ANA KATHERINE DA SILVEIRA GONÇALVES

ESTUDO QUANTITATIVO DOS NÍVEIS DE IgA SECRETÓRIA SALIVAR EM MULHERES COM INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

UNICAMP
2003

ANA KATHERINE DA SILVEIRA GONÇALVES

ESTUDO QUANTITATIVO DOS NÍVEIS DE IgA SECRETÓRIA SALIVAR EM MULHERES COM INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

UNICAMP
2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Gonçalves, Ana Katherine da Silveira
G586e Estudo quantitativo dos níveis de IgA secretória salivar em mulheres com infecção pelo Papillomavírus humano / Ana Katherine da Silveira Gonçalves. Campinas SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Paulo César Giraldo.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Imunidade nas mucosas. 2. Doenças sexualmente transmissíveis. 3. Imunoglobulinas. I. Paulo César Giraldo. II. Universidade Estadual de Campinas . Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: ANA KATHERINE DA SILVEIRA GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 28/11/2003

"A verdadeira sabedoria consiste em descobrir como aumentar o bem estar do mundo".

Benjamim Franklin

Dedico esta tese ...

Ao meu melhor amigo, Edmilson,
esposo querido, pelo carinho e apoio
incondicional que sempre me dedica.

À minha meiga filhinha, Carolina,
pela beleza e ternura que
encantam minha existência.

Aos meus queridos pais, Lourdinha e Antonio
pela presença fundamental em
todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos e familiares,
representados especialmente na pessoa
de minhas queridas; "Didinha e Teta.
Obrigada por existirem".

"AMO TODOS VOCÊS"

Agradecimentos

Ao nosso amado Deus, nosso mestre maior, aquele que nos deu a vida e está nos ensinando a cada momento.

Ao meu professor e amigo, Dr Paulo César Giraldo, pelo estímulo ao crescimento científico, pelas oportunidades oferecidas e, principalmente, pelas demonstrações de carinho e amizade.

Ás minhas queridas e inesquecíveis amigas, Sandra Feitoza e Silvia Cordeiro, responsáveis pelos momentos felizes que passei durante esta jornada.

Aos meus queridos amigos da Secretaria da Ginecologia, Marcinha, Ivone, Richard, Andrezinho e Janaína pelos sorrisos que alegravam meu dia.

Á Profa. Dra. Silvia Mazon pela valiosa colaboração neste estudo

Á minha amiga e colaboradora Mariza Gondo pela alegria, bom humor e solicitude que me foi dispensada.

Aos meus amigos Dr. Paulo Danzi e Dr. Eduardo, pela disponibilidade e compreensão a nós dedicadas.

A Profa Dra. Heloísa Blotta, pelos essenciais ensinamentos de imunologia e, principalmente, pela carinhosa acolhida.

Aos novos companheiros que encontrei nesta jornada;: O Dr Antonio Feitoza e a sua bondade, a Dra. Regina e a sua simplicidade, o Silvio, com a sua gentileza, a Rita Goretti, com a sua retidão, a Joseane e sua determinação, o Dr. Hugo com a sua simpatia, a Paula Rita e o seu delicioso humor, a Andréia Tristão, com a sua coragem, a Rose "Flower" e o seu entusiasmo,o Francis, com sua "retórica elencada", a Silvia Rabelo, a Simone, a Adriana, a Daniela, a Cássia, a Larissa e a Patrícia . Vocês todos já moram no meu coração.

A Margareth Donadon, amiga dos pós-graduandos, sempre disposta ajudar-nos.

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução Humana, Chico, Mara, Nicéia e Josi, pela amizade e acolhida. Nunca esquecerei vocês.

As minhas queridas amigas do ambulatório, Kátia, Conceição, Creuzinha e Lourdes. Vocês vivem dentro de mim.

Aos docentes do Depto. de Tocoginecologia do CAISM/UNICAMP, que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste estudo.

A todos os meus amigos e colegas do departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em especial aos Professores Kleber Morais e Maciel Matias, amigos queridos, presentes em momentos importantes de minha vida, pela amizade e incentivo.

Às funcionárias do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do RN; Francisca, Dione (Didi), Rosinha e Goreth. Amo vocês!

As minhas amigas estatísticas, Sirley Siani Morais e Gislaine A. F. Carvasan pelas valiosas sugestões e auxílio na análise estatística.

Aos amigos João Bosco Medeiros e Rosana Evangelista pelo auxílio na revisão bibliográfica e no português.

Á profa. Dra. Haidié Nóbrega Simões, pela detalhada revisão ortográfica.

Aos funcionários da ASTEC pela editoração final.

Às mulheres, que aceitaram participar dessa pesquisa.

Aos meus residentes e alunos, incentivos constantes e diários à carreira acadêmica.

MUITO OBRIGADA.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução 14

2. Objetivos 27
   2.1. Objetivo geral 27
   2.2. Objetivos específicos 27

3. Sujeitos e Métodos 28
   3.1. Desenho do estudo 28
   3.2. Tamanho amostral 28
   3.3. Seleção de sujeitos 29
      3.3.1. Critérios de inclusão 29
      3.3.2. Critérios de exclusão 29
   3.4. Definição de variáveis e conceitos 30
      3.4.1. Variáveis dependentes 30
      3.4.2. Variáveis independentes 30
      3.4.3. Variáveis de controle 31
   3.5. Acompanhamento dos sujeitos 31
   3.6. Coleta de material para identificação do HPV por técnica de PCR 32
   3.7. Coleta de material para dosagem de IgA Secretória 32
   3.8. Diagnósticos laboratoriais 33
      3.8.1. Detecção do HPV por PCR 33
      3.8.2. Dosagem de IgA secretória salivar total 35
      3.8.3. Execução 35
   3.9. Instrumento para coleta de dados 36
   3.10. Coleta de dados 36
   3.11. Processamento e Análise dos dados 36
   3.12. Aspectos éticos 38

4. Resultados 39

5. Discussão 53

6. Conclusões 62

7. Referências Bibliográficas 63

8. Bibliografia de Normatizações 71

9. Anexos 72
   9.1. Anexo 1 - Formulário 72
   9.2. Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre Esclarecido 73

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgAs	Imunoglobulina do tipo A secretória
IgD	Imunoglobulina do tipo D
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL	Interleucina
MALT	Tecido linfóide associado às mucosas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Ta1	Células T auxiliares do tipo 1
Ta2	Células T auxiliares do tipo 2
Tc	Linfócito T citotóxico+
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VLPS	Partículas semelhantes a vírus

Resumo

A imunoglobulina A secretória é um importante fator de proteção da superfície das mucosas. **Objetivo:** verificar a presença do DNA-HPV na cavidade oral de pacientes portadoras de HPV genital, quantificar os níveis de IgA secretória na saliva de mulheres portadoras do vírus e correlacionar com a prática do sexo oral e tabagismo. **Pacientes e Métodos:** Um total de 220 mulheres (103 com HPV genital e 117 sem esta infecção) que foram atendidas nos ambulatórios do Centro de Atendimento Integral à Saúde da Mulher (UNICAMP) coletou saliva para a quantificação da IgAs por técnica de nefelometria. A pesquisa do DNA-HPV por PCR foi feita em 140 (70 com HPV genital e 70 sem esta doença) das 220 mulheres ingressadas no estudo. Após anamnese detalhada foram realizados os exames: ginecológico, citológico e colposcólpico que identificaram ou não a presença do HPV na região genital. O diagnóstico definitivo do HPV genital foi realizado por exame histológico. Análise estatística utilizada foi bivariada e multivariada. **Resultados:** A prevalência do HPV na cavidade oral de mulheres com HPV genital foi significativamente maior que nos controles (37,1% vs 4,3% $P < 0.0001$). A análise bivariada identificou que as presenças de HPV oral,

prática de sexo oral e tabagismo determinaram níveis de IgA secretória salivar significativamente baixos. Após analise multivariada de regressão, apenas a presença do DNA-HPV na cavidade oral e o HPV genital foram relacionados à presença de níveis baixos da IgAs. Da mesma forma, o risco de ter o HPV oral foi dependente dos baixos níveis de IgAs e da presença do HPV na região genital. **Conclusão:** A prevalência do HPV foi significativamente maior na cavidade oral das pacientes portadoras do HPV genital do que nas não portadoras e os níveis salivares de IgA secretória total foram, significativamente inferiores nas pacientes portadoras da infecção pelo HPV na cavidade oral e/ou nos genitais. As práticas de sexo oral e o tabagismo não estiveram relacionados à presença do HPV oral e não influenciaram nos níveis salivares de IgA secretória total.

Summary

The salivary secretory IgA is a humoral factor for the immune protection of mucosal surfaces. **Objectives:** to check the frequency of HPV in the oral cavity of women diagnosed with genital HPV infections, quantify the salivary secretory IgA titers in saliva of HPV infected women, and correlate it to sexual practices and tobaccoism. **Subjects and Methods:** A total of 220 women (103 with genital HPV and 117 controls) attended in Campinas University, collected saliva to quantify secretory IgA by nephelometry technique. DNA-HPV PCR test was performed in 140 (70 with genital HPV and 70 without genital HPV) out of 220 women studied. After detailed anamnesis, general physical, gynecological and oral examinations were performed. The diagnosis of genital HPV infection was confirmed histologically. The statistical analyses were bivariate and multivariate. **Results:** The prevalence of oral HPV in genital infected women was significantly higher than the controls (37.1% vs4.3% -*p value* < 0.0001). The statistical bivariate analysis identified, oral and genital HPV, oral sex and tobaccoism in determination of lower salivary secretory IgA titers. After multivariate analysis only oral and genital HPV was determinant to lower salivary secretory IgA titers. Similarly, the

chance of oral HPV was dependent of lower salivary secretory IgA titers and genital HPV. **Conclusion:** The prevalence of oral HPV was higher in the epithelium of the oral cavity of women with genital HPV. The salivary secretory IgA titers were significantly lower in women with oral and genital HPV. The practices of oral and anal sex do not seem to influence the carriage of HPV in the oropharynx.

1. Introdução

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é atualmente uma das doenças sexualmente transmissíveis mais prevalentes em todo o mundo (SYRJÄNEN, 1997; WIELAND e PFISTER, 1997).

Este vírus apresenta especificidade pelo epitélio de revestimento da pele e mucosas, podendo induzir a formação de condilomas, papilomas e neoplasias (WIELAND e PFISTER, 1997). Em virtude do seu potencial oncogênico já bem estabelecido, o HPV é um fator determinante na carcinogênese em diversos sítios de infecção. O HPV poderia determinar a formação de lesões clínicas (condilomas), quase sempre, de baixo potencial oncogênico ou lesões subclínicas, pré-neoplásicas e neoplásicas, causadas, na maioria das vezes, por tipos virais de alto risco oncogênico (HAUSEN, 1986; HAUSEN, 1997; WIELAND e PFISTER, 1997; ANDERSON et al., 2001). Apesar disto, não se sabe exatamente ainda o real determinismo das lesões clínicas ou subclínicas.

O HPV pode habitar, de forma não patogênica, a mucosa oral, morfologicamente, normal. Em 1992, KELLOKOSKI et al., estudaram 334 mulheres

com infecção genital pelo HPV, utilizando hibridização por Southern blot e observaram que 15% de biópsias com mucosa oral, clinicamente normal, continham HPV. A técnica de PCR aumentou a positividade do total da amostra para 29,4%.

GIRALDO et al. (1996) evidenciaram, através de esfregaço citológico da cavidade oral, alterações citológicas, fortemente, sugestivas desta infecção em 6% das pacientes portadoras de HPV genital.

Posteriormente, TERAI et al. (1999) observaram através de PCR, uma alta prevalência (56,7%) de HPV na cavidade oral normal de adultos de ambos os sexos.

Apesar da alta prevalência dessa doença, somente uma pequena percentagem de indivíduos desenvolve as neoplasias. A infecção pelo HPV, na maioria das vezes, é transitória e assintomática, entretanto, por algum motivo, pode apresentar-se de forma persistente, culminando com o aparecimento de tumores (HAUSEN, 1986; HOWLEY, 1991; LORINCZ et al., 1992; WIELAND e PFISTER, 1997).

A descoberta do DNA-HPV 11, 16 e 18 por hibridização, em patologias orais neoplásicas e não-neoplásicas, sugere a participação do HPV na gênese dessas entidades (SYRJÄNEN, 1997). A carcinogênese oral é um processo de múltiplos estágios, que envolve a infecção por HPV de alto risco oncogênico e a associação com outros cofatores, tais como tabagismo e alcoolismo (SARANATH et al., 1999).

Hoje se pode inferir que os tipos virais, a carga viral e sua persistência não seriam, por si só, suficientes para explicarem a transformação de um processo infeccioso em neoplásico. Além do HPV, fatores adicionais seriam necessários para transformar a infecção ou lesão tecidual promovida pelo vírus em lesão pré-neoplásica ou carcinomatosa. Existem elementos que, quando associados à infecção pelo HPV, podem contribuir para a persistência da infecção, potencializando a capacidade oncogênica deste vírus. Entre esses, podemos destacar o número de parceiros sexuais nos últimos dois anos, o hábito de fumar e outras infecções genitais, tais como: herpes, clamídia e micoplasma (SYRJÄNEN, 1997; DERCHAIN et al., 1999).

Contudo dentre todos esses fatores, a resposta imunológica de cada indivíduo, parece ser o principal determinante para a ocorrência, progressão e recorrência da infecção pelo HPV. O papel da imunidade foi demonstrado pela freqüência aumentada de infecções clinicamente manifestas em indivíduos imunodeprimidos e também pelo aumento das células de defesa (células mononucleares, CD4 e macrófagos) nas lesões papilomatosas em fase de regressão (BENTON et al.,1992; HÖPFL et al., 1995).

A associação existente entre a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a progressão de lesões induzidas pelo HPV reforça esta afirmação. A imunossupressão, causada pelo HIV, funciona como catalisador, favorecendo a evolução de lesões pré-neoplásicas para o câncer, além do fato de que os tipos virais de HPV de alto risco oncogênico interagem na resposta

do sistema imunológico, subvertendo a imunidade e promovendo a persistência viral, outro agravante de relevância no processo evolutivo da doença (CHIRGWIN et al., 1995; SEDLACEK, 1999).

O aumento das infecções orais, em pacientes portadores de imunodeficiência (HIV), também justifica a importância de investigar a resposta imunológica da mucosa oral a agentes infecciosos (ANTEYI, et al., 2003).

Essas e outras evidências têm demonstrado que a imunidade do hospedeiro pode estar entre os principais fatores que irão definir a história natural da infecção pelo HPV (SCOTT et al., 2001).

A imunidade inata ou natural proporciona as barreiras iniciais de defesa contra os microrganismos. Os componentes principais da resposta inata são os epitélios que atuam como barreiras físicas e funcionais, as células fagocíticas (neutrófilos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos) que engolfam os microrganismos e os destroem pela produção de substâncias microbicidas e o sistema complemento, constituído por proteínas plasmáticas do sangue que conferem proteção ao organismo antes dos anticorpos serem produzidos (ROITT et al., 2003). A resposta imune inata, além de combater as infecções, induz a subseqüente imunidade adquirida, ao emitir sinais, através da liberação de substâncias sinalisadoras (citocinas), pelas células de defesa e células epiteliais envolvidas no processo. As citocinas são essenciais para iniciarem as respostas dos linfócitos T e B antígenos específicos (GORCZYNSKI e STANLEY, 2001; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

A resposta imune tardia ou adquirida se faz basicamente através da produção de imunoglobulinas (resposta humoral) ou pela ativação de células específicas de defesa (resposta celular mediada). Obviamente, estas respostas não se processam isoladamente. Existe interação entre ambas, determinada por vários fatores, mas principalmente pelo agente infeccioso que necessita ser erradicado. As substâncias estranhas que induzem essas respostas são chamadas de antígenos (ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

As principais características da imunidade adquirida são a sua memória e capacidade de responder, mais vigorosamente, às repetidas exposições ao mesmo microrganismo. Em razão de sua extraordinária capacidade de distinguir entre diferentes microrganismos e macromoléculas, é, também, designada imunidade específica. Os componentes da imunidade adquirida são os linfócitos e seus produtos.

Esse tipo de imunidade se estabelecerá pela migração de linfócitos para o local, onde ocorre o estímulo antigênico (ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

Os linfócitos são responsáveis pelo reconhecimento imune específico dos patógenos e pela indução das respostas imunes específicas. Todos os linfócitos derivam de células-tronco da medula óssea, mas os linfócitos T sofrem o processo de desenvolvimento no timo, e os linfócitos B, na medula óssea. Os linfócitos T se constituem em várias subpopulações diferentes com variedade de funções. Uma subpopulação interage com as células fagocíticas auxiliando-as na destruição de patógenos intracelulares. São chamadas células T, auxiliares do tipo 1 (Ta1) ou T *helper* 1 (Th1). Uma outra subpopulação interage com as células B,

auxiliando-as na divisão, na diferenciação celular, na produção de anticorpos e são conhecidas como células T auxiliares do tipo 2 (Ta2) ou T *helper* 2 (Th2). Um terceiro grupo é de linfócitos T citotóxicos (Tc), responsável pela destruição das células do hospedeiro que se tornaram infectadas por vírus ou parasitas intracelulares (McGUIRK e MILLS, 2002; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

O tipo de antígeno, usualmente, determina a citocina ou peptídeo, a ser secretado pelo leucócito ativado. Na dependência da citocina secretada, o hospedeiro produz uma resposta imune pró-inflamatória (Ta1) que produz citocinas (interleucinas) pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, interferon, etc) ou uma resposta antiinflamatória Ta2 que resulta na produção de citocinas antiinflamatórias: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, etc. Enquanto as citocinas pró-inflamatórias induzem à imunidade celular, pelo estímulo das células fagocitárias, as citocinas antiinflamatórias deprimem essa via, favorecendo a resposta imune humoral, que estimula a produção de anticorpos (MOSMANN et al., 1986; McGUIRK e MILLS, 2002; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

As moléculas de anticorpos são sintetizadas e secretadas pelos linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral. Os anticorpos são distribuídos nos fluídos biológicos ou se inserem muitas vezes, na superfície de outras células efetoras imunes. O linfócito B codifica um receptor de superfície específico para um determinado antígeno. Explicando melhor, cada antígeno estimula a produção de anticorpos direcionáveis, apenas, à sua própria molécula, ou seja, cada anticorpo

pode inibir ou neutralizar, apenas, o antígeno contra o qual ele foi criado (GORCZYNSKI e STANLEY, 2001; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

Ao penetrar no organismo, um antígeno é fagocitado pelos macrófagos do tecido linfóide. A seguir, o antígeno é apresentado pela célula apresentadora de antígenos (APC) aos linfócitos B adjacentes, iniciando um processo de diferenciação celular, resultando em plasmócitos que se reproduzem, gerando anticorpos específicos para o antígeno invasor (GORCZYNSKI e STANLEY, 2001; McGUIRK e MILLS, 2002; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são glicoproteínas heterogêneas bifuncionais secretadas pelos linfócitos B diferenciados ou plasmócitos. As imunoglobulinas (Ig) constituem uma família de glicoproteínas, estruturalmente, semelhantes. Todos os anticorpos têm uma estrutura simétrica central de duas cadeias pesadas idênticas, ligadas, covalentemente, e duas cadeias leves idênticas, cada uma delas ligada a uma das cadeias pesadas (ROITT et al., 2003).

As imunoglobulinas são classificadas em diferentes classes e subclasses, com base nas diferenças na região C das cadeias pesadas e nas suas propriedades funcionais.

As imunoglobulinas são divididas em cinco classes, liberadas em uma seqüência específica, no contexto da resposta imunológica, designadas IgM, IgD, IgE, IgG e IgA (ABBAS et al., 2003).

A Imunoglobulina A (IgA) representa 5-20% do total de imunoglobulinas humanas séricas, sendo o último grupo de anticorpos produzidos na resposta imunológica. A IgA tem meia-vida de, aproximadamente, uma semana. A maior parte da IgA é encontrada nos tecidos linfóides associados às mucosas, embora quantidades mínimas, também, sejam detectadas na circulação. Essa imunoglobulina localiza-se, principalmente, no trato gastrintestinal e nas secreções mucoserosas como saliva, colostro, leite, secreções traqueobronquiais, geniturinárias, tendo a função de proteger as mucosas, nas quais forma uma barreira protetora no lúmem das vias aéreas, trato gastrintestinal e trato geniturinário (GORCZYNSKI e STANLEY, 2000).

A IgA está presente em todas as superfícies externas, com exceção da pele, impedindo a ligação dos microrganismos com os epitélios. A IgA liga-se aos antígenos, formando complexos antígenos-anticorpo os quais são removidos pela mucina secretada pelos tecidos glandulares dos diferentes sítios de mucosas (EGMOND et al., 2001; ROITT et al., 2003).

A IgA, associada à mucosa, é secretada, de forma dimérica, pelos plasmócitos existentes na lâmina própria. O transporte do anticorpo da lâmina para a mucosa é iniciado, quando a IgA dimérica liga-se a uma proteína (componente secretório) presente na superfície das células epiteliais. A IgA sofre endocitose, é transportada para dentro da célula epitelial e chega à superfície luminar da célula epitelial, onde o componente secretório é clivado e

a IgA conserva um fragmento desse componente, enquanto o restante da proteína continua ligado à célula epitelial (GORCZYNSKI e STANLEY, 2001).

A IgA, liberada na luz das mucosas intestinais, respiratórias e geniturinárias, é conhecida como IgA secretória, devido ao fato de conservar o fragmento do componente secretório. A IgA secretória é bifuncional, ligando-se aos microrganismos antes que eles penetrem a lâmina própria das mucosas, além de estimular o sistema complemento (GORCZYNSKI e STANLEY, 2000; EGMOND et al., 2001; ABBAS et al., 2003).

O papel da IgA secretória na proteção das mucosas já está bem estabelecido, entretanto este não se efetua de forma isolada e, sim, dentro de um contexto bem definido que se constitui o sistema imune específico de mucosas ou MALT (mucosal associated lymphoid tissue) (BRANDTZAEG et al., 1999; GORCZYNSKI e STANLEY, 2000; EGMOND et al., 2001; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

O MALT é constituído pelos epitélios mucosos (barreiras de proteção contra agentes infecciosos) e células de defesa, principalmente os linfócitos e as células acessórias, muitas vezes organizadas em estruturas distintas, lembrando folículos linfóides que ficam localizados abaixo dos epitélios (BRANDTZAEG et al., 1999; GORCZYNSKI e STANLEY, 2000).

O MALT é o principal produtor da IgA secretória sendo esta, a efetora primária da imunidade nas mucosas, e sua função é preponderante sobre as

outras imunoglobulinas (BESSEN e FISCHETTI, 1989; CHILDERS et al., 1989). O MALT protege o organismo contra agressores que penetram diretamente através do epitélio da superfície das mucosas e é rico em tecido linfóide associado às mucosas do trato gastrintestinal (GALT), respiratório (BALT) e geniturinário. Nestes locais, a IgA é secretada diretamente na superfície da mucosa epitelial do trato, constituindo o principal mecanismo efetor de resposta imune (ROITT et al., 2003).

Nas mucosas, a IgA é produzida em quantidades maiores do que qualquer anticorpo, principalmente em razão da extensão da superfície intestinal. Como a síntese da IgA ocorre, principalmente, nos tecidos linfóides das mucosas e o transporte para o lúmen destas é muito eficiente, este isotipo constitui menos de um quarto dos anticorpos presentes no plasma (IgA sérica) e é o menor componente do sistema imune humoral quando comparado com IgG e a IgM (BRANDTZAEG et al., 1999; GORCZYNSKI e STANLEY, 2000).

A razão pela qual são produzidas maiores quantidades de IgA nas mucosas, é que a troca de isotipos para IgA ocorre, mais eficientemente, no tecido linfóide da mucosa e as células T, produtoras de citocinas, estimulantes de IgA são mais numerosas nas mucosas do que nos outros tecidos linfóides. As células B, produtoras de IgA, parecem ter uma especial propensão a residirem nas mucosas (ABBAS et al., 2003).

As respostas imunes aos antígenos orais diferem, em alguns aspectos fundamentais, das respostas aos antígenos encontrados em outros sítios. As

duas diferenças mais marcantes são os altos níveis de produção de anticorpo tipo IgA associados aos tecidos das mucosas e à tendência de imunização oral com antígenos protéicos, induzindo tolerância ao invés de ativação das células T, inibindo a resposta imune celular e estimulando a resposta humoral (ABBAS et al., 2003).

Na cavidade oral, parece haver predominância dessa imunoglobulina nas secreções externas, nos plasmócitos tissulares e no interior das glândulas salivares. Acredita-se que a IgA secretória, por possuir estrutura polimérica mais resistente à degradação proteolítica, possa neutralizar alguns tipos de vírus mais efetivamente, que a IgA sérica. Esse fato, talvez, explique a resistência natural da cavidade oral a infecções.

Observa-se que nos pacientes imunodeprimidos ocorrem variações nos níveis de IgA sérica e secretória, decorrentes, provavelmente, de alterações de imunidade local da mucosa, refletindo-se em aumento considerável de infecções na cavidade oral (BRANDTZAEG et al., 1999; ABBAS et al., 2003; ANTEYI, et al., 2003).

A IgA na cavidade oral inibe a aderência de microrganismos, neutraliza viroses e toxinas, além de regular e equilibrar a flora colonizadora das mucosas expostas ao meio externo (RUSSEL e MESTECKY, 1988; BRANDTZAEG et al., 1999: EGMOND et al., 2001) (Figura 1).

A IgA está associada ao controle das infecções virais nas mucosas (BRANDTZAEG et al., 1999; RUSSEL e MESTECKY, 2002). Apesar das semelhanças entre as mucosas oral e genital, a infecção pelo HPV, faz-se notar muito mais nos genitais que na cavidade oral. A cavidade oral deve ser dotada de mecanismos de defesa específicos, entre eles a IgA secretória, podendo ser um importante fator de proteção contra infecções virais (HPV).

Podemos considerar ainda a possibilidade de que indivíduos infectados sejam imunocompetentes de forma sistêmica e apresentem deficiência imunológica de IgA secretória total por causas diversas (sistêmicas ou locais), específica e transitória para alguns agentes infecciosos virais, tais como o HPV.

É possível imaginar que indivíduos infectados com vírus de alto risco e com resposta imune específica para o HPV mais adequada, tenham uma evolução da doença mais favorável do que aqueles com infecção com vírus de baixo risco, mas sem resposta imune apropriada.

Faz-se necessário portanto, conhecimentos mais aprofundados da resposta imune das mucosas genitais e orais. Somente, desta forma, pode-se ter uma melhor compreensão da evolução natural da infecção pelo HPV, da sua fisiopatogênese e conseqüentemente proporem-se novas terapêuticas, que vise o combate ao HPV em termos imunológicos, talvez de forma mais efetiva.

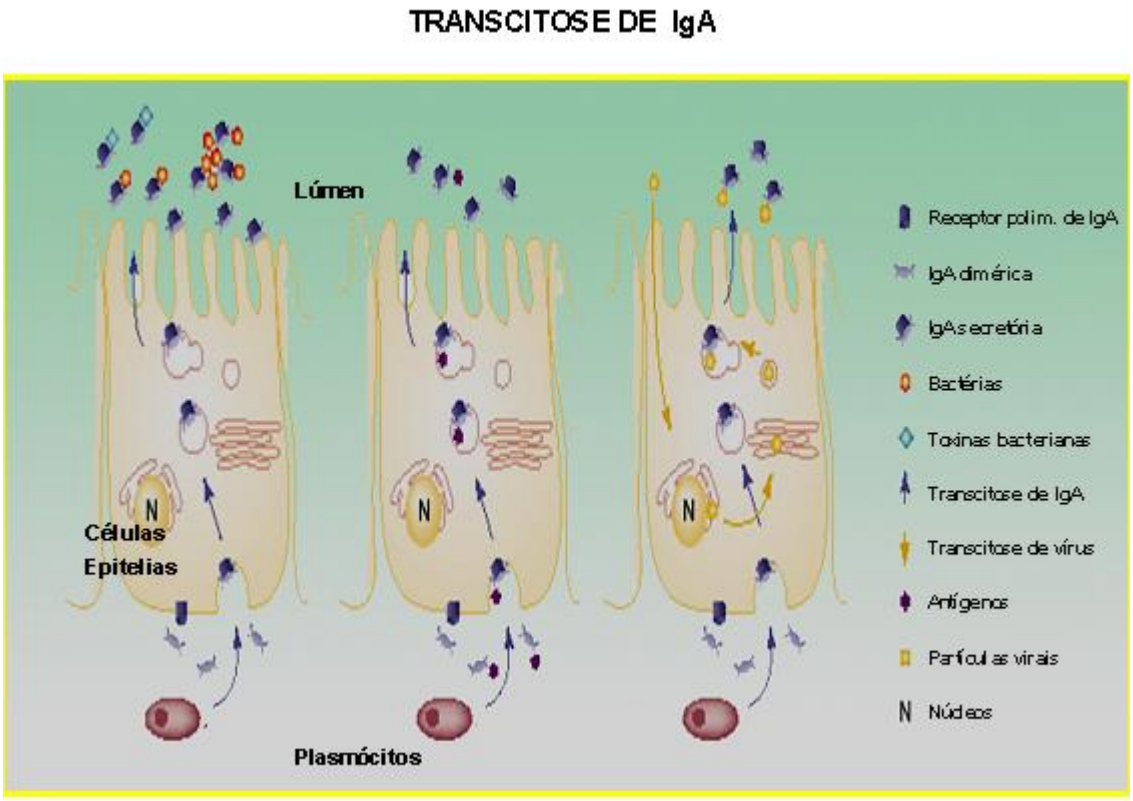


Figura 1. *Transcitose de IgA. Inibição da aderência de patógenos, imobilização das bactérias e neutralização dos seus produtos, eliminação de antígenos da lâmina própria e a neutralização de vírus intracelulares (EGMOND et al., 2001).*

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar a presença do DNA-HPV e da resposta imune da mucosa oral em mulheres com e sem lesões HPV induzidas nos genitais.

2.2. Objetivos específicos

1. Estabelecer e comparar a prevalência do DNA-HPV na mucosa orofaríngea de mulheres portadoras e não portadoras de lesões genitais HPV induzidas.

2. Quantificar e comparar os níveis de IgA secretória total na orofaringe de portadoras e não portadoras do vírus do HPV.

3. Correlacionar a presença do vírus do HPV e os níveis de IgA secretória total salivar, com práticas sexuais e tabagismo.

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Estudo de corte transversal, comparativo e não intervencional.

3.2. Tamanho amostral

Os grupos considerados, neste trabalho, para análise comparativa foram constituídos de mulheres portadoras de lesões clínicas induzidas pelo HPV nos genitais e de mulheres não portadoras de lesões clínicas induzidas pelo HPV nos genitais. A prevalência estimada de imunoglobulinas específicas do tipo A, na cavidade oral de mulheres portadoras de lesões clínicas induzidas pelo HPV (PCR) foi de 54% [P1=0,29] (Marais et al., 2001). Fixou-se uma diferença absoluta entre as proporções nos dois grupos, de 15% (P2=14%). O erro tipo I foi fixado em 5% e o erro tipo II em 20%, o que resultou em um grupo de 70 mulheres portadoras de lesões induzidas pelo HPV [n1] e em outro grupo de 70

mulheres não portadoras de lesões clínicas induzidas pelo HPV nos genitais. [n2] (Marais et al., 2001).

3.3. Seleção de sujeitos

Inicialmente, foram convidadas, a participar do estudo, mulheres sexualmente ativas que apresentaram lesões genitais clínicas (condilomas genitais) confirmadas por exame histopatológico. O grupo de não portadoras foi constituído por outras mulheres também sexualmente ativas, porém sem lesões clínicas ou subclínicas induzidas pelo HPV, escolhidas mediante três exames seriados de citologia e colposcopia normais. Todas as mulheres foram atendidas de forma seqüencial no Ambulatório de Infecções Genitais do CAISM – UNICAMP.

3.3.1. Critérios de inclusão

- Estar entre 18 e 45 anos
- Estar no menacme
- Ser sexualmente ativa há mais de seis meses
- Disponível para participar do trabalho

3.3.2. Critérios de exclusão

- Gravidez
- Presença de quadros inflamatórios evidentes que não sejam HPV induzidos na cavidade oral.

- Uso de imunossupressores nos últimos 30 dias
- Presença de doenças crônicas degenerativas
- Ser alcoólatra e/ou dependente de drogas

3.4. Definição de variáveis e conceitos

3.4.1. Variáveis dependentes

- **Presença do DNA-HPV na cavidade oral:** confirmada por estudo de biologia molecular (PCR). Classificado em presente ou ausente.
- **Níveis de IgA secretória total**: determinados em mg/dl por técnica de nefelometria na saliva.

3.4.2. Variáveis independentes

- **Presença de Lesões induzidas pelo HPV:** clínico ou subclínico, confirmado ou excluído por exames; citológico, colposcópico e histopatológico. Classificado em presente ou ausente.
- **Tabagismo:** presente ou ausente, conforme prática regular nos últimos seis meses, referido pela mulher.
- **Número de cigarros:** fumados diariamente pela paciente nos últimos 6 meses.
- **Número de parceiros sexuais:** referido pela mulher em número, desde a primeira relação até o momento de ser admitida no estudo.
- **Freqüência de relações sexuais vaginais:** categorizado em número de vezes por mês.

- **Prática de sexo oral receptor:** de acordo com o referido pela mulher – prática positiva, quando o contato boca-vagina ocorrer, pelo menos, uma vez por mês; prática negativa, quando esse ocorrer numa freqüência menor ou isso ou nunca ter ocorrido.

- **Prática de sexo oral doador:** de acordo com o referido pela mulher – prática positiva, quando o contato boca-pênis ocorrer, pelo menos, uma vez por mês; prática negativa, quando esse ocorrer numa freqüência menor ou isso ou nunca ter ocorrido.

3.4.3. Variáveis de controle

- **Idade**: em anos completos por ocasião da consulta.

- **Cor da pele:** conforme observação do pesquisador: branca e não branca.

- **Método anticoncepcional**: Conforme informação da paciente, positivo ou negativo.

- **Número de partos**: número de partos com gestações superiores há 20 semanas.

- **Número de abortos**: número de perdas gestacionais com 20 semanas ou menos.

- **História de DST**: referida pela paciente até um mês antes da entrevista, presente ou ausente.

3.5. Acompanhamento dos sujeitos

Em mulheres, sabidamente, portadoras de condilomas genitais (HPV clínico), foi realizada biópsia das lesões, como de rotina, no Ambulatório de Infecções

Genitais. Os fragmentos de biópsia, encaminhados para exame histopatológico, foram fixados em formalina a 10% em frascos de plástico descartáveis os quais também foram identificados com o nome da paciente e número da ficha.

O material foi processado em bloco de parafina e corados segundo a técnica de Hematoxilina-eosina (HE), para leitura e classificação, segundo critérios do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP, pelo patologista inserido no estudo. Para fazer parte do grupo de não portadoras, as mulheres deveriam ter três exames de citologia oncológica negativos para lesões induzidas pelo HPV, nos últimos três anos e exame colposcólpico na data do estudo sem imagens colposcópicas alteradas.

3.6. Coleta de material para identificação do HPV por técnica de PCR

Foi realizada coleta de material celular raspando-se suavemente no palato duro, pilares anteriores e bochechas da cavidade oral com *swabs* estéril de Dacron. O material foi colocado em 1ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e congelada a menos 70º C.

3.7. Coleta de material para dosagem de IgA Secretória

De cada paciente, foi coletado 1ml de saliva pura, acondicionada em tubo cônico de Eppendorf. O material foi, imediatamente, centrifugado (Centrifuge – 5415C Eppendorf - 600 x g) durante 12 minutos e congelado a ˉ 70º C para futura mensuração de IgA secretória.

3.8. Diagnósticos laboratoriais

3.8.1. Detecção do HPV por PCR

O material coletado foi reaquecido e processado extraindo-se o DNA viral, mediante protocolo testado, adaptado e preconizado para detecção do HPV, em material proveniente da cavidade oral (HERRINGTON e MCGEE, 1992) realizado no laboratório de biologia molecular CITOCAMP. Para a detecção do DNA, utilizaram-se os "primers" MY09 e MY11, que flanqueiam com a região L1 do genoma do HPV (região conservada do vírus). Em todos os testes correu-se em paralelo uma amostra de controle positiva e uma amostra de controle negativo.

Seguiram-se, rigorosamente, as seguintes etapas:

- Iniciou-se com a centrifugação do material a 14000rpm por cinco minutos.
- Descartou-se, em seguida, o sobrenadante, com posterior digestão com proteinase K (20mg/ml) e o volume final da digestão foi de 500 µL com tampão, contendo 50mM Tris-HCl (pH 8,5) e 1mM EDTA.
- Após a digestão, purificou-se a amostra pelo método fenol/clorofómio, v/v de fenol, e inverteu-se o tubo,. centrifugou-se por 30 min. a 14000rpm, transferiu-se o sobrenadante para um tubo eppendorf novo.
- Adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio (25:25). Centrifugou-se por 30 min. a 14000rpm. Transferiu-se o sobrenadante e adicionaram-se 500µL de ETOH absoluto. Centrifugou-se novamente por 30 min. a 14000rpm.
- Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 70µL de ETOH 70% e centrifugou-se novamente por 10 min. a 14000rpm.

- Descartou-se, novamente, o sobrenadante, deixou-se secar a temperatura ambiente por 15 min. e adicionaram-se 100µL de TE 1X.

Para a amplificação, foram utilizados uns volumes finais de 50µL, 10mM dNTPs, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2.,5mM $MgCl_2$, 20pmol de cada "primer", 2.,5U of Taq DNA polymerase (Invitrogen^{TM}), 200ng de DNA. Após a amplificação, obteve-se um fragmento de 450pb. Como controle de qualidade do DNA e da reação, foi realizada a amplificação do gene da µ-globina humana, utilizando-se os "primers" RS42 e KM29, obtendo-se um produto de PCR de 536pb.

Utilizou-se o seguinte protocolo para a amplificação: desnaturação a 94ºC por cinco minutos um ciclo; 40 ciclos de 94ºC – 1 min. (desnaturação), 55ºC – 1mim. ("anneling"), 72ºC – 2min (extensão), e 1 ciclo de cinco minutos à 72ºC de extensão final (HERRINGTON et MCGEE, 1992). Ao término da amplificação, aplicaram-se 5µL do produto da amplificação com 2µL de azul de bromofenol e a mistura foi aplicada em gel de agarose a 1,5% para realização da eletroforese. Ao término da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e colocado em um transiluminador de luz UV, para verificação da correta amplificação. Quando se observou à presença de uma banda de 536pb (µ-globina) e outro de 450pb (HPV), o resultado foi considerado como positivo, pois houve a amplificação do controle e do DNA viral, e quando se observou, apenas, uma banda de 536pb, o resultado foi considerado negativo.

3.8.2. Dosagem de IgA secretória salivar total

As amostras de saliva não diluídas foram submetidas à quantificação de IgA secretória salivar total por técnica de nefelometria, com reagente Human IgA e em nefelômetro BN 2 (Dade Behring, Marburg, Germany). Todas as amostras foram testadas em duplicata. O aparelho foi calibrado e atingiu níveis de sensibilidade de 1,5mg/dl.

Material Utilizado:

- Nefelômetro BN 2 (Dade Behring, Marburg)
- Solução tampão (*buffer* de polietileno-GLICOPEG)
- Amostra de saliva (antígeno)
- Reagente (anticorpo anti-IgA – Human IgA)

3.8.3. Execução

O tampão e a amostra foram colocados juntos. Após estabilização da mistura, injetou-se o anticorpo anti-IgA e a reação se processou. As imunoglobulinas contidas na amostra, através de uma reação imunoquímica, formaram imunocomplexos com anticorpos específicos que dispersaram um raio de luz incidente. A intensidade da luz dispersada foi proporcional à concentração da imunoglobulina correspondente, contida na amostra analisada. A luz dispersada resultante da reação antígeno-anticorpo, foi convertida em um sinal, na dependência da concentração de IgA da amostra. De acordo com a calibração, o

sinal foi convertido em unidade de concentração pelo analisador e os resultados da amostra foram obtidos através de curva padrão e expressos em mg/dl.

3.9. Instrumento para coleta de dados

O instrumento para coleta de dados foi constituído de um formulário previamente, elaborado (Anexo 1), que foi aplicado às mulheres, sendo os resultados dos exames anotados em uma seção específica.

3.10. Coleta de dados

Aplicou-se o formulário especifico a todas as mulheres que aceitaram participar do estudo. Na mesma ocasião, foram realizados exames físicos gerais, ginecológicos e da cavidade oral. Também, foram coletadas as amostras para a realização dos exames laboratoriais. Posteriormente, os resultados foram transcritos para seção específica do formulário.

3.11. Processamento e Análise dos dados

Criou-se banco de dados em planilha de *software*: *Excel/Office* 2000 com todas as variáveis descritas em item anterior. As mulheres foram relacionadas cronologicamente, segundo as datas de coleta de material, atribuindo, a cada uma delas, um número de identificação e classificação por grupo de portadoras

e não portadoras de lesões induzidas pelo HPV nos genitais. O banco de dados foi exportado para o DBASE III e, em seguida, para o EPI INFO 6.04b (1997)

Foi feita consistência inicial da digitação dos dados, através da conferência manual da listagem, e, em seguida, fez-se a consistência lógica final. Inicialmente, foi feita análise descritiva univariada através da distribuição de freqüência das variáveis e médias.

Em seguida, houve análise comparativa utilizando tabelas de contingência, para medir a associação e risco entre as variáveis categóricas lesões induzidas pelo HPV nos genitais, presença de HPV oral e tabagismo. A magnitude dessas associações foi expressa pelo *Odds ratio,* com seu respectivo IC 95%. Para as variáveis contínuas de distribuição assimétrica, como os níveis de IgA secretória total nos grupos estudados, foram estabelecidos e comparados, usando-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney, análise de variância de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (BRIEMAN et al., 1984, MEDRONHO et al., 2002). O valor atribuído para o ponto de corte (5,8), foi obtido a partir da exclusão dos intervalos de confiança (95%) para a mediana dos níveis de IgA dos casos 4,4 (3,8 a 5,5) e das mulheres controles 7,7 (6,9 a 8,3). Para análise da influência de cada uma das variáveis significativas obtidas na comparação bivariada, elaborou-se regressão logística multivariada. A relevância das variáveis e as suas associações foram demonstradas também pela árvore de decisão (ALTMAN, 1991).

3.12. Aspectos éticos

Este estudo respeitou as normas preconizadas pela “Declaração de Helsinque” (WORLD, 1996) e pela Resolução 196/99 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). A concordância espontânea da paciente foi expressa, mediante a assinatura em termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

4. Resultados

Totalizou-se um número de 220 mulheres estudadas sendo um grupo de 103 portadoras de lesões induzidas pelo HPV nos genitais e outro grupo de 117 não portadoras. Destas, testou-se seqüencialmente por PCR, a presença do HPV oral nas primeiras 70 mulheres do grupo de portadoras de lesões e outras 70 mulheres do grupo das não portadoras, em função das diferenças significativas marcantes Já encontradas nos níveis de IgAs das primeiras amostras analisadas, não houve necessidade inicial de se testar todas as 220 mulheres.

Apesar de ter sido determinado previamente a faixa etária das mulheres estudadas, observou-se uma seleção natural das pacientes mais jovens, de forma significativa para o grupo das portadoras de infecção genital pelo HPV em relação ao grupo de não portadoras, cujas médias e desvio padrão foram respectivamente de 27,1(±8,0) e 31,4 (±7,3) ($p>0,001$). Não foram encontradas diferenças significativas quanto à raça predominante branca (75,7% vs. 71,8%) e uso de anticoncepcionais (74,4% vs 69,9%). No grupo constituído por mulheres portadoras de lesões genitais induzidas pelo HPV, o antecedente de tabagismo

foi significativamente mais encontrado que no grupo das não portadoras (37,9% vs 20,5% ; p=0.0045) (Tabela 1).

TABELA 1

Características gerais e antecedentes da população estudada

Características e antecedentes		Lesão genital HPV induzida		p
		Positiva n = 103	Negativa n = 117 (%)	
Idade	Média (dp)	27,1 (±8,0)	31,4 (±7,3)	0,0001*
Raça branca	n (%)	78 (75,7)	84 (71,8)	0,5088**
Uso de ACO	n (%)	87 (74,4)	72 (69,9)	0,4613**
Tabagismo	n (%)	39 (37,9)	24 (20,5)	0,0045**

*T de Student

**Qui-quadrado

ACO- anticoncepcional oral

Na tabela seguinte, foram listados os antecedentes sexuais dos sujeitos. Observaram-se diferenças significativas nas práticas sexuais, exceto para o número de relações sexuais/mês. As mulheres portadoras de lesões induzidas pelo HPV nos genitais apresentaram um maior número de parceiros: 4,1 (±4,1) vs. 31,4 (±7,3); uma maior freqüência de sexo oral doador e receptor (61,2% vs 45,3% - 62,1% vs 45,3%), em relação ao grupo das não portadoras. (Tabela 2).

TABELA 2

Antecedentes sexuais da população estudada

Características da sexualidade		Lesão genital HPV induzida		p
		Positiva n = 103	Negativa n = 117 (%)	
N. relações/mês	Média (dp)	8,7 (±5,6)	8,5 (±5,8)	0,7324*
N. de parceiros	Média (dp)	4,1(±4,1)	31,4 (±7,3)	< 0,0001*
Sexo oral doador	n (%)	63 (61,2)	53 (45,3)	0,0187**
Sexo oral receptor	n (%)	64 (62,1)	53 (45,3)	0,0125**

* Teste de Mann-whitney

** Teste Qui-quadrado

Observou-se que o diagnóstico da infecção pelo HPV, na cavidade oral, foi significativamente mais prevalente no grupo de mulheres portadoras do vírus na região genital do que no grupo das não portadoras (37,1% vs 4,3) (Tabela 3).

TABELA 3

Associação entre a presença de HPV genital e HPV oral em 140 mulheres testadas*

Presença de DNA-HPV oral	Lesão genital HPV induzida		OR (IC 95%)
	Positiva	Negativa	
Positiva	26 (37,1%)	3 (4,3%)	13,2 (3,8 - 46,3)
Negativa	44 (62,9%)	67 (95,7%)	

T este de Exato de Fisher - Valor-p < 0,0001

* *Apenas 140 das 220 mulheres foram testadas para HPV oral.*

Devido à grande dispersão já esperada de valores, a mensuração da IgA secretória foi apresentada, através de mediana, percentil, valores mínimo e máximo. As medianas dos níveis de IgA secretória detectada na cavidade oral, foram significativamente inferiores no grupo de mulheres portadoras de lesões induzidas pelo HPV nos genitais em relação ao grupo das não portadoras (4,4 vs 7,7) (Tabela 4).

TABELA 4

Níveis IgAs salivar segundo a presença de HPV genital em 220 mulheres estudadas

	Lesão genital HPV induzida	
	Positiva	**Negativa**
n	103	117
Valor Mínimo	0,0	0,0
Percentil 25%	2,5	4,9
Mediana	4,4	7,7
Percentil 75%	7,9	8,9
Valor Máximo	40,0	40,0

Teste de Mann-Whitney – Valor de $p<0,0001$

No grupo das 220 mulheres portadoras ou não de HPV genital, em relação ao tabagismo, foram observadas diferenças significativas nos níveis de IgAs salivar

total. A mediana das pacientes fumantes mostrou valores inferiores ao das mulheres não fumantes (4,9 vs 6,6) (Tabela 5).

TABELA 5

Níveis de IgAs na cavidade oral segundo a presença de tabagismo

	Tabagismo	
	Presente	**Ausente**
n	62	156
Valor Mínimo	0,0	0,0
Percentil 25%	2,3	4,1
Mediana	4,9	6,6
Percentil 75%	8,3	8,7
Valor Máximo	28,2	40

Teste de Mann-Whitney – Valor de $p<0,01$

Após ter sido realizada reações de PCR no material proveniente da cavidade oral de mulheres portadoras (70) e não portadoras (70) de HPV genital, foram identificadas 29 delas com PCR positivo e 111 com teste negativo para HPV na orofaringe. A mediana dos níveis de IgAs total, detectadas na cavidade oral das pacientes com PCR positivo para HPV, foi significativamente inferior aqueles valores encontrados em mulheres com PCR negativo para HPV na orofaringe (3,1 vs 8,0) (Tabela 6).

TABELA 6

Níveis de IgAs na orofaringe segundo a presença ou não de HPV oral

	Presença de DNA-HPV oral (PCR)	
	Positivo	**Negativo**
n	29	111
Valor Mínimo	0,0	0,0
Percentil 25%	0,0	6,2
Mediana	3,1	8,0
Percentil 75%	4,1	9,3
Valor Máximo	28,2	8,6

Teste de Mann-Whitney – Valor de p<0,0001

Em análise comparativa entre os quatro grupos de pacientes, observou-se que o grupo das portadoras de HPV genital e oral concomitantemente apresentou níveis de IgA secretória mais baixos (mediana=2,5) (média=2,3), em relação aos demais grupos analisados. O grupo das pacientes não portadoras do vírus apresentou os níveis mais altos de IgAs total (mediana= 8,4) (média=9,0). O grupo das pacientes portadoras de HPV genital e não portadoras de HPV oral apresentaram níveis de IgA secretória superiores (mediana=6,4) (média =6,8) ao grupo daquelas não portadoras de HPV genital e portadora de HPV oral (mediana = 3,2) (média=4,5) (p< 0,0001). Como as diferenças entre as médias

foram consideradas estatisticamente significantes, utilizamos o Teste de Dunn para comparação duas a duas. (Tabela 7).

TABELA 7

Comparação dos níveis de IgAs salivar entre os grupos : HPV genital e oral

Estatísticas	Grupos				Valor p
	I	II	III	IV	
n	67	44	3	26	<0,0001
Média	9,0	6,8	4,5	2,3	
Desvio padrão	4,0	3,9	3,6	1,9	
Valor Mínimo	0,0	0,0	1,8	0,0	
Percentil 25%	6,9	4,45	1,8	0,0	
Mediana	8,4	6,4	3,2	2,5	
Percentil 75%	10,1	8,45	8,6	4,1	
Valor Máximo	28,2	17,0	8,6	5,9	

Teste de Kruskal Wallis

Grupo I HPV genital negativo / HPV oral negativo
Grupo II Lesão HPV genital positivo / HPV oral negativo
Grupo III HPV genital negativo /HPV oral positivo
Grupo IV Lesão HPV genital positivo / HPV oral positivo

Grupos com diferenças significativas (Teste de Dunn p < 0.05)

P < 0.05	
I	II
I	III
I	IV

Comparando os grupos de mulheres fumantes com aquelas portadoras de HPV oral observaram-se também diferenças significativas. As pacientes do grupo I (não portadoras de HPV oral e não fumantes) apresentaram níveis de

média (8,5) e mediana (8,1) de IgA secretória bastante superiores aos demais grupos (II,III e IV) (Tabela 8).

TABELA 8

Comparação dos níveis de IgAs salivar entre os grupos : HPV oral e tabagismo

Estatísticas	Grupos				Valor p
	I	II	III	IV	
n	83	28	17	12	<0,0001
Média	8,5	6,8	2,8	2,2	
Desvio padrão	3,9	4,4	1,9	2,5	
Valor Mínimo	0,0	0,0	0,0	0,0	
Percentil 25%	6,5	3,8	1,8	0,0	
Mediana	8,1	6,4	3,2	2,0	
Percentil 75%	9,3	8,6	4,3	3,2	
Valor Máximo	28,2	17,0	6,0	8,6	

Teste de Kruskal Wallis

Grupo I HPV oral PCR –negativo /não fumante
Grupo II HPV oral PCR -negativo /fumante
Grupo III HPV oral PCR -positivo /não fumante
Grupo IV HPV oral PCR -positivo /fumante

Grupos com diferenças significativas (Teste de Dunn p < 0.05)

P < 0.05	
I	II
I	III
I	IV

Estudando-se simultaneamente as mulheres com positividade para HPV genital, oral e tabagismo, observou-se que pacientes não portadoras de HPV genital, oral e não fumantes apresentaram níveis de IgAs salivar total, média (9.0) e

mediana (8.4), superiores aos demais grupos. O hábito de fumar por si só, como a presença do HPV, foi indutor de menores níveis de IgAs salivar total (Tabela 9).

TABELA 9

Comparação dos níveis de IgAs entre os grupo: HPV genital, oral e tabagismo

Estatísticas	Grupos								Valor p
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
n	56	11	2	1	26	18	16	10	<0,0001
Média	9,1	8,4	5,9	1,8	7,6	5,6	2,9	1,4	
Desvio padrão	4,1	3,5	3,8	-	3,2	4,5	1,9	1,6	
Valor Mínimo	2,3	0,0	3,2	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
Percentil 25%	6,75	7,5	3,2	-	6,2	3,2	0,9	0,0	
Mediana	8,4	8,4	5,9	1,8	7,8	5,1	3,4	1,0	
Percentil 75%	9,6	10,1	8,6	-	9,1	6,5	4,35	3,2	
Valor Máximo	28,2	13,8	8,6	1,8	15,6	17,0	5,9	4,1	

Teste de Kruskal Wallis

Grupo I	HPV genital negativo	HPV oral PCR –negativo	Não fumante
Grupo II	HPV genital negativo	HPV oral PCR –negativo	Fumante
Grupo III	HPV genital negativo	HPV oral PCR –positivo	Não fumante
Grupo IV	HPV genital negativo	HPV oral PCR –positivo	Fumante
Grupo V	Lesão genital HPV +	HPV oral PCR –negativo	Não fumante
Grupo VI	Lesão genital HPV +	HPV oral PCR –negativo	Fumante
Grupo VII	Lesão genital HPV +	HPV oral PCR –positivo	Não fumante
Grupo VIII	Lesão genital HPV +	HPV oral PCR –positivo	Fumante

Grupos com diferenças significativas (Teste de Dunn p < 0.05)

P < 0.05	
I	II
I	III
I	IV
I	V
I	VI
I	VII
I	VIII

Na regressão logística multivariada, tanto no grupo de mulheres portadoras de lesões genitais induzidas pelo HPV (tabela 10), como no grupo das não portadoras (tabela 11), houve uma forte associação entre baixos níveis de IgAs e a presença do Papilomavírus Humano na cavidade oral (OR = 43,7 - IC: 5.4 a 354,1) e (OR = 17,1 - IC : 1,4 a 214,1) respectivamente. As demais variáveis; tabagismo, idade e número de parceiros sexuais não apresentaram essa associação.

TABELA 10

Avaliação do Odds ratio bruto e ajustado para HPV oral positivo considerando todas as variáveis com valores de *p* significativos para a população que possui hpv genital positivo

Características	HPV Oral				OR Bruto	OR Ajustado
	Positivo		Negativo			
	n	%	n	%		
Tabag						
Sim	10	38,5	18	40,9	0,9 (0,3 a 2,4)	0,8 (0,1 a 8,8)
Não	16	61,5	26	59,1	Ref.	Ref.
IgA						
< 5,8	25	96,2	16	36,4	43,7 (5,4 a 354,1)	81,5 (6,9 a 975,6)
> 5,8	1	3,8	28	63,6	Ref.	Ref.
Sex. or. Doad						
Sim	16	61,5	27	61,4	1,01 (0,37 a 2,73)	não calculável
Não	10	38,5	17	38,6	Ref.	Ref.
Sex. or. Rec.						
Sim	16	57,7	27	61,4	0,86 (0,32 a 2,30)	não calculável
Não	10	42,3	17	38,6	Ref.	Ref.

	Méd	Desv	Median	Méd	Desv	Median		
Idade	27,2	6,8	27	27,4	8,3	25	1,00 (0,94 a 1,06)	1,02 (0,91 a 1,14)
Cig/dia	6,3	10,1	0	6,9	9,8	0	0,99 (0,90 a 1,05)	0,95 (0,85 a 1,11)
N. parc	9,0	5,7	8	8,1	5,4	8	1,04 (0,98 a 1,13)	1,06 (0,94 a 1,20)

TABELA 11

Avaliação do Odds ratio bruto e ajustado para HPV oral positivo considerando todas as variáveis com valores de *p* significativos para a população que possui hpv genital negativo

Características	HPV Oral				OR Bruto	OR Ajustado
	Positivo		Negativo			
	n	%	n	%		
Tabag						
Sim	2	66,7	11	1,6	10,2 (0,8 a 122,3)	
Não	1	33,3	56	98,4	Ref.	
IgA						
< 5,8	2	66,7	7	36,4	17,1 (1,4 a 214,1)	
> 5,8	1	33,3	60	63,6	Ref.	
Sex. or. Doad						
Sim	1	33,3	32	47,8	0,55 (0,05 a 6,32)	
Não	2	66,7	35	52,2	Ref.	
Sex. or. Rec.						
Sim	1	33,3	32	47,8	0,55 (0,05 a 6,32)	
Não	2	66,7	35	52,2	Ref.	

	Méd	Desv	Median	Méd	Desv	Median	
Idade	29,8	7,0	28	32,1	7,3	3,2	0,92 (0,77 a 1,09)
Cig/dia	3,3	7,1	0	2,1	5,6	0	1,20 (0,99 a 1,27)
N. parc	7,9	5,4	8	8,7	5,9	8	1,17(0,99 a 1,39)

Da mesma forma, ao se analisar os níveis de IgAs salivar em mulheres portadoras de lesões genitais induzidas pelo HPV (tabela 12) e em mulheres não portadoras (tabela 13), houve associação significativa apenas em relação a

presença do DNA-HPV na cavidade oral. Todas as demais variáveis não estiveram associadas a níveis baixos de IgAs salivar total numa análise de regressão multivariada. (OR = 43,70 - IC: 5,04 a 354,73) e (OR = 17,14 - IC: 1,37 a 213,98), respectivamente.

TABELA 12

Avaliação do Odds ratio bruto e ajustado para os níveis baixos de IgAs considerando todas as variáveis com valores de p significativos para a população que possui hpv genital positivo

Características	Níveis de IgA secretória				OR Bruto	OR Ajustado
	Baixo		Alto			
	n	%	n	%		
HPV oral						
Sim	25	61,0	1	3,4	43,70 (5,04 a 354,73)	não calculável
Não	16	39,0	28	96,6	Ref.	Ref.
Tabag						
Sim	27	42,2	12	30,8	1,64 (0,71 a 3,8)	2,05 (0,26 a 16,8)
Não	37	57,8	27	69,2	Ref.	Ref.
Sex. or. Doad						
Sim	39	60,9	24	61,5	0,98 (0,43 a 2,21)	não calculável
Não	25	39,1	15	38,5	Ref.	Ref.
Sex. or. Rec.						
Sim	39	60,9	25	64,1	0,87 (0,38 a 1,99)	não calculável
Não	25	30,1	14	35,9	Ref.	Ref.

	Méd	Desv	Median	Méd	Desv	Median		
Idade	27,4	7,7	25	26,5	8,5	25	1,0 (0,96 a 1,0)	0,94 (0,83 a 1,0)
Cig/dia	7,1	10,0	0	5,1	8,8	0	1,02 (0,96 a 1,7)	1,06 (0,95 a 1,2)
Rel/m	8,3	5,3	8	9,4	6,0	8	0,97 (0,9 a 1,0)	0,88 (0,78 a 1,0)

TABELA 13

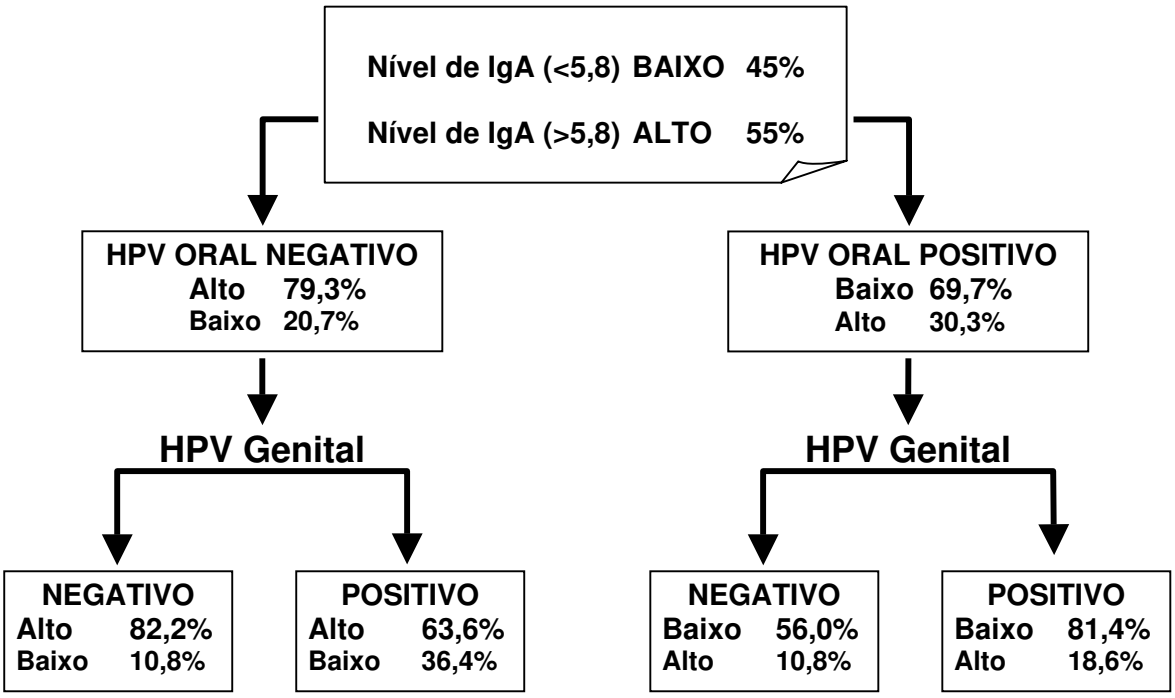
Avaliação do Odds ratio bruto e ajustado para os níveis baixos de IgAs considerando todas as variáveis com valores de p significativos para a população que possui hpv genital negativo

Características	Níveis de IgA secretória				OR Bruto	OR Ajustado
	Baixo		Alto			
	n	%	n	%		
HPV oral						
Sim	2	22,2	1	1,6	17,14 (1,37 a 213,98)	29,8 (0,97 a 882,5)
Não	7	77,8	60	98,4	Ref.	Ref.
Tabag						
Sim	9	25,7	67	81,7	1,54 (0,60 a 3,97)	0,36 (0,00 a 36,82)
Não	26	74,3	15	18,3	Ref.	Ref.
Sex. or. Doad						
Sim	17	48,6	36	43,9	0,95 (0,02 a 55,1)	0,95 (0,02 a 55,1)
Não	18	51,4	46	56,1	Ref.	Ref.
Sex. or. Rec.						
Sim	17	48,6	36	43,9	0,72 (0,01 a 43,34)	0,72 (0,01 a 43,34)
Não	18	51,4	46	56,1	Ref.	Ref.

	Méd	Desv	Median	Méd	Desv	Median		
Idade	27,4	7,7	25	26,5	8,5	25	1,0 (0,96 a 1,0)	0,94 (0,83 a 1,0)
Cig/dia	7,1	10,0	0	5,1	8,8	0	1,02 (0,96 a 1,7)	1,06 (0,95 a 1,2)
Rel/m	8,3	5,3	8	9,4	6,0	8	0,97 (0,9 a 1,0)	0,88 (0,78 a 1,0)

Para melhor visualização dos riscos da presença do HPV oral e de níveis baixos de IgAs salivar total, construiu-se uma “árvore de decisão” (técnica baseada em valores de Qui-quadrado , de forma multivariada). Observou-se que o fator mais significativo na determinação de baixos níveis de IgAs salivar, foi à detecção do

HPV na cavidade oral, seguida da presença de lesões induzidas pelo HPV nos genitais (Gráfico 1).



HPV oral negativo ➔ 3,83 vezes a chance de ter IgAs alto

HPV oral negativo + HPV genital negativo ➔ 8,25 vezes a chance de ter IgAs alto

HPV oral negativo + HPV genital positivo ➔ 1,74 vez a chance de ter IgAs alto

HPV oral positivo ➔ 2,3 vezes a chance de ter IgAs baixo

HPV oral positivo + HPV genital positivo ➔ 4,37 vezes a chance de ter IgAs baixo

HPV oral positivo + HPV genital negativo ➔ 1,27 vez a chance de ter IgAs baixo

Fluxograma 1. *Árvore de decisão para determinação dos níveis de IgAs (BRIEMAN ET et al., 1984).*

5. Discussão

O Papilomavírus Humano não se limita, estritamente, aos órgãos genitais, podendo-se estender a sítios extragenitais, em especial, as mucosas orais (SYRJÄNEN, 1997; WIELAND e PFISTER, 1997). No presente estudo, foi observado que o DNA-HPV esteve mais prevalente na cavidade oral de mulheres com lesões HPV induzidas nos genitais, que no grupo das não portadoras do vírus na região genital (37,1% vs. 4,3%).

Após ter sido realizada reações de PCR no material proveniente da cavidade oral de mulheres portadoras e não portadoras de HPV genital, foram identificadas 29 (20,7%) delas com PCR positivo e 111 (79,3%) negativo para HPV na orofaringe. Destas, 26 (37,1%) estiveram presentes no grupo das mulheres portadoras de HPV genital e apenas três (4,3%) delas, estiveram no grupo das não portadoras. Em trabalhos anteriores, foram observadas prevalências variáveis. GIRALDO et al. (1996), observaram em esfregaço da cavidade oral, alterações citológicas sugestivas de infecção pelo HPV em 6% das mulheres portadoras de HPV genital. Utilizando método mais sensível (PCR), TERAI et al.

(1999) observaram uma alta prevalência (56,7%) de HPV na cavidade oral de adultos, quando investigou homens e mulheres. Acreditamos que estas diferenças possam ser explicadas não só pela sensibilidade do método utilizado na detecção do HPV, como também pela população na qual foi pesquisado o vírus.

As mucosas orais e genitais apresentam grandes semelhanças, podemos sugerir que ambas estejam integradas em um sistema imune único específico de defesa (MALT).

Contudo, de posse apenas do exame citológico e/ou histológico da mulher portadora de HPV genital, é impossível predizer ou determinar, se essa mulher possui o vírus em outras localizações e se esta, infecção a distância pode interferir na evolução da doença, favorecendo a incorporação do HPV no núcleo celular e conseqüentemente, evolução para as displasias. Da mesma forma, o conhecimento da presença de uma infecção (HPV) à distância poderia vir a se tornar talvez um importante fator prognóstico de evolução para as neoplasias ou mesmo, eventualmente, de regressão nos casos ausentes.

Pode-se neste estudo, demonstrar que mulheres com lesões HPV induzidas nos genitais apresentaram níveis mais baixos de IgAs na cavidade oral e que houve uma tendência de aumentar este déficit quando o HPV também esteve presente na mucosa oral.

Em uma análise primária, existe uma tendência a se considerar que poderia haver uma contaminação da região genital para a mucosa oral. Contudo, ao se observar que os resultados apontam para o fato de que a prática de sexo oral

não exerceu qualquer influência na presença do HPV na mucosa oral, pode-se supor que talvez a base de todo o processo de instalação do HPV, seja na região genital, seja na cavidade oral, esteja na dependência intrínseca do hospedeiro de secretar IgA nas mucosas.

No nosso estudo, a mediana dos níveis de IgA secretória salivar total detectado na cavidade oral, foram, significativamente, inferiores nas mulheres portadoras de HPV genital, em relação ao grupo de não portadoras. A mediana dos níveis de IgAs total, detectadas na cavidade oral das mulheres com PCR positivo para HPV, foram ainda mais reduzidos, em relação às mulheres com PCR negativo para HPV na cavidade oral.

A propriedade antiinflamatória da IgAs, de grande importância na manutenção da integridade das mucosas, exercendo uma barreira entre os tecidos do hospedeiro e os microorganismos patogênicos, talvez proteja as mulheres da Infeção pelo HPV (RUSSEL, 1999).

Acreditamos, que níveis adequados de IgA secretória total possam exercer alguma proteção contra a infecção induzida pelo HPV nas diversas mucosas, apesar de saber que a imunidade celular mediada, seja essencial na contenção da infecção viral.

Em análise comparativa, classificamos as mulheres de acordo com as características de ser portadora ou não de lesões HPV induzidas nos genitais e de ser detentora ou não do DNA-HPV na cavidade oral, categorizando-as em quatro classes: as portadoras de HPV genital e oral, simultaneamente, as portadoras

de HPV genital e não portadoras de HPV oral, as portadoras de HPV oral e não portadoras de HPV genital e aquelas que não apresentavam o vírus. As mulheres que apresentavam o HPV simultaneamente na cavidade oral e nos genitais foram as que apresentaram níveis de IgAs mais baixos, as mulheres portadoras de HPV genital e não portadoras de HPV oral, apresentaram níveis de IgA secretória superiores aquelas não portadoras de HPV genital e portadoras de HPV oral e as mulheres não portadoras do vírus, apresentaram os níveis mais altos de IgAs total.

Reiteramos, que as mucosas genitais e orais estão integradas em um sistema único de defesa (MALT) (ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003), e a deficiência de IgAs salivar primária ou induzida pela presença do HPV na genitália, talvez possa se estender às mucosas orais. Acreditamos que esses níveis de IgAs tão desiguais possam ser explicados por outras particularidades inerentes a essa imunoglobulina muito especial.

Na vigência de infecção; a IgA secretória inibe a aderência de microorganismos patogênicos à parede das mucosas, possuindo ainda, habilidade de aglutinar e interferir com a mobilidade das bactérias, neutralizando seus produtos EGMOND et al., (2001).

Outros mecanismos incluem eliminação de antígenos da lâmina própria e a neutralização de vírus intracelulares mediante mecanismo de transcitose. A IgAs possibilita a neutralização de vírus intracelulares, onde usualmente os anticorpos oferecem pouca proteção contra patógenos intracelulares (EGMOND et al., 2001)

(Figura 1). O HPV por se tratar de um vírus de localização predominantemente intracelular, deve ser alvo constante da ação da IgA secretória nas mucosas

O tabagismo verificado nas 220 mulheres estudadas, em análise inicial, pareceu interferir nos níveis de IgAs salivar total reduzindo-os significativamente. A mediana das mulheres fumantes mostrou valores inferiores ao das mulheres não fumantes. Comparando ainda os grupos de mulheres fumantes com aquelas portadoras de HPV oral, observaram-se, também, diferenças significativas. As mulheres não portadoras de HPV oral e não fumantes apresentaram a mediana dos níveis de IgA secretória bastante superiores as fumantes não portadoras de HPV oral, as portadoras de HPV oral não fumantes e as portadoras de HPV oral fumantes.

Utilizamos o Teste de Kruskal-Wallis para estudamos concomitantemente as mulheres com positividade para HPV genital, oral e tabagismo, observamos que as mulheres não portadoras de HPV genital, oral e não fumantes apresentaram níveis de IgAs salivar total, mediana superiores aos demais grupos.

Como as medianas foram consideradas estatisticamente significantes, realizamos o Teste de Dunn para comparação duas a duas, confirmando essas diferenças. O hábito de fumar, tal como a presença do HPV, também foi indutor de menores níveis de IgAs salivar total.

Ao realizar a análise de regressão multivariada, para fixação dos fatores relevantes na determinação da presença do HPV na orofaringe eliminando-se a influência das demais variáveis, apenas a presença de baixos níveis de IgAs foi significativo. As demais variáveis, tais como idade, sexo oral e número de parceiros

e tabagismo, por estar muito associado à presença de HPV genital, não se mostrou significativo.

Embora, acreditamos ainda que o tabagismo, historicamente relacionado a neoplasias e lesões pré-neoplásicas induzidas pelo HPV (BRINTON et al., 1992; GRAM et al., 1992; SARANATH et al., 1999), possa ser cofator para colonização das mucosas pelo Papilomavírus Humano, neste estudo não se pôde observar esta influência.

As mulheres jovens estiveram aleatoriamente mais presentes no grupo de mulheres portadoras de HPV genital, associada ao número de relações sexuais, sexo oral e tabagismo, o que não foi significativo quando efetuada a regressão logística. Estes fatos talvez possam ser explicados pela prevalência por faixa etária.

A infecção pelo HPV pode-se suceder ao menor traumatismo das células escamosas expostas ao vírus. Considerando que diversos tipos de HPV são transmitidos através do contato sexual, a presença de anticorpos neutralizadores, dentro das células basais e nas secreções das mucosas, no momento da infecção, poderia prevenir a entrada do vírus e limitar sua transmissão (BALMELLI et al., 1998; SCHRECKENBERGER et al., 2000).

Acreditamos na importância da imunidade humoral, em especial na imunidade de mucosas. O que contraria diversos estudos importantes (CLERICI et al., 1997; GRASSEGGER et al., 1997; TARTOUR et al., 1998) que propõem um modelo dicotômico (Th1/Th2) de resposta imune, para explicar a história natural das infecções pelo Papilomavírus Humano, onde a imunidade celular

mediada exerceria um papel único preponderante e a presença única de citocinas pró-inflamatórias, principalmente o IFN-γ, determinaria a evolução das infecções induzidas pelo HPV, colocando a imunidade celular como a única responsável pela erradicação do HPV.

Em um importante estudo de coorte, realizado com profissionais do sexo, no Quênia, observou-se que 75% das mulheres, imunologicamente, resistentes ao HIV, apresentaram IgA secretória específica contra o vírus no trato genital, enquanto, apenas, 26% das mulheres infectadas pelo vírus apresentaram esse anticorpo (KAUL et al., 1999; KAUL et al.,2001).

Constatou-se, em estudos posteriores, que nas mulheres não infectadas, continuamente, expostas ao HIV, a IgA secretória específica não somente, neutraliza o vírus nas secreções, como também induz a transcitose, na qual esse anticorpo bloqueia os antígenos virais, interferindo com a síntese viral, neutralizando os vírus intracelulares (DEVITO et al., 2000a; DEVITO et al., 2000b). Concluindo, a resposta imune celular isolada não parece ser o único meio de defesa do hospedeiro contra a infecção pelo HPV.

Em modelos experimentais, a presença de anticorpos neutralizadores do tipo IgA em mucosas e nas secreções, previne a infecção pelo HPV (PARR e PARR, 1985; THAPAR et al., 1990; BREITBURD et al., 1995; SUZICH et al., 1995; BURROWS e COOPER, 1997; BALMELLI et al., 1998). A IgAs pode interceptar as partículas virais, interferir na replicação e facilitar a sua excreção para o lúmen (BOMSEL et. al., 1998; KAWANA, et. al., 2001).

Em um estudo recente, com coelhos, foi investigado, se a vacinação com o plasmídeo do HPV6 pelas vias (vaginal, retal ou sérica), induziria a uma resposta imune nas mucosas. Observou-se que a imunização, pelas vias vaginal e retal induziu à produção de anticorpos específicos do tipo IgA, impedindo ligação do HPV VLPs com as células sanguíneas, demonstrando a ação neutralizadora desses anticorpos. Entretanto pela via sérica, não houve efetividade da imunização (SCHRECKENBERGER et al., 2000). A resistência das mucosas às infecções tem sido fortemente, associada à presença IgA, no sítio da infecção (MILLS et al., 1971; YAN et al., 1996; KAWANA, et. al., 2003).

Neste estudo, constatamos que os indivíduos que tiveram níveis mais baixos de IgA secretória total, mostraram-se, significativamente, mais susceptíveis à colonização das mucosas genitais e orais pelo Papilomavírus Humano.

Podemos inferir que esses indivíduos poderiam apresentar deficiência de IgA secretória total por causas diversas (sistêmicas ou locais; congênitas ou adquiridas; persistentes ou transitórias), às quais poderiam predispor especificamente, essas, mulheres à infecção pelo HPV.

Devemos considerar, para as portadoras de HPV oral e/ou genital, que essas, embora sejam imunocompetentes de forma sistêmica, possam apresentar deficiência imunológica específica para alguns agentes infecciosos virais do tipo HPV, ou não virais. É possível imaginar que indivíduos infectados com vírus de alto risco e com resposta imune específica mais adequada para o HPV tenham

uma evolução da doença mais favorável do que aqueles com infecção com vírus de baixo risco, mas sem resposta imune apropriada.

Acreditamos que, sendo a mucosa oral muito semelhante à mucosa vaginal, uma vez estabelecido valores e técnicas de mensuração dessa importante imunoglobulina, poderemos utilizá-la como parâmetro de avaliação da imunidade das mucosas, fornecendo subsídios para estimular a resposta imune específica e a produção de IgAs contra o HPV e outras doenças sexualmente transmissíveis.

6. Conclusões

1. A prevalência do Papillomavírus humano foi, significativamente, maior na cavidade oral das pacientes portadoras de lesões Induzidas pelo HPV nos genitais (37,1%) do que nas não portadoras (4,3%).

2. Os níveis salivares de IgA secretória total foram, significativamente inferiores nas pacientes portadoras da infecção pelo HPV em relação ao grupo das não portadoras, tanto na cavidade oral (3,1 vs 8,0), como nos genitais (4,4 vs 7,7).

3. A prática de sexo oral e o tabagismo não estiveram relacionados à presença do DNA-HPV na cavidade oral e não influenciaram nos níveis salivares de IgA secretória total.

7. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4ª. ed., California: WB Saunders; 2003. 544p.

ALTMAN, D.G., **Practical statistics for medical research**. London: Mosby International; 1991. 383p.

ANDERSON, A.; RYLANDER, E.; LARSSON, B.; STRND, A.; SILFVERSVARD, C.; WILANDER, E. The role of Human Papillomavirus in cervical carcinogenesis. ***Eur J Cancer***, 37:246-50, 2001.

ANTEYI, K.O.; THACHER, T.D.; YOHANNA, S.; IDOKO, J.L. Oral manifestations of HIV-AIDS in Nigerian patients. ***Int J STD AIDS***, 14(6):395-8, 2003.

BALMELLI, C.: RODEN, R.; POTTS, A.; SCHILLER, J.; NARDELLI-HAEFLINGER, D. G. P. Nasal immunization of mice with Human Papillomavirus Type 16 Virus-like Particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. **J Virol**, 72(10):8220-9, 1998.

BENTON, C.; SHAIDULAH, H.; HUNTER, J.A. Human Papillomavirus in the immunosuppressed. ***Papillomavirus Rep***, 3:23-6, 1992.

BESSEN, D.; FISCHETTI, V.A. Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin A. ***J Exp Med***, 6(1):1945-50, 1989.

BOMSEL, M.; HEYMAN, M.; HOCINI, H.; LAGAYE, S.; BELEC, L.; DUPONT, C. et al. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein IgA or IgM. ***Immunity***, 9(2):277-87, 1998.

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD, E.S.; FARSTAD, I.M.; JAHNSEN, F.L.; JOHANSEN, F.; NILSEN, E.M. et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartiments? **Immunol Today**, 20(3):141-51, 1999.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n°196/96 Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. **Inf Epidem do SUS-Brasil**, v. 5, p. 2, 1996.

BREITBURD, F; KIRNBAUER, R; HUBBERT, N.L; NONNENMACHER, B; TRINDINH-DESMARQUET, C; ORTH, G. et al. Immunization with virus like particles from cottontail rabbit Papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. ***J Virol***, 69(6):3959-63, 1995.

BRIEMAN, L.; FRIEDMAN, J.H.; OLSHEN, R.A.; STONE, C.J. **Classification and regression trees**. California: Wad worth & Brooks/Cole Advanced Books; 1984. 393p.

BRINTON, L.A.; SCHAIRER, C.; HAENSZEL, W.; STOLLEY, P.; LEHMAN, H.F.; LEVINE, R. et al. Cigarette smoking and invasive cervical cancer. ***JAMA***, 255:528, 1992.

BURROWS, P.D.; COOPER, M.D. IgA deficiency. ***Adv Immunol***, 65:245-76, 1997.

CHILDERS, N.K.; BRUCE, M.G.; McGHEE, J.R. Molecular mechanisms of immunoglobulin a defense. ***Ann Rev Microbiol***, 43:503-36, 1989.

CHIRGWIN, K.D.; FELDMAN, J.; AUGENBRAUN, M.; LANDESMAN, S.; MINKOFF, H. Incidence of venereal warts in human immunodeficiency virus-infected and uninfected women. ***J Infect Dis***,172(1):235-8, 1995.

CLERICI, M.; MEROLA, M.; FERRARIO, E.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.; STEFANON, B. et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with Human Papillomavirus infection. ***J Natl Cancer Inst***, 89:245-50, 1997.

DERCHAIN, S.F.; ROTELI-MARTINS, C.M.; SYRJANEM, K.J.; ABREU, H.J.de; MARTINEZ, E.Z.; ALVES, V.A. Association of oncogenic Human Papillomavirus DNA with high grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of cigarette smoking. ***Sex Transm Infect***,75(6):466-8, 1999.

DEVITO, C.; HINKULA, J.; KAUL, R.; LOPALCO, L.; BWAYO, J.J.; PLUMMER, F. et al.Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. ***AIDS***, 8(13):1917-20, 2000a.

DEVITO, C.; BROLIDEN, K.; KAUL, R.; SVENSSON, L.; JOHANSEN, K.; KIAMA, P.; KIMANI, J. et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. ***J Immunol***, 1(9):5170-6, 2000b.

EGMOND, M. V.; DAMEN, C.A.; SPRIEL, A.B.V.; VIDARSSON, G.; GARDEREN, V.E.; WINKEL, J.G V. de. IgA and IgA Fc receptor. ***Trends Immumol***, 22(4):205-11, 2001.

EPI INFO. version 6.04b. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1997. (1 CD-room). Windows 95/98.

GIRALDO, P.C.; SIMÕES, J.A.; RIBEIRO-FILHO, A.D.; TAMBASCIA, J.K. Avaliação citológica da orofaringe de mulheres portadoras do HPV genital. ***RBGO***, 18(9):737-42, 1996.

GRAM, I.T.; AUSTIN, H.; STALSBERG, H. Cigarette smoking and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia grade III, and cancer of the cervix. ***Am J Epidemiol***, 135:341-6, 1992.

GRASSEGGER, A.; ROLLINGER-HOLZINGER, I.; ZELGER, B.W. H.; HEIM, K.; ZWIERZINA, H.; FRITSCH, P. O. et al. Spontaneous or interferon-γ-induced T-cell infiltration, HLA-DR and ICAM-1 expression in genitoanal warts are associated with Th1 or mixed Th1/Th2 cytokine mRNA expression profiles. ***Arch Dermat Res***, 289:243-50, 1997.

GORCZYNSKI, R.; STANLEY, J. **Imunologia clínica**. Rio de Janeiro: Reichmann; 2001. 355p.

HAUSEN, H.Z Papillomaviruses in human genital cancer. ***Med Oncol Tumor***, 4:187-92, 1986.

HAUSEN, H. Z. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. ***J Natl Cancer Inst***, 3(9):690-5, 1997

HERRINGTON, C.S.; MCGEE, J.O.D. Determination of genital Human Papillomavirus infection by consensus PCR amplification. In: BAUER, H.M.; GREER, C.E.; MANOS, M.M. **Diagnostic molecular pathology**. 6ª.ed., Oxford: Oxford Press; 1992. 218 p.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. New York: Wiley, 1989. 307p.

HÖPFL, R.; CHRISTENSEN, N.D.; ANGELL, M. G.; KREIDER, J.W. Leukocyte proliferation *in vitro* against cottontail rabbit Papillomavirus in rabbits with persisting papillomas/cancer or after regression. ***Arch Derm Res***, 287:652-8, 1995.

HOWLEY, P.M. Role of the human Papillomavirus in human cancer. ***Cancer Res****,* 51:5019-22, 1991.

KAUL, R.; TRABATTONI, D.; BWAYO, J.J.; ARIENTI, D.; ZAGLIANI, A.; MWANGI, F.M. et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. ***AIDS***, 4(1):23-9, 1999.

KAUL, R.; PLUMMER, F.A.; CLERICI, M.; BOMSEL, M.; LOPALCO, L; BROLIDEN, K. Mucosal IgA in exposed, uninfected subjects: evidence for a role in protection against HIV infection. ***AIDS***, 15(3):431-2, 2001.

KAWANA, K.; KAWANA, Y.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; YOSHIIKE, K.; KANDA, T. Nasal immunization of mice with peptide having a cross-neutralization epitope on minor capsid protein L2 of human Papillomavirus type 16 elicit systemic and mucosal antibodies. ***Vaccine***, 8(19):1496-502, 2001.

KAWANA, K; YASUGI, T; YOSHIKAWA, H; KAWANA, Y; MATSUMOTO, K; NAKAGAWA, S. et al. Evidence for the presence of neutralizing antibodies against Human Papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. ***Am J Perinatol***, 20(1):11-6, 2003

KELLOKOSKI, J.; SYRJÄNEN, S.; CHANG, F.; YLISKOSKI, M.; SYRJÄNEN, K. Sothern blot hybridization and PCR in detection of oral human Papillomavirus (HPV) infections in women with genital Papillomavirus infections. ***U Oral Pathol Med***, 21:459-64, 1992.

LORINCZ, A.T.; REID, R.; JENSON, A.B.; GREEMBERG, M.D.; LANCASTER, W.; KURMAN, R.J. Human Papillomavirus infection of the cervix: relative risk association of 15 common anogenital types. ***Obstet Gynecol***, 79:328-37, 1992.

MARAIS, D.J.; BEST, J.M.; ROSE, R.C.; KEATING, P.; SOETERS, R.; DENNY, L. et al. Oral antibodies to Human Papillomavirus type 16 in women with cervical neoplasia. ***J Med Virol***, 65(1):149-54, 2001.

McGUIRK, P.; MILLS, K.H.C. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. ***Trends Immumol***, 23(9):205-11, 2002.

MEDRONHO, R. A.; CARVALHO, D. M.; BLOCH K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. 493p.

MILLS, J.T.; VAN, K.J.; WRIGHT, P.F.; CHANCK, R.M. Experimental respiratory syncytial virus infection of adults: possible mechanisms of resistance to infection and illness. ***J Immunology***, 107:123-30, 1971.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. ***J Immunol***, 136:2348-57, 1986.

PARR, M.B.; PARR, E.L. Immunohistochemical localization of immunoglobulins A, G, and M in the mouse female genital tract. ***J Reprod Fertil***, 74:361-70, 1985.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6ª. ed., São Paulo: Manole; 2003. 481p.

RUSSEL, M.W.; MESTECKY, J. Indution of the mucosal immune. ***Rev Infect Dis***, 10(2):440-6, 1988.

RUSSEL, M.W. IgA as an anti-inflammatory regulator of immunity. ***Oral Dis***, 5:55-67, 1999.

RUSSEL, M.W.; MESTECKY, J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. ***Microbes Infect***, 4(6):667-77, 2002.

SARANATH, D.; TANDLE, AT. DEDHIA, P.M.; BORGES, AM.; PARIKH, D.; SANGHAVI, V. et. al. p53 inactivation chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. ***Oral Oncol***, 35:242-50, 1999.

SCHRECKENBERGER, P.; SETHUPATHI, A.; KANJANAHALUETHAEI, M.; MULLER, M.; ZHOU, J.; GISSMANN, L. et al. Indution of anHPV 6bL1 – specific mucosal IgA response by DNA immunization. ***Vaccine***, 19(2-3):227-33, 2000.

SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A.B. Cel-mediated immune response to Human Papillomavirus infection. ***Clin Diag Lab Immunol*,**. 8(2):209-20, 2001.

SEDLACEK, T.V. Advances in the diagnosis and treatment of Human Papillomavirus infections. ***Clin Obstet Gynecol***, 42(2):206-20, 1999.

SYRJÄNEN, S. Oral cavity and upper respiratory tract: diagnosis and treatment. In: GROSS, G. E.; BARRASSO, R. **Human papilloma virus infection**, Berlin: Wiesbaden, 1997. p.399-412.

SUZICH, J.A.; GHIM, S.J; PALMER-HILL, F.J; WHITE, W.I; TAMURA, J.K; BELL, J.A. Systemic immunization with Papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. ***Proc Natl Acad Sci***, 92(25), p. 11553-11557, dec. 1995.

THAPAR, M.A.; PARR, E.L.; PARR, M.B. Secretory immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral, or vaginal immunization. ***Immunology***, 70:121-5, 1990.

TARTOUR, E.; GEY, A.; SASTRE-GARAU, X.; SURIN, I. L.; MOSSERI, V.; FRIDMAN W.H. Prognostic value of intratumoral vaginal interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. ***J Natl Cancer Inst***, 90:287-94, 1998.

TERAI, M.; HASHIMOTO, K.; YODA, K.; SATA, T. High prevalence of Human Papillomavirus in the normal oral cavity of adults. ***Oral Microbiol Immunol***, 14:.201-15, 1999.

WIELAND, U.; PFISTER, H. Papillomavirus in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role oral. In: GROSS, G.E.; BARRASSO, R. **Human papilloma virus infection.** Berlin: Wiesbaden; 1997. p.399-412.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Declaração de Helsinque, 1996.

YAN, L.; WARD, L.A.; ROSEN, B. I.; TO, T.L.; SAIF, L.J. S. Systemic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. ***J Virol***, 70:3075-83, 1996.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A. – **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4ª ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2002).

9. Anexos

9.1. Anexo 1 - Formulário

1. Idade da paciente _____ anos
2. Cor da paciente: branca parda mestiça amarela negra
3. Até que série completou na escola? _____ série_____ grau
4. A senhora é fumante ? Sim Não
5. Quantos cigarros a senhora fuma por dia?
   Até 5/dia 5-10/dia 10-15/dia 15-20/dia 20-25/dia mais de 25/dia
6. Você usa algum método para evitar filhos? Sim Não passe para 8
7. Qual? _____
8. Quantas vezes ficou grávida? ____ gravidezes, se nenhuma passe para 11.
9. Quantos filhos nasceram vivos? ____ filhos
10. Quantos abortos teve? ____ abortos
11. Com quantos homens você já teve relação? (inclui o parceiro atual) _____
12. Você já teve alguma doença transmitida por relação sexual? Sim Não
13. Qual (is)?_____
14. Você já realizou tratamento para HPV, condiloma ou verrugas genitais? Sim Não
15. Algum parceiro seu tem ou teve o HPV? Sim Não Não sabe
16. Quantas relações sexuais você tem por mês?

IV - Resultado dos exames

- Exame Clínico Ginecológico:

Presença de HPV genital: ( ) Sim ( ) Não

Localização:

Vulva Nº__ Vagina Nº___ Colo Nº___ Ânus Nº___

- Forma de expressão do HPV: ( ) Clínica ( ) Sub-clínica

- Exames Complementares:

1 – Citologia oncológica: ( ) normal ( ) HPV ( ) NIC I ( ) NIC II ( ) NIC III
2 - Colposcopia: ( ) normal ( ) condilomas ( ) ZTA
3 - Histopatológico: ( )HPV presente ( ) HPV ausente
4 - Pesquisa de PCR: ( ) HPV presente ( ) HPV ausente
5 - Níveis de IgA:__mg/dl

9.2. Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Eu, _____idade _____.

residente à _____
na cidade de _____, portadora da identificação: _____, e registrada no Hospital de Clínicas da UNICAMP com o N.º, _____, declaro concordar por minha livre e espontânea vontade em participar desta pesquisa que tem como principal objetivo verificar se existe o vírus do HPV na minha boca Esta pesquisa está sendo realizada pelo Prof. Dr. Paulo César Giraldo e pela Dra. Ana Katherine da Silveira Gonçalves.

Estou sabendo que:

Serei examinada por médico ginecologista do Ambulatório de Infecções Genitais do HC-UNICAMP, apenas uma vez em função da pesquisa, onde será coletado material proveniente da minha vagina para análise das células e proteínas aí contidas, por meio de raspagem suave da parede lateral com swab de Dacrom. Poderei desistir a qualquer momento de participar da presente pesquisa sem prejuízo ao meu atendimento neste Ambulatório agora e no futuro. Nas informações obtidas na pesquisa não serão nunca identificadas pelo meu nome. Serei identificada apenas por um número. Receberei o benefício de orientação para tratamento casos seja diagnosticada alguma doença na vagina. Tenho o direito de receber resposta sobre qualquer dúvida que eu tenha da pesquisa de que estou participando. Qualquer problema que aconteça poderei entrar em contato com o Dr. Paulo César pelo telefone (19) 3788.9306, de segunda ás sextas feiras, no período das 8:00 às 17:00 horas.

Se tiver alguma dúvida ou reclamação sobre como esta pesquisa está sendo realizada, posso entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone (19) 3788.8936.

Campinas, _____/_____/_____

_____

Assinatura da paciente

_____

Assinatura do responsável pela pesquisa