 114, 119–129.
- Sigurdsson, K., Taddeo, F.J., Benediktsdottir, K.R., Olafsdottir, K., Sigvaldason, H., Oddsson, K., Rafnar, T., 2007. HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: A population-based study. *Int. J. Cancer* 121, 2682-2687.
- Spinillo, A., Zara, F., Zappatore, R., Cesari, S., Bergante, C., Morbini, P., 2004. Apoptosis-related proteins and cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Gynecol. Oncol.* 95, 500-505.
- Tao J, Zhang XP, Chen XP, Li Y, Liu YQ, Tian J, Huang CZ, Shen GX, Tu, Y.T., 2007. Local expression of TAP-1 and MHC-I molecules and their relationship in condyloma acuminatum. *Clin. Exp. Dermatol.* 32, 550-555.
- Tay, S.K., Jenkins, D., Maddox, P., Hogg, N., Singer, A., 1987. Tissue macrophage response in human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 94, 1094-1097.
- Torre, D., Ferrario, G., 1996. Immunological aspects of nitric oxide in HIV-1 infection. *Med. Hypotheses* 47, 405–407.
- Waterhouse, N.J., Clarke, C.J., Sedelies, K.A., Teng, M.W., Trapani, J.A., 2004. Cytotoxic lymphocytes; instigators of dramatic target cell death. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1033-1040.
- Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P.H., Mountz, J.D., 1996. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest.* 98, 1107-1113.
- Zheng, L., Yang, Y., Guocai, L., Pauza, C.D., Salvato, M.S., 2007. HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand. *Intervirology* 50. 224-228.

3. Manuscrito 2 submetido a revista *Apoptosis*

“Cervical intraepithelial neoplasia is associated with polymorphism on apoptotic *BAX* (-248G>A) gene but not on antiapoptotic *BCL2* (-938 C>A) gene”

Neste estudo, identificamos o polimorfismo em genes relacionados ao controle da apoptose *BCL2* (-938C>A) e *BAX* (-248G>A) em uma coorte de mulheres com histórico de lesões cervicais e o associamos ao aparecimentos destas lesões.

TITLE PAGE

Cervical intraepithelial neoplasia is associated with polymorphism in apoptotic *BAX* (-248G>A) gene but not on anti-apoptotic *BCL2* (-938 C>A) gene

Ana Teresa G. Fernandes¹, Natália P. Rocha¹, Fabio Russomano², Beatriz J. Grinsztejn³, Ruth K. Friedman³, Amanda C. Pinto⁴, Evandro M. Klumb⁵, Elizabeth Avvad⁶, Jacyara M. Macedo⁴, & Maria da Gloria Bonecini-Almeida¹

Laboratory of Immunology and Immunogenetics in Infectious Diseases at Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation¹; Department of Gynecology at Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation²; STD/AIDS Clinical Research Laboratory at Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil³; Department of Biochemistry, State University of Rio de Janeiro - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil⁴; Rheumatology Department Lupus Clinic at State University of Rio de Janeiro⁵; Department of Pathological Anatomy at Fernandes Figueira Institute⁶.

Corresponding author: Maria da Glória Bonecini-Almeida, Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infeciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-900, e-mail: gloria.bonecini@ipecc.fiocruz.br, Phone number:(+5521) 3865-9531, Fax number: (+5521) 2590-9988

Abstract HPV is associated with cervical cancer and plays a crucial role in tumor formation. Apoptosis is regulated by different pathways involving a number of genes that either promote (*BCL2* gene) or inhibit (*BAX* gene) cell death. Our goal was to determine whether the SNPs of *BCL2* (-248G>A) and *BAX* (-938C>A) promoters are associated with risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) outcome. Two hundred and thirty-one cases showing CIN lesions determined by histopathological analysis and further classified as either low squamous intraepithelial lesion (LSIL, n=101) or high squamous intraepithelial lesion (HSIL, n=130) and control subjects (n=266) with no gynecologically proven CIN were recruited. Genomic DNA was isolated, and RFLP-PCR was performed to identify *BCL2* and *BAX* polymorphisms. The observed genotype frequencies of these SNPs were in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium in the cases and control groups. No statistical difference in the genotype and allelic frequency of *BCL-2* (-938C>A) polymorphism was observed between all cases and control groups. However, a strong association was identified in the GG genotype frequency of *BAX* (-248G>A) polymorphism between cases and controls. When LSIL and HSIL groups were compared, no statistical difference was observed, indicating that GG genotype may influence the risk of CIN but not the lesion severity. In conclusion, our data from a relatively large case–control study provide evidence that allele G carriers in the promoter regions of *BAX* (-248G>A) can be related to CIN development when compared with allele A carriers that play a protective role; however, allele G was not correlated with the disease severity.

Keywords: Cervical lesions, polymorphism, apoptosis

Introduction

Cervical cancer was the 4th cause of cancer death in 2010 [1] and is the second most frequent cancer in women worldwide. Approximately 500,000 new cervical cancer cases and 273,505 cervical cancer deaths are reported per year [2]. Human papillomaviruses (HPVs) are associated with cervical cancer in most instances, and the early genes E6 and E7 from high-risk HPVs play a crucial role in tumor formation, altering cell cycle control and downregulating the regulatory function of the tumor suppressors p53 and Rb [3]. Various lines of evidence indicate that HPV infection is necessary but not sufficient for induction of the malignant changes and that other factors are involved [4], such as ethnicity, age, menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use [5-7].

Apoptosis is regulated by different pathways involving a number of genes that either promote or inhibit cell death. The balance between death antagonists and agonists determines whether a cell will survive or undergo apoptosis. The best characterized apoptosis regulators include the anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 (*BCL2*) gene and the pro-apoptotic B-cell lymphoma 2-associated X protein (*BAX*) gene. The protein products of these two genes physically interact with each other, and their relative levels are important determinants of the apoptosis rate [8-10]. The HPV E6 oncoprotein has been associated with the modulation of a wide range of apoptosis regulators that belong to the extrinsic (CD95 or FADD) and intrinsic (*BAX* or *BCL-2*) pathways or are common regulators to both pathways, such as the anti-apoptotic c-IAP2 protein [11-13]. The *BCL2* gene is located on chromosome 18q21.3, and its promoter gene single nucleotide polymorphism (SNP), the -938C>A genotype, is known to be correlated with low Bcl-2 expression and is associated with disease progression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [14], oropharyngeal squamous cell carcinoma [15], prostate carcinoma [16], and epithelial ovarian cancer [17]. The *BAX* gene has been mapped to chromosome 19q13.3. A SNP located within the 5' untranslated region of the *BAX* promoter, -248G>A, has been described, and the A allele was reported to be

associated with both reduced expression of BAX [18] and altered susceptibility to chronic lymphocytic leukemia [19-24].

To our knowledge, there is no report associating *BAX* and *BCL2* gene polymorphism with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and/or cancer risk. Our goal was to determine whether the SNPs of *BAX* (-938C>A) and *BCL2* (-248G>A) promoters are associated with risk of CIN outcome.

Materials and Methods

Study population

From November 2008 to October 2010, 497 women were enrolled for genotyping. Patients with histologically confirmed cervical intraepithelial neoplasia (CIN, n=231) were enrolled consecutively from two groups from Fiocruz Clinical Care Units: the Fernandes Figueira Woman, Child and Adolescent National Institute (IFF, n=182) and the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC, n=49). All patients received free appropriate clinical treatment [25-26] and were asked to sign a consent form approved by the Institutional Review Board of both IPEC and IFF/Fiocruz. Control subjects who were genetically unrelated to the cases enrolled and with no gynecologically proven CIN 1–3 were recruited from two Clinical Care Units from the State University of Rio de Janeiro (UERJ, n=200): the Piquet Carneiro Gynecology Ambulatory and Pedro Ernesto Hospital, and from IPEC coworkers (n=66). A standardized questionnaire was used to establish clinical and demographic data, including ethnicity, age, menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use.

BCL2 and *BAX* genotyping

Genomic DNA was isolated with the QIAGEN DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Restriction fragment length polymorphism–polymerase chain reaction (RFLP-PCR) was performed to identify *BCL2* (-938C>A) and *BAX* (-248G>A) polymorphisms in the promoter regions. Each PCR

was performed in a 25 μ L reaction mixture containing 50 ng of genomic DNA templates, 12.5 pmol of each primer, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl, and 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, and 1.5U Taq polymerase (Promega Corporation, Madison, WI). The PCR profile consisted of an initial melting step at 96°C for 5 min followed by 35 cycles at 96°C for 45s, at 60°C for 40s, and at 72°C for 30s, and a final extension step at 72°C for 10 min.

For the *BCL2* (-938C>A) polymorphism in the promoter, the primers (5'-CTGCCTTCATTTATCCAGCA-3' and 5'-GGCGGCAGATGAATTACAA-3') amplified a 300-bp DNA fragment. The PCR product was digested by *BccI* (New England Biolabs, Beverly, MA) overnight at 37°C. The wild-type allele (CC) produced two bands of 189 and 111 bp; the wild-type/variant allele (CA) produced three bands of 111, 189, and 300 bp, and the variant allele (AA) produced a single 300-bp band [27].

For the *BAX* (-248G>A) polymorphism, the primers (5'-CATTAGAGCTGCGATTGGACCG-3' and 5'-GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT-3') amplified a 109-bp DNA fragment. The PCR product was digested by *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA) overnight at 37°C. The digested product was separated on a 2.5% NuSieve 3:1 agarose (FMC BioProducts, Rockland, ME) gel with ethidium bromide. The homozygote (GG) wild-type allele produced two bands (89 and 20 bp), and the wild-type/variant allele (GA) produced 20, 89, and 109 bp; the variant allele (AA) lacks the *MspI* restriction site and therefore produced a single 109-bp band.

Statistical analysis

The deviation of the genetic variants from Hardy-Weinberg equilibrium was determined by the chi-square test (χ^2) in both the case and control groups. We used the χ^2 test to compare the differences in each allele and genotype of *BCL2* and *BAX* polymorphism frequency. Additionally, we used unconditional univariate and multivariate logistic regression analyses to examine the associations between the selected SNPs and CIN risk by the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) with and without adjustment for age, ethnicity, smoking status, alcohol use, number of pregnancies, menarche, and age at first sexual intercourse between CIN cases and controls. To

evaluate interactions between *BCL2* and *BAX* genotypes in the risk of development of low and high CIN, logistic regression analysis was also used to assess potential interactions by evaluating departures from additive and multiplicative interaction models, comparing Low-grade and High-grade CIN groups among themselves and with controls. All statistical tests were two-sided, a *p* value of 0.05 was considered significant, and analyses were performed using Epi Info 6 (Version 6.04, July 1996), SNPStats [28], and SPSS (Version 16, September 2007).

Results

Characteristics of the study population

A total of 497 women were enrolled for genotyping. Two hundred and thirty-one cases showed CIN classified as either low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL, *n*=101) or high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL, *n*=130), determined by histopathological analysis at the baseline gynecological visit. Two hundred sixty-six women showed no CIN upon gynecological analysis and were enrolled as healthy control subjects. Table I describes the clinical and behavior data on each group. Overall, the ages ranged from 18 to 65 (36.45 ± 10.34) years. In the LSIL and HSIL groups, the average ages were 37.23 ± 10.48 and 38.03 ± 9.61 years, respectively. The average age in the control group was 35.37 ± 10.56 years. There was no statistical difference in age among groups. No significant difference was found among groups when ethnicity, age, menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use were analyzed (Table I).

BCL2 (-938C>A) and *BAX* (-248G>A) gene distributions and their associations with CIN presence

The genotype and allele distributions of *BAX* (-248G>A) and *BCL-2* (-938C>A) in the cases and controls are summarized in Table II. The observed genotype frequencies of

these SNPs were in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium in the cases and control groups in *BAX* ($p=0.29$ and 0.08 , respectively) and *BCL2* ($p=0.69$ and 0.39). We did not observe an association between genotype and allelic frequency of *BCL-2* (-938C>A) polymorphism among cases and control groups ($p>0.05$) (Table II). Furthermore, on dividing the CIN group in two subgroups according to the degree of cervical lesion (LSIL vs HSIL), there was still no difference when compared with the control group (Table III). Testing the *BCL-2* (-938C>A) genotype and allele frequencies by univariate analysis, including ethnicity, age, menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use, did not change the risk for CIN development (data not shown). However, using a codominant model, we identified a strong association in the GG genotype ($p<0.001$; OR= 0.35) and G allele ($p<0.001$; OR= 3.61 [2.5-5.2]) frequency of *BAX* (-248G>A) polymorphism between cases and controls. In addition, when GG genotype was analyzed in a dominant model, a 3.63-fold (2.39-5.53) risk factor for lesion development was seen (Table II). There was no significant difference overall when the OR was adjusted for univariate or multivariate analysis.

BAX (-248G>A) distributions and their associations with CIN progression

When women with LSIL or HSIL were compared among themselves, there were no differences on *BAX* (-248G>A) genotype or allelic frequencies (Table III). However, when those subgroups were compared with the healthy control group, a slight increase in risk factor was identified in LSIL women ($p<0.001$, OR = 4.28 [2.36-7.83]), indicating that GG genotype may influence the risk of CIN but not the lesion severity. When the analysis was adjusted by ethnicity, age, menarche, age at first sexual intercourse, number of pregnancies, and tobacco use, no interference was found between variant genotype and risk of CIN among groups (data not shown).

HIV-1 influence on CIN presence

Further analyses were performed according to HIV-1 serology: 49 of 231 (21%) CIN cases were HIV-positive. A strong association was observed between genotype GG and lesion presence either in CIN/HIV⁻ or CIN/HIV⁺ when they were compared with the control group ($p < 0.001$ – Table V). Besides, the G allele was related to lesion severity in CIN/HIV⁻ ($p < 0.001$) or CIN/HIV⁺ ($p = 0.02$) when compared with the control groups. It was not possible to compare the *BAX* polymorphism and CIN progression because the number of cases was low (Table IV).

Influence of the extended genotypes for *BAX* (-248G>A) and *BCL2* (-938C>A) in CIN presence

The extended genotypes for *BAX* (-248G>A) and *BCL2* (-938C>A) were analyzed, and no association was found (Table V).

Discussion

In this case-control study, we assessed the effects of *Bax* (-248G>A) and *Bcl2* (-938C>A) on risk of cervical intraepithelial lesions. It is now well known that both neoplastic events and cancer initiation are influenced by genetic background. Control of cell proliferation is achieved by balance between the regulation of apoptosis and cell cycle genes. *BCL2* is an anti-apoptotic protein and plays an important role in the regulation of the rate of apoptosis [29]. When *BCL2* is overexpressed, the cell killing process induced by various stimuli can be prevented or markedly reduced [30]. However, our single-locus analysis for *BCL2* (-938C>A) did not reveal any significant association with development of CIN. To our knowledge, no study has been reported with regard to the association of *BCL2* polymorphism with CIN, cervical cancer, or HPV. The association of *BCL2* polymorphism to cancer and other diseases is still

contradictory. Kuhlmann et al. [31] and Chen et al. [27] did not identify any association between *BCL2* (-938C>A) polymorphism and risk of multiple sclerosis or squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Nevertheless, in the literature, the *BCL2* (-938AA) genotype has been associated with increased BCL-2 expression and a novel unfavorable genetic marker in patients with B- chronic lymphocytic leukemia (CLL) [14]. Hirata et al. [32] observed that *BCL2* -938C/C carriers showed higher biochemical recurrence in prostate cancer than did -938C>A + A/A. Besides, in oropharyngeal squamous cell carcinoma, the *BCL2* -938C>A genotype is associated with relapse and survival. To our best knowledge, there is no study associating *BCL2* (-938C>A) with CIN. More studies should be performed to identify the correlations between *BCL2* expression and CIN, and their association with their respective SNPs.

When *BAX* (-238G>A) polymorphism was analyzed, we identified a strong association ($p < 0.001$) between GG genotype and risk of CIN. Studies have described an association between genotypes of the G(-248)A polymorphism located in the promoter region of the *BAX* gene and low *BAX* expression, more advanced stage, treatment resistance, and short overall survival in B-CLL (19, 21-22). However, Skogsberg et al. [24] could not show any difference in overall survival among patients with CLL displaying the -248G>A polymorphism, and they related that this polymorphism did not influence outcome specifically in treated CLL. To our best knowledge, there is no study in the literature correlating *BAX* (-248G>A) and development of CIN or cervical cancer. Although this genotype is related with higher production of *BAX* protein [22], HPV has been reported to play an anti-apoptotic role by the inhibition of *BAX* activity post-transcriptionally [33], which is caused by the stimulation of p53 degradation. Oh et al. demonstrated that E5 decreased *BAX* expression through the stimulation of protein degradation by an ubiquitin-proteasome-dependent pathway without decreased mRNA levels. Besides, Li et al. [34] observed that the levels of the microRNA miR-886-5p were overexpressed in human cervical squamous cell carcinoma (CSCC) cell lines, SiHa, and lowered *BAX* expression. The knockdown of this miRNA increased *BAX* protein and apoptotic cell death in cells of the CSCC.

In conclusion, our data from a relatively large case–control study provide evidence that allele G carriers in the promoter regions of BAX (-248G>A) can be related to CIN development when compared with allele A carriers that play a protective role; however, allele G was not correlated with the disease severity.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, 170485/2006) and IPEC-Fiocruz. ATGF received a fellowship from CAPES, Brazil.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Jemal A., Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA. Cancer J Clin* 61: 69-90. DOI: 10.3322/caac.20107
2. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, Louie KS, Bruni L, Munoz J, Diaz M, Irwin K, Gacic M, Beauvais O, Albero G, Ferrer E, Byrne S, Bosch FX (2007) HPV and cervical cancer in the world. 2007 report. WHO/ICO information centre on HPV and cervical cancer (HPV information centre). *Vaccine* 25n, C110. doi:10.1016/S0264-410X(07)01183-8
3. Rosty C, Sheffer MM, Tsafrir D, Stransky N, Tsafrir I, Peter M, Cre´moux P, Rochefordie`re A, Salmon R, Dorval D, Thierry J, Couturier J, Radvanyi F, Domany E, Sastre-Garau X (2005) Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* 24: 7094–7104. doi:10.1038/sj.onc.1208854
4. Martin CM, Astbury K, O'Leary JJ (2006) Molecular profiling of cervical neoplasia. *Expert Rev Mol Diagn* 6: 217–229. doi:10.1586/14737159.6.2.217

5. Sierra-Torres CH, Au WW, Arrastia CD, Cajas-Salazar N, Robazetti SC, Payne DA, Tying SK (2003) Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia. *Environ Mol Mutagen* 41: 69-76. DOI: 10.1002/em.10132
6. Sierra-Torres CH, Tying SK, Au WW (2003) Risk contribution of sexual behavior and cigarette smoking to cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 13: 617-625. DOI: 10.1046/j.1525-1438.2003.13392.x
7. Minkoff H, Feldman JG, Strickler HD, Watts DH, Bacon MC, Levine A, Palefsky JM, Burk R, Cohen MH, Anastos K (2004). Relationship between smoking and human papillomavirus infections in HIV-infected and -uninfected women. *J Infect Dis* 189: 1821-1828. DOI: 10.1086/383479
8. Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC (1999) Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol* 30: 1097–1105. DOI:10.1016/S0046-8177(99)90229-0
9. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647–656. DOI:10.1038/nrc883
10. Kim HJ, Jang SI, Kim YJ, Pae HO, Won HY, Hong KH, Oh H, Kwon TO, Chung HT (2004) 4-Acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3, 15-diol from *Isaria japonica* mediates apoptosis of rat bladder carcinoma NBT-II cells by decreasing anti-apoptotic Bcl-2 expression and increasing proapoptotic Bax expression. *Am J Chin Med* 32: 377–387. DOI: 10.1142/S0192415X0400203X
11. Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH, Rösl F. (2002) Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 21: 165–175. DOI: 10.1038/sj/onc/1204979
12. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 25729–25744. DOI: 10.1074/jbc.M401172200

13. Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, Chen IS, Liu X (2005) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene* 24: 5069–5078. DOI:10.1038/sj.onc.1208691
14. Nuckel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Dürig J, Jöckel KH, Dührsen U, Siffert W (2007) Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109: 290-297. DOI: 10.1182/blood-2006-03-007567
15. Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nüchel H, Lang S, Schmid KW, Siffert W, Bachmann HS (2009) The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 20: 1094-1099. DOI: 10.1093/annonc/mdn763
16. Bachmann HS, Heukamp LC, Schmitz KJ, Hilburn CF, Kahl P, Buettner R, Nüchel H, Eisenhardt A, Rübber H, Schmid KW, Siffert W, Eggert A, Schramm A, Schulte JH (2011) Regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. *Int J Cancer* Jan 4. DOI: 10.1002/ijc.25904
17. Heubner M, Wimberger P, Otterbach F, Kasimir-Bauer S, Siffert W, Kimmig R, Nüchel H (2009) Association of the AA genotype of the BCL2 (-938C>A) promoter polymorphism with better survival in ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 24: 223-229.
18. Ocaña MG, Valle-Garay E, Montes AH, Meana A, Cartón JA, Fierer J, Celada A, Asensi V (2007) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis. *Genet Med* 9: 249-55. DOI: 10.1097/GIM.0b013e318039b23d
19. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP (2002) Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 187: 199–205. DOI:10.1016/S0304-3835(02)00378-6

20. Moshynska O, Sankaran K, Saxena A (2003) Molecular detection of the G (-248G/A) BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Mol Pathol* 56: 205–209. DOI:10.1136/mp.56.4.205
21. Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, Bentley P, Fegan C (2005) Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 23: 1514–1521. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.192
22. Fegan C, Starczynski J, Pratt G, Pepper C (2006) The role of the bax gene polymorphism G(-248)A in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 20: 1460–1461. DOI:10.1038/sj.leu.2404280
23. Nüchel H, Frey UH, Sellmann L, Bau M, Dürig J, Dührsen U, Siffert W (2006) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival. *Leukemia* 20: 724. DOI:10.1038/sj.leu.2404126
24. Skogsberg S, Tobin G, Kröber A, Kienle D, Thunberg U, Aleskog A, Karlsson K, Laurell A, Merup M, Vilpo J, Sundström C, Roos G, Jernberg-Wiklund H, Döhner H, Nilsson K, Stilgenbauer S, Rosenquist R (2006) The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 20: 77–81. DOI:10.1038/sj.leu.2404030
25. Brazilian Ministry of Health (2006) Brazilian nomenclature for cervical cytology reports and guidelines. *Rev Bras Cancer* 52: 213-236.
26. de Andrade ,AC, Luz PM, Velasque L, Veloso VG, Moreira RI, Russomano F, Chicarino-Coelho J, Pires E, Levi JE, Grinsztejn B, Friedman RK (2011) Factors Associated with Colposcopy-Histopathology Confirmed Cervical Intraepithelial Neoplasia among HIV-Infected Women from Rio De Janeiro, Brazil. *PLoS One* 6: e18297. DOI:10.1371/journal.pone.0018297

27. Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W, Wei Q (2007) Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 28: 2008-2012. DOI: 10.1093/carcin/bgm172
28. Solé X, Guinó E, Valls J, Injesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928-1929. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl268
29. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H (2000) Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4379–4386. DOI: 10.1210/jc.85.11.4379
30. Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1–6. DOI: 0021-9525/94/01/1/6
31. Kuhlmann T, Glas M, zum Bruch C, Mueller W, Weber A, Zipp F, Brück W (2002) Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 129: 154-60. DOI:10.1016/S0165-5728(02)00167-4
32. Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Suehiro Y, Shahryari V, Ahmad AE, Tabatabai ZL, Igawa M, Dahiya R (2009) Bcl2 -938C>A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 181: 1907-1912. DOI:10.1016/j.juro.2008.11.093
33. Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J, Hoppe-Seyler F (2006) Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* 25: 4009-4015. DOI:10.1038/sj.onc.1209429
34. Li JH, Xiao X, Zhang YN, Wang YM, Feng LM, Wu YM, Zhang YX (2011) MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 120: 145-51. DOI:10.1016/j.ygyno.2010.09.009

Table I. Clinical and environmental data

	ALL	Cervical Intraepithelial Neoplasia		CONTROL
		LSIL	HSIL	
<i>Age (Average ± SD)</i>	36.45 ± 10.34	37.23 ± 10.48	38.03 ± 9.61	35.37 ± 10.56
<i>Ethnicity (n)</i>				
White	185	41	41	103
Mixed	187	37	63	87
Indigen	4	1	1	2
Afro-brazilian	120	22	25	73
No determinated	1	-	-	1
<i>Tobacoo use (n)</i>				
Yes	215	47	74	94
No	202	53	56	93
Unknown	80	1	-	79
<i>Alcohol use (n)</i>				
Yes	162	72	88	2
No	65	28	37	-
Unknown	270	1	5	264
<i>First Sexual Intercourse Age (Average ± SD)</i>	17.49 ± 3.86	17.82 ± 4.10	17.06 ± 3.38	17.78 ± 3.61
<i>Menarche (Average ± SD)</i>	12.89 ± 1.70	12.81 ± 1.72	12.72 ± 1.55	12.86 ± 1.78
<i>Pregnancies number (Average ± SD)</i>	2.48 ± 1.99	2.57 ± 2.16	2.48 ± 1.79	2.44 ± 2.07

*LSIL, Low Squamous Intraepithelial Lesions;

**HSIL, High Squamous Intraepithelial Lesions.

Table II. *BCL2* (-938C>A) and *BAX* (-248G>A) polymorphisms and risk of cervical intraepithelial neoplasia

Polymorphisms	CIN Cases n=231 (%)	Controls n=266 (%)	<i>p</i>	χ^2	OR
<i>BCL2</i> (-938 C>A)					
CC	67 (29)	73 (27.4)	0.70	0.15	1.08 [0.72-1.63]
CA	112 (48.5)	126 (47.4)			0.97
AA	52 (22.5)	67 (25.2)			0.85
CC	67 (29)	73 (27.4)	0.70	0.15	1.08 [0.72-1.63]
AA+CA	164 (71)	193 (72.6)			
AA	52 (22.5)	67 (25.2)	0.02	5.36	0.61 [0.39-0.95]
CC+CA	179 (77.5)	140 (52.6)			
Alleles					
C	246 (53.2)	272 (51.1)	0.5	0.44	1.09 [0.84-1.41]
A	216 (46.8)	260 (48.9)			
<i>BAX</i> (-248G>A)					
GG	184 (79.6)	138 (51.8)	<0.001	49.7	↓
GA	46 (20.0)	99 (37.2)			0.35
AA	↓ (0.4)	29 (11.0)			0.03
GG	184 (79.6)	138 (51.8)	<0.001	41.81	3.63 [2.39-5.53]
AA+GA	47 (20.4)	128 (48.2)			
AA	↓ (0.4)	29 (11.0)	<0.001	23.89	0.04 [0-0.25]
GG+GA	230 (99.6)	237 (89.0)			
Alleles					
G	414 (89.6)	375 (70.5)	<0.001	55.23	3.61 [2.5-5.22]
A	48 (10.4)	157 (29.5)			

* CIN, Cervical Intraepithelial Neoplasia □

Table III. *BCL2* (-938C>A) and *BAX* (-248G>A) polymorphisms and risk of cervical intraepithelial neoplasia

HPV (n=246)										
	LSIL* n=101(%)	Control n=266 (%)	<i>p</i>	χ^2	OR	HSIL** n=130(%)	Control n=266 (%)	<i>p</i>	χ^2	OR
<i>BCL2</i> (-938 C>A)										
CC	27 (26.7)	73 (27.4)	0.88	0.02	1	40 (30.8)	73 (27.4)	0.27	1.22	1
CA	48 (47.5)	126 (47.4)			1.03	64 (49.2)	126 (47.4)			0.93
AA	26 (25.8)	67 (25.2)			1.05	26 (20.0)	67 (25.2)			0.71
CC	27 (26.7)	73 (27.4)	0.89	0.02	0.96 [0.56-1.67]	40 (30.8)	73 (27.4)	0.49	0.47	1.18 [0.72-1.91]
CA+AA	74 (73.3)	193 (72.6)				90 (69.2)	193 (72.6)			
AA	26 (25.8)	67 (25.2)	0.91	0.01	1.03 [0.59-1.8]	26 (20.0)	67 (25.2)	0.25	1.31	0.74 [0.43-1.27]
CC+CA	75 (74.2)	199 (74.8)				104 (80.0)	199 (74.8)			
Alleles										
C	102 (50.5)	272 (51.1)	0.87	0.02	0.98 [0.7-1.37]	144 (55.4)	272 (51.1)	0.26	1.27	1.19 [0.87-1.62]
A	100 (49.5)	260 (48.9)				116 (44.6)	260 (48.9)			
<i>BAX</i> (-248G>A)										
GG	83 (82.2)	138 (51.8)	<0.001	28.58	1	101 (77.7)	138 (51.8)	<0.001	29.68	1
GA	17 (16.8)	99 (37.2)			0.29	29 (22.3)	99 (37.2)			0.4
AA	1 (1.0)	29 (11.0)			0.06	0 (0)	29 (11.0)			0.0
GG	83 (82.2)	138 (51.8)	<0.001	28.05	4.28 [2.36-7.83]	101 (77.7)	138 (51.8)	<0.001	24.32	3.23 [1.95-5.36]
GA+AA	18 (17.8)	128 (48.2)				29 (22.3)	128 (48.2)			
AA	1 (1.0)	29 (11.0)	0.002	9.58	0.08 [0-0.57]	0 (0)	29 (11.0)			
GG+GA	100 (99.0)	237 (89)				130 (100)	237 (89)			
Alleles										
G	183 (90.6)	375 (70.5)	<0.001	32.47	4.03 [2.37-6.93]	231 (88.8)	375 (70.5)	<0.001	32.75	3.33 [2.13-5.24]
A	19 (9.4)	157 (29.5)				29 (11.2)	157 (29.5)			

*LSIL, Low Squamous Intraepithelial Lesions;
**HSIL, High Squamous Intraepithelial Lesions.

Table IV. *BCL2* (-938C>A) and *BAX* (-248G>A) genotypes and allele distribution in HIV-negative and -positive patients with cervical intraepithelial neoplasia

Genotypes	CIN*/HIV- n=182 (%)	Control N=266 (%)	<i>p</i>	χ^2	OR	CIN*/HIV+ n=49 (%)	Control n=266 (%)	<i>p</i>	χ^2	OR
<i>BCL2</i> (-938 C>A)										
CC	52 (28.2)	73 (27.4)	0.7	0.15	1	15 (30.6)	73 (27.4)	0.37	0.79	1
CA	87 (47.8)	126 (47.4)			0.97	25	126 (47.4)			0.97
AA	43 (23.6)	67 (25.2)			0.90	9	67 (25.2)			0.65
CC	52 (28.6)	73 (27.4)	0.79	0.07	1.06 [0.68-1.64]	15 (30.6)	73 (27.4)	0.65	0.21	1
CA+AA	130 (71.4)	193 (72.6)				34 (69.4)	193 (72.6)			1.17 [0.6-2.27]
AA	43 (23.6)	67 (25.2)	0.7	0.14	0.91 [0.58-1.46]	9 (18.4)	67 (25.2)	0.29	1.05	1
CC+CA	139 (76.4)	199 (74.8)				40 (81.6)	199 (74.8)			1.5 [0.69-3.25]
Alleles										
C	191 (52.5)	272 (51.1)	0.69	0.16	1.06 [0.8-1.39]	54 (55.1)	272 (51.1)	0.47	0.52	1.17 [0.74-1.85]
A	173 (47.5)	260 (48.9)				44 (44.9)	260 (48.9)			
<i>BAX</i> (-248G>A)										
GG	149 (81.9)	138 (51.8)	<0.001	46.36	1	35 (71.5)	138 (51.8)	0.003	8.85	1
GA	32 (17.6)	99 (37.2)			0.3	14 (28.5)	99 (37.2)			0.56
AA	1 (0.5)	29 (11.0)			0.03	0	29 (11.0)			0
GG	149 (81.9)	138 (51.8)	<0.001	42.21	4.19 [2.62-6.72]	35 (71.5)	138 (51.8)	<0.001	6.39	1
GA+AA	33 (18.1)	128 (48.2)				14 (28.5)	128 (48.1)			2.32 [1.19-4.51]
AA	1 (0.5)	29 (11.0)	<0.001	18.54	0.05 [0-0.31]	0	29 (11.0)	<0.001	5.88	1
GG+GA	181 (99.5)	237 (89)				49 (100)	237 (89.1)			-
Alleles										
G	330 (90.6)	375 (70.5)	<0.001	52.42	4.06 [2.68-6.18]	84 (85.7)	375 (70.5)	0.002	9.7	2.51 [1.34-4.78]
A	34 (9.4)	157 (29.5)				14 (14.3)	157 (29.5)			

* CIN, Cervical Intraepithelial Neoplasia

Table V Stratified analysis of the association between *BCL2* polymorphisms and cervical epithelial neoplasia risk by *BAX* genotypes

	Cases	Control	χ^2	<i>p</i>	OR	Cases	Control	χ^2	<i>p</i>	OR
<i>BCL2</i> (-938 C>A)										
CC	49 (26.6)	35 (25.4)	0.84	36	1	17 (37.0)	26 (26.3)	0.96	0.33	1
CA	93 (50.5)	63 (45.6)			1.05	20 (43.5)	52 (52.5)			1.59
AA	42 (22.8)	40 (29.0)			0.75	9 (19.5)	21 (21.2)			0.66
CC	49 (26.6)	35 (25.4)	0.07	0.8	1.07 (0.63-1.82)	17 (37.0)	26 (26.3)	2.77	0.096	1.87 (0.83-4.20)
AA+CA	135 (73.4)	103 (74.6)				29 (63.0)	83 (73.7)			
AA	42 (22.8)	40 (29)	1.58	0.21	0.72 (0.42-1.24)	9 (19.5)	21 (21.2)	0.05	0.82	0.9 (0.34-2.33)
CC+CA	142 (77.2)	98 (71)				37 (80.5)	78 (78.8)			

3. Expressão de RNAm de genes associados a citotoxicidade e apoptose

Neste estudo, visamos avaliar a expressão transcricional dos genes perforina, fas, *BAX*, *BCL-2*, p53 e pRb através da quantificação de mRNA em lesões cervicais de mulheres infectadas pelo HPV.

Casuística

Para avaliação da expressão gênica dos genes selecionados, foram incluídas lesões cervicais de 66 mulheres HIV negativas, classificadas em NIC I (n=13), NIC II (n=17), NIC III (n=19) e câncer cervical (CC; n=17), e como grupo controle (n=19), selecionamos fragmentos de colo uterino sem lesão associada ao HPV de mulheres histerectomizadas.

A tabela 2 apresenta dados comportamentais das mulheres que apresentaram NIC, e que foram previamente incluídas em nosso estudo sobre polimorfismo (artigo 2). Não tivemos disponibilidade dos dados comportamentais dos casos de câncer e controles.

No grupo de mulheres que apresentaram NIC, a idade variou de 19 a 78 anos ($38 \pm 11,9$), sendo $40,4 \pm 15,7$; $36,2 \pm 12,8$ e $38 \pm 8,4$ anos, respectivamente, para as mulheres que apresentaram NIC I, NIC II e NIC III, não apresentando diferenças estatísticas entre elas. A sexarca entre estes grupos variou de $16,8 \pm 3,5$; $16,9 \pm 4,5$ e $18,1 \pm 4,0$, não havendo diferença estatística.

Tabela 2. Dados comportamentais em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical

	Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)			
	Todas	NIC I	NIC II	NIC III
<i>Idade</i>				
(Média ± DP*)	38 ± 11,9	40,4 ± 15,7	36,2 ± 12,8	38 ± 8,4
<i>Etnia – n (%)</i>				
Branças	20 (40,8)	6 (46,1)	6 (35,3)	8 (42,1)
Pardas	15 (30,6)	5 (38,5)	4 (23,5)	6 (31,6)
Negras	10 (20,4)	1 (7,7)	4 (23,5)	5 (26,3)
Desconhecida	4 (8,2)	1 (7,7)	3 (17,7)	-
<i>Fumo – n (%)</i>				
Sim	26 (53,1)	7 (53,8)	7 (41,2)	12 (63,2)
Não	19 (38,8)	5 (38,5)	7 (41,2)	7 (38,8)
Desconhecido	4 (8,1)	1 (7,7)	3 (17,6)	-
<i>Etilismo – n (%)</i>				
Sim	33 (67,3)	6 (46,2)	13 (76,5)	14 (73,7)
Não	12 (24,5)	6 (46,2)	1 (5,9)	5 (26,3)
Desconhecido	4 (8,2)	1 (7,6)	3 (17,6)	-
<i>Sexarca</i>				
(Média ± DP)	17,0 ± 4,0	16,8 ± 13,5	16,9 ± 4,5	18,1 ± 4,0
<i>Menarca</i>				
(Média ± DP)	13,0 ± 1,6	12,6 ± 1,9	11,7 ± 1,5	13,2 ± 1,1
<i>Gestações</i>				
(Média ± DP)	3,0 ± 2,0	3,6 ± 2,6	2,8 ± 1,8	2,1 ± 1,5

*Média ± desvio padrão;

Expressão de RNAm para genes relacionados as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16

Analizamos a expressão gênica de E6 e E7 do HPV 16 através da quantificação de RNAm do vírus nas lesões dos casos e controles. Os resultados foram normalizados sobre o valor da proteína constitutiva, gliceraldeído fosfato desidrogenase (GADPH). Desta forma, os valores da expressão de cada gene é o percentual acima ou abaixo dos valores expressos de GAPDH em cada amostra.

Não foi identificada expressão genica na maioria das voluntarias do grupo controle, com ausência de lesão cervical. Das 19 mulheres, somente 2 (10,52%) apresentaram baixa expressão de RNA-m para uma das duas oncoproteínas virais, respectivamente 3,70 e 3,34% para E6 e E7. Quando analisamos as pacientes com NIC I, observamos que somente duas das 13 (15,4%) não apresentaram expressão para nenhuma das duas oncoproteínas. Uma (7,7%) paciente deste grupo não apresentou expressão para E6, mas sim para E7 (161,78%). Da mesma forma, duas (15,4%) pacientes apresentaram expressão para E6, mas não para E7. De modo geral, temos 11 das 13 (84,6%) apresentando uma ou outra oncoproteína (E6, $78,21 \pm 73,96$ erro padrão; E7, $31,27 \pm 14,1$).

No grupo NIC II, todas as pacientes expressaram E6 com valores variando de 22,1% a 3394% ($583,14 \pm 214,14\%$), mas apenas uma (5,8%) não apresentou E7. A expressão de E7 variou de 0,34% a 431,58% ($78,71 \pm 28,89\%$ - Figura 5). De modo interessante a expressão de E6 foi 18 vezes maior que a expressão de E7. Não foi observada diferença estatística entre os grupos NIC I e II em relação a expressão de E6 e E7.

No grupo NIC III todas as pacientes expressaram E6 variando de 7,26% a 2790% ($561,48 \pm 219,26$). Em relação a E7, uma (5,3%) paciente não expressou esta proteína, variando de 0,66 a 773,33% ($80,46 \pm 40,75\%$). Não houve diferença entre os grupos NIC II e NIC III quanto a expressão de E6 e E7, sendo estes precursores de câncer. Contudo, E6 parece estar mais expresso em NIC III que em NIC I ($p=0,05$).

No grupo de câncer, todas as pacientes expressaram E6 com valores variando 4,76 a 3560% ($350,45 \pm 204,53\%$). Ao analisar E7, apenas uma (5,8%) não apresentou expressão desta oncoproteína, que variou de 0,79 a 415,69% ($166,63 \pm 50,20\%$). E7 esta 5,3 vezes mais expresso em pacientes com câncer do que aquelas com NIC I ($p= 0,017$).

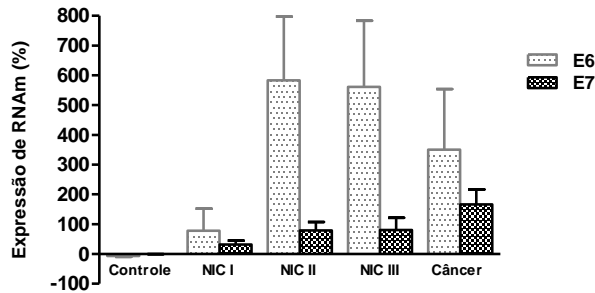


Figura 6. Expressão de RNAm das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle. Percentual em relação a expressão do gene constitutivo GADPH

Expressão de RNAm de genes associados a citotoxicidade – Fas e Perforina

A proteína Fas é um receptor de morte celular, pertencente à família de receptores de TNF, e é expresso em vários tecidos normais e neoplásicos. Neste sentido investigamos a expressão de RNAm e foi somente possível observar diferença estatística entre os grupos NIC III e câncer ($p= 0,048$). A tabela 2 e a figura 6 apresentam os valores de expressão deste gene.

Ao associarmos a expressão de Fas com as das oncoproteínas E6 e E7 do HPV, identificamos uma forte correlação positiva em NIC III ($r=0,64$ e $0,72$, respectivamente). Nos casos de câncer cervical observamos correlação positiva apenas entre Fas e E6 ($r=0,67$). Nos demais grupos não houve correlação na expressão gênica em questão.

Ao analisarmos a expressão de RNAm do gene *Perforina*, observamos um aumento deste de acordo com o agravamento das lesões - controle ($3,67 \pm 0,59$), NIC I ($34,05 \pm 14,47$), NIC II ($72,08 \pm 34,80$), NIC III ($63,92 \pm 23,61$) e

câncer (109,11 ± 89,88) (tabela 2 e a figura 4). Contudo, a avaliação estatística não evidenciou diferenças entre os grupos, exceto entre os grupos NIC III e controle (p = 0,021). Entre as pacientes com câncer, uma apresentou níveis elevados de perforina (1513%). Mesmo excluindo este valor não observamos diferenças estatísticas entre os grupos.

Encontramos forte correlação positiva entre as expressões de RNAm de perforina e E6 do HPV16 em mulheres com NIC I (r=0,97), NIC II (r=0,96), NIC III (r=0,94) e CC (0,99). Da mesma forma, observamos forte correlação positiva entre as expressões de RNAm de perforina e E7 do HPV16 em mulheres com NIC II (r=0,89), NIC III (r=0,85) e CC (r=0,71).

Tabela 3. Expressão gênica dos genes relacionados ao ciclo celular e citotoxicidade

	NIC I	NIC II	NIC III	Câncer	Controle
Fas	24,3 ± 7,8*	38,9 ± 6,0	36,9 ± 4	24,6 ± 4,4	29,5 ± 3,9
Perforina	34,1 ± 14,5	75,8 ± 40,9	63,9 ± 84,5	109,1 ± 0,6	3,7 ± 35,7
p53	23,6 ± 6,5	16,8 ± 4,2	18,4 ± 4,2	11,7 ± 2,8	8,0 ± 1,9
pRb	13,3 ± 3,7	23,5 ± 6,0	24,4 ± 4,7	18,6 ± 4,8	9,6 ± 0,8
BAX	49,2 ± 15,6	107,9 ± 29,9	138,6 ± 43,2	77,2 ± 48,4	5,9 ± 1,9
BCL2	27,6 ± 7,7	54,1 ± 8,1	54,4 ± 5,6	25,4 ± 6,8	42,6 ± 4,0

* media e desvio padrão em relação a expressão do gene constitutivo GADPH

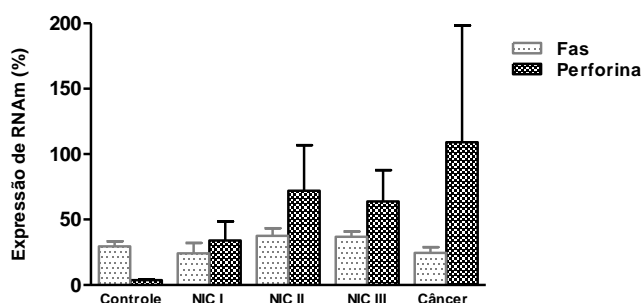


Figura 7. Expressão de RNAm de Fas e Perforina em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle. Percentual em relação a expressão do gene constitutivo GADPH.

Expressão de RNAm de proteínas controladoras do ciclo celular

p53 e pRb

Ao avaliarmos a expressão genica de p53, observamos diferença estatística entre todos os grupos de pacientes com lesões cervicais associadas a infecção pelo HPV e o grupo controle (NIC I, $p=0,049$; NIC II, $0,002$; NIC III, $p= 0,021$), contudo uma leve diminuição da expressão de p53 em pacientes com câncer e não houve diferenças estatísticas em relação aos controles ($p= 0,07$) e os grupos com lesões (Tabela 2 e Figura 7).

A expressão de pRb estava elevada principalmente nos grupos de pacientes com lesões NIC II ($p = 0,038$) e III ($p= 0,006$) em relação aos controles. Pacientes com câncer ($18,63 \pm 4,8$) apresentaram uma leve diminuição da expressão de pRb em relação ao grupo NIC III ($24,36 \pm 4,63$), mas acima dos níveis apresentados pelo grupo controle ($9,63\pm 0,84$; $p=0,081$), como apresentado na figura 5 e tabela 2.

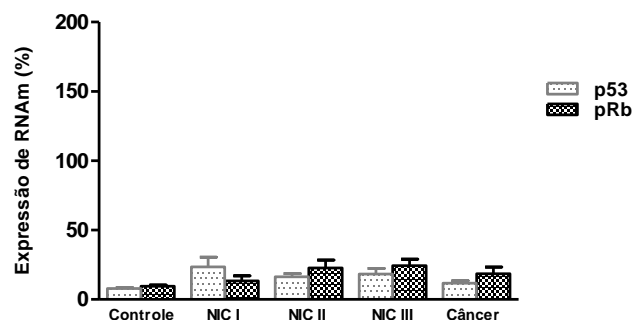


Figura 8. Porcentagem de expressão de RNAm de pRb e p53 em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle. Percentual em relação a expressão do gene constitutivo GAPDH.

BAX e BCL2

Ao analisarmos a expressão gênica de *BCL2*, observamos um aumento significativo desta em NIC II quando comparado com NIC I ($p=0,038$). No entanto, encontramos baixa expressão significativa de Bcl2 em mulheres com câncer quando comparadas àquelas que apresentaram NIC II ($p=0,017$), NIC III ($p=0,002$) e as controles ($p=0,039$). (Tabela 2 e Figura 8).

Em relação a expressão de *BAX*, observamos diferença estatística entre todos os grupos de pacientes com lesões cervicais associadas a infecção pelo HPV e o grupo controle (NIC I, $p=0,017$; NIC II, $p=0,004$; NIC III, $p=0,007$), conforme demonstrado na Figura 6 e tabela 2.

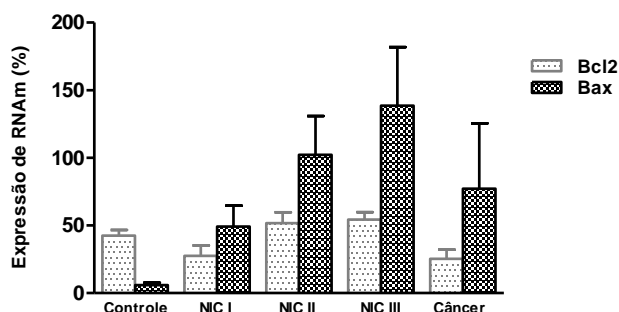


Figura 9. Porcentagem de expressão de RNAm de BAX e BCL2 em lesões cervicais classificadas como NIC I, II, III e cancer cervical, bem como de mulheres sem lesões cervicais, denominadas de controle. Percentual em relação a expressão do gene constitutivo GADPH.

Associação dos polimorfismos dos genes controladores do ciclo celular *BAX* e *BCL2* e sua expressão na cérvix uterina

No intuito de associarmos a frequência de polimorfismos para *BAX* - 248G/A e *BCL2* -938C/A com a expressão de RNAm na cérvix uterina de mulheres portadoras de lesões NIC I ($n=13$), II ($n=17$) e III ($n=19$) sugestivas da infecção do HPV, os dados referentes a 45 pacientes foram cruzados.

Das 45 pacientes onde ambas análises estavam disponíveis, foi possível identificar que portadores do genótipo *BAX* -248G>G expressaram RNAm para *BAX* em níveis máximos de 445,26% e mínimos de 3,78% (média $71,50 \pm 17,32EP$), enquanto as portadoras do genótipo *BAX*-248G>A apresentaram valores máximos de 590% e mínimos de 15,92 (média $209,3 \pm 64,6EP$). Não foi possível fazermos associação com as portadoras do genótipo de *BAX* -

248AA neste estudo. De modo geral as portadoras do genótipo GA parecem ter níveis mais elevados de RNAm para BAX, com uma associação próxima a significância quando os dois genótipos foram comparados ($p= 0,063$). Quando agora as portadoras do genótipo de *BCL2* -938CC foram comparadas as portadoras de CA e AA, observamos níveis de BCL2 médios de $45,16\pm 6,45\%$ EP; $39,38\pm 6,41\%$ EP e $56,59\pm 1,37\%$ EP, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre os grupos, indicando que não há associação entre a presença dos SNPs e a expressão de RNAm para BCL2.

DISCUSSÃO

O processo da carcinogênese cervical é complexo e envolve fatores imunológicos, genéticos e comportamentais das mulheres; bem como o tipo de HPV. A indução de citotoxicidade é um mecanismo central de defesa contra infecções virais, com a distribuição de células citotóxicas diretamente associadas às lesões cervicais relacionadas à infecção do HPV (Scholten et al., 2005). Em nosso trabalho, avaliamos a presença de células inflamatórias e seu papel citotóxico através da expressão de BAX, BCL-2, perforina e FasL na cérvix uterina de mulheres infectadas pelo HPV, co-infectadas ou não pelo HIV.

Em trabalho prévio (Nicol et al., 2005), verificamos a presença aumentada de células T CD4⁺ em mulheres infectadas pelo HPV quando comparadas às mulheres infectadas pelo HIV, indicando uma possível correlação com a contagem de células periféricas, refletida por sua migração para a cérvix. Avaliamos o papel citotóxico dessas células através da expressão de FasL. No entanto, esse marcador foi observado raramente na infecção pelo HPV, independente de co-infecção pelo HIV tanto em linfócitos cervicais quanto em queratinócitos. Essa diminuição pode estar relacionada com a inibição da molécula de Fas em queratinócitos infectados pelo HPV (Shim et al, 2006). Kabsch e Alonso (2002) demonstram que a oncoproteína E5 do HPV 16 inibe a formação do complexo sinalizador de morte em queratinócitos, através da expressão diminuída de Fas. Da mesma forma, Mikaelssdottir e colaboradores (2003) reportaram expressão diminuída de Fas em carcinomas adenoescamosos.

Ao avaliarmos a presença de macrófagos, não observamos diferença na presença dessas células em lesões cervicais em mulheres infectadas pelo HPV, comparadas aquelas co-infectadas pelo HIV, mesmo sendo reportada como a primeira linha de defesa contra o HPV (Tay et al, 1987). Estas células têm papel fundamental na atividade microbicida pela liberação de radicais intermediários de oxigênio, desta forma, verificamos a expressão de NOS2 na cervix uterina. Notadamente, encontramos forte expressão em queratinócitos da camada basal do epitélio, independente da co-infecção, sugerindo que HIV-1 não tenha influência na expressão de NOS2 na infecção pelo HPV na cérvix uterina.

Em relação às células T CD8⁺, confirmando trabalho anterior (Nicol et al., 2005) documentamos importante presença destas células na cérvix uterina em mulheres co-infectadas pelo HPV/HIV. Células T citotóxicas (CTLs) são essenciais no controle imune de infecções virais. Após o reconhecimento antigênico por moléculas de MHC-I, a citotoxicidade mediada por essas células é mediada pela liberação de enzimas, entre elas, a perforina (Kagi et al., 1994; Barry and Bleackley, 2002). Durante o processo de degranulação, há aumento da expressão da proteína associada à membrana do lisossomo, LAMP-1 e LAMP-2 (CD107a e b) (Peters et al., 2001). Em nosso estudo, observamos rara expressão de perforina em lesões cervicais associadas à infecção pelo HPV. No entanto, ao avaliarmos a exocitose destes grânulos, identificamos baixa, mas não rara, expressão de CD107a em células inflamatórias de ambos os grupos estudados, sugerindo que o HPV possa evitar a indução da imunidade celular efetiva. Uma das possíveis explicações seria que o HPV possa bloquear a expressão de TAP-1, proteína transportadora presente no Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) responsável pela transição de peptídeos virais do citoplasma para o interior do RER e sua posterior ligação a MHC-I, dificultando o reconhecimento por células T CD8⁺ (Tao et al., 2007).

A apoptose possui um papel importante no controle celular e o bloqueio dessa via, tem sido associada ao aparecimento de câncer. A família BCL2 é importante no controle do ciclo celular e é composta por proteínas pro-apotóticas (BAX) e anti-apotóticas (BCL2). Em nosso estudo avaliamos a presença de marcadores de morte celular como BAX e BCL2, e observamos similar expressão de ambas as proteínas em mulheres infectadas pelo HPV, independente da co-infecção com o HIV. Spinillo e colaboradores (2004) correlacionaram a expressão aumentada de BCL2 com a gravidade de NIC. Estudos demonstram que a proteína de Tat do HIV-1 é capaz de modular a produção de BCL2 em linhagem celular de sarcoma de Kaposi (Ariumi et al., 2001). Zheng e colaboradores (2007) demonstraram que esta proteína do HIV aumentaria a expressão de BCL2 em monócitos. Da mesma forma, Fernández-Larrosa e colaboradores (2008) analisaram a expressão of BCL2 e BAX em linhagens celulares de monocitos infectadas ou não pelo HIV, e observaram alta expressão de BCL2 e uma reduzida expressão de BAX em mitocôndrias de

células infectadas pelo HPV, reduzindo dessa forma a apoptose nessas células.

É bem descrito que os efeitos neoplásicos e a carcinogênese são influenciados pelo perfil genético do indivíduo. Em nosso segundo estudo, avaliamos os efeitos do polimorfismo em *BAX* (-248G>A) e *BCL2* (-938C>A) nas lesões cervicais induzidas pelo HPV. Em relação ao polimorfismo de *BCL2* não observamos associação com o desenvolvimento de NIC. Não há estudos na literatura que correlacione esse polimorfismo com a presença de lesões cervicais. No entanto, há relatos com outros tipos de câncer e sua relação é contraditória. Alguns estudos identificaram a associação do polimorfismo de *BCL2* (-938C/A) com o risco de câncer de cabeça e pescoço (Kuhlmann et al, 2002; Chen et al, 2007). Além disso, o genótipo *BCL2* -938AA pode estar associado com o aumento de expressão de *BCL2* e pode ser usado como marcador genético em indivíduos com leucemia linfocítica crônica (LLC- Nuckel et al 2007). No entanto, Hirata e cols. (2009) reportaram que indivíduos carreadores do genótipo *BCL2* -938CC demonstraram maior recorrência em câncer de próstata quando comparados com aqueles que eram CA e AA. Contudo, mais estudos devem ser realizados para identificar a correlação entre a expressão de *BCL2* na cérvix e sua associação com o respectivo polimorfismo, independente da infecção pelo HIV.., Estudos relatam a associação do genótipo -248AA com a baixa expressão de *BAX* e a resistência ao tratamento de LCC (Saxena et al 2002, Starczynski et al. 2005, Fegan et al, 2006). Contudo, este fato é controverso. Skogsberg e colaboradores (2005) não observaram associação com a sobrevivência entre pacientes com LCC com o polimorfismo -248G>A.

Apesar do genótipo GG, mais encontrado em nosso estudo, estar correlacionado com a alta produção da proteína apoptótica *BAX* (Fegan et al, 2006), tem sido relatado que o HPV desempenha um papel anti-apoptótico na inibição da atividade pos transcricional do gene *BAX*, estimulado pela degradação de p53 (Vogt et al 2006, Li et al, 2011).

Ao avaliar a expressão de RNAm destas proteínas, encontramos uma expressão aumentada significativamente de *BCL2* em grupos que apresentaram NIC II quando comparada ao grupo de NIC I. No entanto, sua expressão foi diminuída em mulheres com câncer cervical. Já em relação a *BAX*, que é uma proteína apoptótica encontramos um aumento significativo em

todos os grupos de pacientes com lesões cervicais associadas a infecção pelo HPV e o grupo controle (NIC I, $p=0,017$; NIC II, $0,004$; NIC III, $p= 0,007$). Este é o primeiro relato da expressão de RNAm *in vitro* de BAX e BCL2 na cervix uterina e sua relação com NIC. É descrito que a proteína E6 do HPV16 é capaz de reduzir a expressão do RNAm de BAX e sua estabilidade em queratinócitos humanos. Estudos feitos com a linhagem celular 293T cells (Shnitman et al, 2005) reforçam esta afirmação, onde esta oncoproteína estaria envolvida na redução da morte celular por BAX. Além disso, ele possui papel inibitório na expressão pos transcricional no BAX, o qual é causado pelo estímulo da degradação de p53 (Oh et al 2006; Vogt et al 2006).

Ainda temos muitas questões a serem respondidas, pois se trata de um assunto que é pouco debatido na literatura. Desta forma, outros trabalhos devem ser realizados para distinguir os mecanismos pelo qual a citotoxicidade celular ocorre durante a infecção pelo HPV, associado ou não à co-infecção pelo HIV, além do papel apoptótico de BAX nestas infecções. Além disso, ter informações que possam ser transferidas para experimentos em células infectadas pelo HPV e assim colaborar passo a passo para o desenvolvimento um novo produto para o tratamento de lesões precursoras do câncer, reduzindo assim o número de casos de câncer cervical.

CONCLUSÕES

1. Infiltrado inflamatório semelhante nas pacientes HPV e HPV/HIV.
2. Co-localização de células que expressavam NOS2 na região basal do epitélio, com morfologia de queratinócitos, independente da co-infecção pelo HIV-1;
3. Apoptose induzida por FasL parece não ter papel no controle da lesão causada pelo HPV, independente da co-infecção pelo HIV;
4. A secreção de grânulos de perforina pode estar sendo inibida pela infecção pelo HPV, independente da co-infecção pelo HIV.
5. O polimorfismo de *BCL2* (-938C>A) não está associado ao aparecimento de lesões cervicais.
6. Uma forte associação foi identificada entre o genótipo GG de *BAX* (-248G>A) e o aparecimento de lesões cervicais, mas não a progressão das lesões.

PERSPECTIVAS

1. Caracterizar marcadores de controle celular (p53, pRb, BAX e BCL2),
2. Determinar polimorfismos nos genes relacionados a apoptose como TNF- α (-238G/A e -308G/A e seu receptor TNFR1 (+36 A/C e -383A/C) que possam estar relacionados a presença e gravidade das lesões cervicais.
3. Determinar *in vitro* o papel modulador do TNF- α na indução da apoptose em células de linhagem de carcinoma cervical infectadas pelo HPV.
4. Determinar *in vitro* o papel sinérgico do fitoterápico *cryptotanshinone* e/ou TNF- α e/ou IFN- γ na indução de apoptose em células de linhagem de carcinoma cervical infectadas pelo HPV, para uso posterior no controle da carcinogênese cervical.

REFERÊNCIAS

- Abba MC, Villaverde LM, Gomez MA, Dulout FN, Laguens MR, Golijow CD. The p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. *Reproductive Biology*. 2003; 109: 63–66.
- Aguilar-Lemarroy A, Kirchhoff S, Whitaker N, Gariglio P, zur Hausen H, Krammer PH, Rösl F. Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer* 2001; 93: 823–831.
- Alves DB, Tozetti IA, Gatto FA, Cassandri F, Ferreira AM, Carlos Eurico Dos Santos F, Falcão GR, Scapulatempo ID, Padovani CT, Abdo MA. CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected with human papillomavirus. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43: 425-429.
- Ariumi Y, Kaida A, Hatanaka M, Shimotohno K. Functional cross-talk of HIV-1 Tat with p53 through its C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287, 556-561.
- Aubin F, Humbey O, Guerrini JS, Mouglin C, Laurent R. Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130: 1131-1138.
- Ayres AR, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2010; Oct;44(5):963-74.
- Barry, M., Bleackley, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol*. 2002; 2, 401–409.
- Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol* 2004; 14: 95-105.
- Bollen LJ, Chuachoowong R, Kilmarx PH, Mock PA, Culnane M, et al. Human papillomavirus (HPV) detection among human immunodeficiency virusinfected pregnant Thai women: implications for future HPV immunization. *Sex Transm Dis*. 2006; 33: 259–264.

Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010; 15;202(12):1789-99.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(9):671–682.

Casolati E, Agarossi A, Valieri M, Ferrazzi E. Vulvar neoplasia in HIV positive women: a review. *Med Wieku Rozwoj* 2003; 7: 487-493.

Chen,K., Hu,Z., Wang,L.E., Sturgis,E.M., El-Naggar,A.K., Zhang,W., Wei,Q. [Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck.](#) *Carcinogenesis*, 2007; 28, 2008-2012.

Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene.* 2005; 24(17):2796–2809.

Comar M, Molin GD, Guaschino S, Campello C. p53 at codon 72 polymorphism, human papillomavirus infection and, cervical lesions: a cross-sectional study from northeastern Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 114: 210–214.

de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(7):453-459.

Del Mistro A, Bertorelle R, Franzetti M, Cattelan A, Torrisi A, Giordani MT, Sposetti R, Bonoldi E, Sasset L, Bonaldi L, Minucci D, Chieco-Bianchi L. Antiretroviral therapy and the clinical evolution of human papillomavirus-associated genital lesions in HIV-positive women. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 737-742.

Doherty PT, Christensen JP. Accessing complexity: the dynamics of virus-specific T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 561-592.

Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007; Jul 15;75(2):247-60.

Einstein MH, Kadish AS. Anogenital neoplasia in AIDS. *Curr Opin Oncol*. 2004; Sep;16(5):455-62.

Fegan,C., Starczynski,J., Pratt,G., Pepper,C. The role of the bax gene polymorphism G (-248)A in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2006; 20, 1460–1461.

Fernández-Larrosa, P.N., Croci, D.O., Riva, D.A., Bibini, M., Luzzi, R., Saracco, M., Mersich, S.E., Rabinovich, G.A., Peralta, L.M. Apoptosis resistance in HIV-1 persistently-infected cells is independent of active viral replication and involves modulation of the apoptotic mitochondrial pathway. *Retrovirology*. 2008; 5, 19-30.

Ferreira da Silva I, Koifman RJ, Quinto Santos Souza C, Ferreira de Almeida Neto O, Koifman S. TP53 genetic polymorphisms and environmental risk factors associated with cervical carcinogenesis in a cohort of Brazilian women with cervical lesions. *J Toxicol Environ Health A*. 2010; 73(13-14):888-900.

Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 21730–21739.

Fonseca-Moutinho E, Cruz L, Carvalho HJM, Prazeres MMP, Delacerda DP, Da Silva F, Mota CF, De Oliveira A. Estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 are markers with prognostic significance in CIN III. *Gynecol Cancer*. 2004; 14: 911—920.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23: 1121-1131.

Gage JR, Sandhu AK, Nihira M, Bonecini-Almeida M da G, Cristoforoni P, Kishimoto T, Montz FJ, Martinez-Maza O. Effects of human papillomavirus-associated cells on human immunodeficiency virus gene expression. *Obstet Gynecol*. 2000; 96: 879-885.

Ghafourifar P, Parihar MS, Nazarewicz R, Zenebe WJ, Parihar A. Detection assays for determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity; advantages and limitations. *Methods Enzymol.* 2008;440:317-34.

Gomes TS, Oshima CT, Segreto HR, Barraqueta LM, Costa HO, Lima FO, Forones NM, Ribeiro DA. The extrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas assessed by tissue microarray. *Pathol Res Pract.* 2011; Aug 17.

Guo J, Meng H, Pei J, Zhu M. Association between the TNF- α -238G>A and TGF- β 1 L10P Polymorphisms and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Breast Care (Basel).* 2011;6(2):126-129.

Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, Clark RA. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci.* 2004; 328: 57-63.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit.* 2001; Jul-Aug;7(4):801-19.

Harris TG, Burk RD, Palefsky JM, Massad LS, Bang JY, Anastos K, Minkoff H, Hall CB, Bacon MC, Levine AM, Watts DH, Silverberg MJ, Xue X, Melnick SL, Strickler. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and human papillomavirus test results. *JAMA* 2005; 293: 1471-1476.

Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiffenbauer YS, Berke G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology.* 2011; Jun;133(2):190-6.

Heard I. Ano-genital lesions due to human papillomavirus infection in women. *Med Mal Infect.* 2005; May;35(5):302-5.

Hirata, H., Hinoda, Y., Kikuno, N., Suehiro, Y., Shahryari, V., Ahmad, A.E., Tabatabai, Z.L., Igawa, M., Dahiya, R. Bcl2 -938C>A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Urol,* 2009; 181,1907-1912.

Hoves S, Sutton VR, Haynes NM, Hawkins ED, Fernández Ruiz D, Baschuk N, Sedelies KA, Schnurr M, Stagg J, Andrews DM, Villadangos JA, Trapani JA. A Critical Role for Granzymes in Antigen Cross-Presentation through Regulating Phagocytosis of Killed Tumor Cells. *J Immunol.* 2011; Jun 27.

Ishiji T. Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol.* 2000; Feb;27(2):73-86.

Jenkins MR, Griffiths GM. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr Opin Immunol.* 2010; Jun;22(3):308-13.

Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Goldstein P. Fas and perforin pathways a major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994; 265: 314-317.

Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Goldstein P. Fas and perforin pathways a major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994; 265: 314-317.

Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1272-1278.

Kuhlmann,T., Glas,M., zum Bruch,C., Mueller,W., Weber,A., Zipp,F., Brück,W. Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002; 129, 154-60.

Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 10):1661–1670.

Li,J.H., Xiao,X., Zhang,Y.N., Wang,Y.M., Feng,L.M., Wu,YM., Zhang,Y.X. MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 2011; 120,145-51. Epub 2010 Oct 4.

Liu ZZ, Cui S, Billiar TR, Dorko K, Halfter W, Geller DA, Michalopoulos G, Beger HG, Albina J, Nussler AK. Effects of hepatocellular mitogens on cytokine-induced nitric oxide synthesis in human hepatocytes. *J Leukoc Biol.* 1996; 60: 382-388.

Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer.* 2011; May 1;128(9):1999-2009.

Lopes CO, Callera F. Three-Dimensional Conformal Radiotherapy in Prostate Cancer Patients: Rise in Interleukin 6 (IL-6) but not IL-2, IL-4, IL-5, Tumor Necrosis Factor- α , MIP-1- α , and LIF Levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Jun 1.

Lopez-Figueroa MO, Caamano C, Morano MI, Ronn LC, Akil H, Watson SJ. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272: 129-133.

Maluf PJ, Michelin MA, Etcherbehere RM, Adad SJ, Murta EFC. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Arch Gynecol Obstet.* 2008; 278:525-530.

Man S, Fiander A. Immunology of human papillomavirus infection in lower genital tract neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001; 15: 701-714.

Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix: II cytologic, colposcopic and histopatologic study. *Acta Cytol.* 1977; 21: 379-390.

Michalak E, Villunger A, Erlacher M, Strasser A. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331: 786-798.

Mikaelsdottir, E.K., Benediktsdottir, K.R., Olafsdottir, K., Arnadottir, T., Ragnarsson, G.B., Olafsson, K., Sigurdsson, K., Kristjansdottir, G.S., Imsland, A.K., Ogmundsdottir, H.M., Rafnar, T. HPV subtypes and immunological parameters of cervical cancer in Iceland during two time periods, 1958-1960 and 1995-1996. *Gynecol. Oncol.* 2003; 89, 22-30.

Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini J, Capilina M, Félix S, et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2006; 102:22-31.

Morán JM, Ortiz-Ortiz MA, Ruiz-Mesa LM, Fuentes JM. Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2010; Nov-Dec;24(6):402-9.

Nakagawa M, Kim KH, Moscicki AB. Patterns of CD8 Tcell epitopes within the human papillomavirus type 16 (HPV 16) E6 protein among young women whose HPV 16 infection has become undetectable. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12:1003–1005.

Nguyen M, Breckenridge DG, Ducret A, Shore GC. Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 6731-6740.

Nicol AF, Fernandes ATG, Grinsztejn B, Russomano F, Lapa e Silva JR, Tristão A, Pérez M, Nuovo GJ, Martínez-Maza O, Bonecini-Almeida MG. Distribution of immune cell subsets and cytokine producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV) infected women: Influence of HIV-1 co-infection. *Diag Mol Pathol.* 2005; 14: 39-47.

Nuckel,H., Frey,U.H., Bau,M., Sellmann,L., Stanelle,J., Dürig,J., Jöckel,K.H., Dührsen, U., Siffert,W. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007; 109, 290-297.

O'Connel J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med.* 1996; 184: 1075-1082.

Peng S, Ji H, Trimble C, He L, Tsai YC, Yeatermeyer J, Boyd DA, Hung CF, Wu TC Development of a DNA vaccine targeting human papsillomavirus type 16 oncoprotein E6. *J Virol .* 2004; 78:8468–8476.

Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory

lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 2001; 173, 1099–1109.

Pirzad G, Jafari M, Tavana S, Sadrayee H, Ghavami S, Shajiei A, Ghanei M. The Role of Fas-FasL Signaling Pathway in Induction of Apoptosis in Patients with Sulfur Mustard-Induced Chronic Bronchiolitis. *J Toxicol.* 2011.

Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 2002; 187: 199-205.

Scholten, K.B., Schreurs, M.W., Ruizendaal, J.J., Kueter, E.W., Kramer, D., Veenbergen, S., Meijer, C.J., Hooijberg, E. Preservation and redirection of HPV16E7-specific T cell receptors for immunotherapy of cervical cancer. *Clin. Immunol.* 2005; 114, 119–129.

Seitz DH, Palmer A, Niesler U, Braumüller ST, Bauknecht S, Gebhard F, Knöferl MW. Altered expression of Fas receptor on alveolar macrophages and inflammatory effects of soluble Fas ligand following blunt chest trauma. *Shock.* 2011; Jun;35(6):610-7.

Shah KV, Major EO. Papillomaviruses and polyomaviruses. In: Detrick B, Hamilton RG, Folds JD, eds. *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*. 7th ed. Washington, DC: ASM Press. 2006 : 669-676.

Shnitman Magal S, Jackman A, Ish-Shalom S, Edri Botzer L, Gonen P, Schlegel R, Sherman L. Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 611–621.

Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; Jun;67(6):1211-24.

Skogsberg,S., Tobin,G., Kröber,A., Kienle,D., Thunberg,U., Aleskog,A., Karlsson,K., Laurell,A., Merup,M., Vilpo,J., Sundström,C., Roos,G., Jernberg-Wiklund,H., Döhner,H., Nilsson,K., Stilgenbauer,S., Rosenquist,R. The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate

with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2006; 20, 77–81.

Smith GD, Travis L. *J Am Osteopath Assoc*. Getting to know human papillomavirus (HPV) and the HPV vaccines. 2011; 111(3 Suppl 2):S29-34

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*. 1998; 1: 949-957.

Stanley MA, Scarpini C, Coleman N. Cell mediated immunity and lower genital tract neoplasia. RCOG monograph; 2003.

Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009; Sep;130(3):266-76.

Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009; Sep;130(3):266-76.

Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, Bentley P, Fegan C. Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1514-1521.

Syrjänen S. Human papillomavirus infection and its association with HIV. *Adv Dent Res*. 2011; Apr;23(1):84-9.

Takahashi P, Polson A, Reisman D. Elevated transcription of the p53 gene in early S-phase leads to a rapid DNA-damage response during S-phase of the cell cycle. *Apoptosis*. 2011; Jun 28.

Takekawa M, Kubota Y, Nakamura T, Ichikawa K. Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions. *Nagoya J Med Sci*. 2011; Feb;73(1-2):1-14.

Tao J, Zhang XP, Chen XP, Li Y, Liu YQ, Tian J, Huang CZ, Shen GX, Tu, Y.T. Local expression of TAP-1 and MHC-I molecules and their relationship in condyloma acuminatum. *Clin. Exp. Dermatol*. 2007; 32, 550-555.

Taylor G, Wolff T, Khanna N, Furth P, Langenberg P. Genital dysplasia in women infected with human immunodeficiency virus. *J Am Board Fam Pract* 2004; 17: 108-113.

Ueda M, Hung YC, Terai Y, Saito J, Nunobiki O, Noda S, Ueki M. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2005 96:736-40.

Vogt,M., Butz,K., Dymalla,S., Semzow,J., Hoppe-Seyler,F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene*. 2006; 25, 4009-4015.

White E. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2006; 13: 371–1377.

Xie Q, Nathan C 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 1994; 56: 576-582.

Zagury D, Bernard J, Dufer J, Jeannesson P. The biology of isolated immunocytes. I. Isolation into a closed liquid microchamber: application to PFC. *Ann Immunol*. 1975;126: 23-30.

Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006; Aug;13(8):1351-9.