



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EDILSON LEITE DE MOURA

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *TNFA* -308 G>A (rs1800629), *IL-10* -819 C>T (rs1800871) COM A SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS PELO HPV EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE ALAGOAS, BRASIL.

Maceió

2019

EDILSON LEITE DE MOURA

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *TNFA* -308 G>A (rs1800629),
IL-10 -819 C>T (rs1800871) COM A SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER CERVICAL
EM MULHERES INFECTADAS PELO HPV EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO DE ALAGOAS, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Prof.^a. Dr.^a. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Co-orientador: Prof.^a. Dr.^a Karol Fireman de Farias

Maceió

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

M929a Moura, Edilson Leite de.
Análise da associação dos polimorfismos *TNFA* -308 G>A (rs1800629), *IL-10* -819 C>T (rs1800871) com a susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV em uma amostra da população de Alagoas, Brasil / Edilson Leite de Moura. – 2019.
94 f.: il. color.

Orientadora: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo.
Co-orientadora: Karol Fireman de Farias.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal De Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 66-78.
Apêndices: f. 79-84.
Anexos: f. 85-93.

1. *Papillomaviridae* - Mulheres - Alagoas. 2. Polimorfismo de nucleotídeo único. 3. Citocinas. 4. Neoplasia intraepitelial cervical. 5. Exercícios físicos aquáticos. I. Título.

CDU: 578.82/.83



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Edilson Leite de Moura

Análise da associação dos polimorfismos TNFA -308 G>A (rs1800629), IL-10 - 819 C>T (rs1800871) com a susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV em uma amostra da população de Alagoas, Brasil

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 1 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo (Orientador)

Prof.^a Dr.^a Carolinne de Sales Marques - (UFAL - Arapiraca)

Prof.^a Dr.^a Aline Cristine Pereira e Silva - (Faculdade Regional da Bahia (UNIRB))

À Deus, pela sua infinita misericórdia, e que sempre está a frente de todas as minhas lutas e
supre todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, Benedita e Everaldo, meus irmãos, Minha noiva Rebecca e minha Tia Dalva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pelas conquistas até o momento, e por tudo que superei na minha vida. És tu que me estende as mãos nos momentos mais difíceis, me fortalecendo e me tornando capaz de enfrentar todas as barreiras.

Aos meus pais, Benedita e Everaldo, meus irmãos, Elinaíne, Ellydaiane, Evani, Edvânio, Evânia, Evaneide, e todos os demais membros da família, que sempre me apoiaram nos meus estudos e nas decisões tomadas, e foram imprescindíveis para minha formação. Obrigado por tudo.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo, que me acolheu, acreditou no meu potencial e me contemplou com várias oportunidades, que me fez crescer nos aspectos pessoal e profissional. A ti professora, que foi de grande importância na minha formação profissional, meus sinceros agradecimentos, por todo conhecimento passado, dedicação, força, paciência, credibilidade, conselhos, amizade e os constantes incentivos durante a graduação e pós-graduação.

A co-orientadora Prof.^a Dra Msc. Karol Fireman de Farias pelo apoio, confiança, paciência, dedicação, o ensinar, os conselhos, por ter sido uma grande incentivadora na minha formação profissional, e principalmente por sempre acreditar no potencial dos alunos.

A minha noiva Rebecca Stephane Ferreira de Lima, por sempre me ajudar nas atividades acadêmicas, pela o seu companheirismos e amor transmitido durante estes 1 ano e nove meses de relação. A ti meu amor, que me faz feliz e hoje você é o motivo do meu sorriso. Obrigado por sempre me incentivar nos estudos e me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

A minha tia Dalva e minhas primas Camila e Isis a quem eu declaro meu imenso agradecimento por me acolher sempre eu sua casa, me oferecendo conforto, carinho e subsídios para realizar meus estudos.

A Ana Caroline Melo dos Santos, por ter me ajudado nos momentos difíceis, pelo apoio e conhecimento passado, por ter sido uma grande incentivadora na minha formação profissional, e pela grande amizade adquirida.

Ao meu amigo de todas as horas Romilson Damiano Galindo Vonzabo, que sempre me deu força e me apoiou nas decisões tomadas, e contribuiu de forma significativa na minha formação.

A minha amiga Denise Macêdo da Silva, que sempre me ajudou nas atividades acadêmicas, e pela imensa amizade de vários anos, sempre me apoiando nas decisões a ser tomada, e contribuindo de forma positiva na minha formação.

A minha amiga Aline Pereira e Silva, que não mede esforços para me ensinar estatística, que sempre está à disposição para me ajudar nas horas difíceis, pelos conselhos, pelas considerações enriquecedoras feitas na qualificação do meu mestrado, e por aceitar compor a minha banca de defesa do mestrado.

A Prof. Dra. Carolinne de Sales Marques pelas considerações enriquecedoras feitas na qualificação do meu mestrado, pelas contribuições adicionais nos dias de rotina do LABMEG, e por aceitar compor a banca de defesa do meu mestrado.

A todos os meus amigos da Turma Ciências Biológicas 2012.1, que contribuíram de forma direta na minha formação.

Ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas do *Campus* Arapiraca, pelo conhecimento passado e os incentivos durante a graduação.

Ao corpo docente do curso do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo conhecimento passado e os incentivos durante a graduação.

Ao Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer (NPDC), e seus integrantes, como a Dra. Ana Paula e o administrador Arnobio, por fornecer um banco de amostras de mulheres com câncer cervical.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Fraga, por contribuir nos cortes dos blocos de tecidos parafinado.

A profa. Cristiane Nascimento e o prof. Alisson pelos ensinamentos, contribuições no projeto, amizade, conselhos e apoio.

Agradeço a Adriely Ferreira, Barbara Rayssa, Jean Moisés, Alexandre Wendell, Rubens Pereira, Ellyda Costa, Susana Paiva, Everly Meneses, Bruna Brandão, Byhanca, Luana Correia, Thiago, Joyce, Larissa, Israel, Natan, Pedro, Silmara por todo o apoio,

amizade, pelas buscas incessantes dos pacientes, pelas noites de sono em laboratório e pelas conquistas.

Aos profissionais do LABMEG, Ithallo Shatio Besone Tanabe, Diego Siqueira, Elaine de Lima, Abel Lira, pelos ensinamentos e contribuição científica.

Aos meus amigos Pós-graduando, Mayara Rodrigues, Luiz Araújo, Maria Barbosa, Profa. Renise, Eloiza Lira e Victor pelos ensinamentos, viagens divertidas, conselhos e contribuições científicas e apoio.

O impossível
é pra quem não tem um sonho
e não crê que pela fé tudo é capaz

Inalcançável
é pra quem não tem o dom
de transformar desejos em pontes pra chegar

Diga pra vida eu sou mais eu
Diga para o alvo aí vou eu
Flecha veloz nas mãos de Deus
Vai em frente o mundo é seu

Pois é a fé que faz o herói
Olha pra dentro de você
só realiza quem constrói
a gente nasce pra vencer

Imbatível
É quem faz de cada luta
um degrau para as fortalezas alcançar

Invencível
É que nem pensa em desistir
Faz dos espinhos trampolins pra chegar lá

A Fé Faz O Herói, de Jamily.

RESUMO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é considerada a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) mais comum do mundo. Esta infecção representa um significativo problema de saúde pública global, devido ao seu potencial etiológico no desenvolvimento de diversos tipos de cânceres em humanos, tais como o câncer cervical. Variações imunológicas do hospedeiro têm sido associadas a susceptibilidade a Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) e ao câncer cervical. Estas variações imunológicas podem ser atribuídas a Polimorfismos de Nucleotídeos Simples (SNPs) presentes nos genes das citocinas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de polimorfismos presentes nos genes *TNFA* (-308G>A) e *IL-10* (-819C>T) na susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV do agreste alagoano. Trata-se de um estudo do tipo caso controle, envolvendo 45 mulheres diagnosticadas com câncer cervical e HPV positivo e 93 controles clinicamente saudáveis, com resultado citopatológico normal e HPV negativo. A detecção viral foi realizada através da amplificação por nested Reação em Cadeia da Polimerase (nPCR) utilizando os primers MY09/MY11 e GP5+/GP6+ da região L1 do HPV. A análise dos polimorfismos foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real usando sondas TaqMan, através do método de discriminação alélica. Os resultados mostraram que o genótipo -819C/T no modelo codominante ($p=0,035$; OR com 95% CI = 2.52 [1.07-5.97]) e os genótipos -819C/T+TT no modelo dominante ($p=0,037$; OR com 95% CI = 2.41 [1.06-5.50]) do SNP *IL-10* -819C>T foram associados com o aumento do risco para desenvolver câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV. Na meta-análise, o SNP *IL-10* -819C>T mostrou um resultado similar a da população alagoana, onde os genótipos -819C/T+TT no modelo dominante foram identificados como fator de risco para o desenvolvimento de Lesão Intraepitelial Escamosa (SIL) na infecção pelo HPV ($p=0,01$; OR com 95% CI = 1.76 [1.13-2.74]). Não houve associação significativa entre SNP *TNFA* -308G>A e câncer cervical na população de Alagoas. Entretanto, na meta-análise, realizada com outras populações, o genótipo -308G/G no modelo codominante foi associado com efeito protetor para o câncer cervical ($p=0,0009$; OR com 95% CI = 0.79 [0.69-0.91]). Enquanto que os genótipos G/A+A/A no modelo dominante foram associados ao aumento do risco para SIL na infecção pelo HPV ($p=0,04$; OR com 95% CI = 1.69 [1.01-2.82]). Em conclusão, os carreadores do alelo T no SNP *IL-10* -819C>T mostraram aumentar o risco para o câncer cervical na população de Alagoas, Brasil, e que foi corroborado com o resultado da meta-análise de outras populações. O SNP *TNFA* -308G>A não foi associado com o câncer cervical na população alagoana. No entanto, o genótipo -308G/G foi associado a proteção contra o câncer cervical, e os carreadores do alelo A (-308G/A+A/A) foram associados com o aumento do risco para SIL na infecção pelo HPV, na meta-análise de outras populações.

Palavras chaves: Polimorfismo. Citocinas. Câncer cervical. HPV.

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is considered the most common Sexually Transmitted Infection (STI) in the world. This infection represents a significant global public health problem due to its etiological potential in the development of several types of human cancers, such as cervical cancer. Immunological variations of the host have been associated with susceptibility to Cervical Intraepithelial Neoplasms (NIC) and cervical cancer. These immunological variations may be attributed to Simple Nucleotide Polymorphisms (SNPs) present in the cytokine genes. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of polymorphisms present in TNFA (-308G> A) and IL-10 (-819C> T) genes on susceptibility to cervical cancer in HPV-infected women in the Alagoas, Brazil. This is a case-control study involving 45 women diagnosed with cervical cancer and HPV positive, and 93 clinically healthy controls with normal cytopathologic and HPV negative. Viral detection was performed through nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) using the primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ located in L1 region of HPV. Polymorphism analysis was performed using the real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, using TaqMan probes by the allelic discrimination method. The results showed that the C/T genotype in the codominant model ($p = 0.035$, OR with 95% CI = 2.52 [1.07-5.97]) and the -819C/T+TT genotypes in the dominant model ($p = 0.037$; % CI = 2.41 [1.06-5.50]) of IL-10-819C>T SNP were associated with increased risk for developing cervical cancer in HPV-infected women. In the meta-analysis, the IL-10 -819C>T SNP showed a similar result to that of the Alagoana population, on what the -819C/T+TT genotypes in the dominant model were identified as a risk factor for the development of Squamous Intraepithelial Lesion (SIL) in HPV infection ($p = 0.01$, OR at 95% CI = 1.76 [1.13-2.74]). There was no significant association between TNFA -308G>A SNP and cervical cancer in the population of Alagoas. However, in the meta-analysis, performed with other populations, the genotype -308G/G in the codominant model was associated with protective effect for cervical cancer ($p = 0.0009$; OR with 95% CI = 0.79 [0.69-0.91]) . While the G/A+A/A genotypes in the dominant model were associated with increased risk for SIL in HPV infection ($p = 0.04$, OR at 95% CI = 1.69 [1.01-2.82]). In conclusion, carriers of the T allele in the SNP IL-10-819C>T showed increased risk for cervical cancer in the population of Alagoas, Brazil, and that was corroborated with the result meta-analysis of other populations. TNFA -308G>A SNP was no associated with cervical cancer in the Alagoana population. However, the -308G/G genotype was associated with protection against cervical cancer, and carriers of the A allele (-308G/A+A/A) were associated with increased risk for SIL in HPV infection at the meta-analysis of other populations.

Keywords: Polymorphism. Cytokines. Cervical cancer. HPV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História do HPV, câncer cervical e avanços tecnológicos.....	19
Figura 2 - Árvore filogenética representando a sequência de 118 <i>Papillomaviruses</i>	22
Figura 3 - Estrutura morfológica e genômica comum do HPV.....	23
Figura 4 - Proteínas virais expressas em diferentes fases do ciclo de vida normal do HPV ...	27
Figura 5 - História do ciclo patogênico da infecção pelo HPV.....	28
Figura 6 - Histórico natural da infecção pelo HPV	29
Figura 7 - Evolução de lesões intraepitelial escamosa ao câncer de colo de útero.	32
Figura 8 - Estrutura do gene <i>TNFA</i> e a localização de seus polimorfismos principais.	39
Figura 9 - Localização e estrutura do gene <i>IL-10</i> no cromossomo 1, e a identificação dos seus polimorfismos.....	40
Figura 10 - Gel de eletroforese da PCR com os primers β -actina humano para controle interno da detecção do HPV.....	52
Figura 11 - Gel de eletroforese da PCR com primers MY09/11 que anelam na região L1 do HPV para detecção viral.	52
Figura 12 - Gel de eletroforese da nPCR com primers GP5+/6+ que anelam na região L1 do HPV para detecção viral	53
Figura 13 - Método de discriminação alélica por PCR em tempo real para análise do SNP - 308 (1800629) no gene <i>TNFA</i>	54
Figura 14 - Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo <i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical.....	58
Figura 15 - Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo <i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.....	60
Figura 16 - Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo <i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical.....	60
Figura 17 - Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo <i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.....	60
Figura 18 - Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo <i>IL-10</i> -819C>T (rs1800871) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.....	61
Figura 19 - Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo <i>IL-10</i> -819G>A (rs1800871) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores de oligonucleotídeos e condições da reação utilizadas na detecção do HPV através da técnica nested Polymerase Chain Reaction (nPCR).	47
Tabela 2 - Caracterização dos grupos câncer cervical e controles saudáveis.....	51
Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do SNP <i>TNFA</i> -308 G>A e suas associações com o carcinoma cervical.....	55
Tabela 4 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do SNP <i>IL-10</i> -819 G>A e suas associações com o carcinoma cervical.....	56
Tabela 5 - Caracterização dos estudos incluídos na meta-análise	57
Tabela 6 - Meta-análise da associação entre os SNPs <i>TNFA</i> -308G>A e <i>IL-10</i> -819C>T e câncer cervical ou SIL com HPV.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ASC	Células Escamosas Atípicas (do inglês: <i>atypical squamous cells</i>)
ASC-H	Células escamosas atípicas não se podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau
ASC-US	Possivelmente não-neoplásicas
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
CD	Células Dendriticas
DSTs	Doenças sexualmente transmissíveis
E	Genes precoce (do inglês: <i>early</i>)
G	Guanina
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
HPV	Papiloma Vírus Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto grau (HSIL – do inglês: <i>high-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
IFNs	Interferons
<i>IL-10</i>	<i>Interleukin-10</i>
IL-10	Proteína Interleukin-10
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
IVA	Inspeção Visual com Ácido acético
L	Genes tardio (do inglês: <i>late</i>)
L1	Proteínas de capsídeo maior
L2	Proteínas de capsídeo menor
LCR	Região regulatória (do inglês: <i>Long Control Region</i>)
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo grau (do inglês: <i>low-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
MCP-1	Proteína de quimioatração de monócito
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Células Natural Killer
NPDC	Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
nPCR	nested-PCR
OPS	Organização Panamericana de Saúde
ORF	Região Aberta de Leitura (do inglês: <i>Open Reading Frame</i>)

PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>)
PHS	Proteoglicano <i>Heparan</i> Sulfato
PRb	Retinoblastoma
SIL	Lesão Intraepitelial Escamosa (do inglês: <i>squamous intra-epithelial lesions</i>)
SNP	Polimorfismos de Nucleotídeo Simples
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	<i>Toll likes</i> Receptor
TNFA	Gene <i>Fator de Necrose Tumoral alfa</i> (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNF- α	Proteína Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
V	<i>Volts</i>
UV	Ultra Violeta
VNTR	(do inglês: <i>variable number of tandem repeats</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Contexto histórico.....	18
2.3	Papiloma vírus Humano	21
2.3.1	Transmissão	21
2.3.2	Classificação do HPV	21
2.3.3	Estrutura e genoma viral.....	22
2.3.4	Ciclo de vida normal.....	24
2.3.4.1	Entrada do vírus na célula	24
2.3.4.2	Manutenção do genoma	25
2.3.4.3	Fase proliferativa.....	25
2.3.4.4	Amplificação genômica	25
2.3.4.5	Montagem e liberação de novas partículas virais	26
2.3.5	Ciclo patogênico	27
2.4	Patologias causadas pelo HPV.....	29
2.4.1	Condilomas.....	29
2.4.2	Lesões Intraepiteliais Escamosa do Colo Uterino	30
2.4.3	Câncer cervical	30
2.5	Diagnóstico	32
2.7	Resposta imunológica do hospedeiro	34
2.7.1	Citocinas	36
2.7.1.1	TNF- α	37
2.7.1.3	IL-10.....	37
2.8	Polimorfismos em genes de citocinas	38
2.8.1	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	39
2.8.3	<i>IL-10</i> -819 C>T (rs1800871)	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	Geral	42
3.2	Específicos	42
4	METODOLOGIA.....	43
4.1	Aspectos éticos	43

4.2	População e local do estudo	43
4.3	Desenho do estudo	43
4.4	Coleta e armazenamento das amostras	44
4.4.1	Amostras do grupo controle	44
4.4.2	Amostras do grupo caso	45
4.5	Procedimentos de biologia molecular	45
4.5.1	Extração de DNA.....	45
4.5.2	Quantificação e verificação do estado do DNA	45
4.5.3	Detecção do HPV	46
4.5.4	Genotipagem dos polimorfismos.....	47
4.6	Análise Estatística.....	48
4.7	Método da meta-análise	48
5	RESULTADOS	51
5.1	Aspectos gerais.....	51
5.2	Detecção do HPV	51
5.3	Genotipagem por discriminação alélica	53
5.3.1	Frequência genotípica e alélica do SNP -308 G>A no gene <i>TNFA</i>	53
5.3.2	Frequência genotípica e alélica do SNP -819 C>T no gene <i>IL-10</i>	55
5.4	Meta-análises dos estudos de associação dos SNPs <i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629) e <i>IL-10</i> -819 (rs1800871) na susceptibilidade a lesões intraepiteliais escamosas (SIL), câncer cervical e infecção pelo HPV.....	56
5.4.1	Meta-análise SNP <i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	57
5.4.2	Meta-análise SNP <i>IL-10</i> -819C>T (rs1800871)	58
6	DISCUSSÃO	62
6.1	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629).....	62
6.2	<i>IL-10</i> -819C>T (rs1800871)	63
7	CONCLUSÃO.....	65
8	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE I – ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE SUBMETIDO.....	79

APÊNDICE II – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO	82
ANEXO I – PARECER SUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	85
ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ...	88
ANEXO III – PROTOCOLO DO KIT COMERCIAL PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	92
ANEXO IV – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO POR NACL (SALTING OUT).....	93

1 INTRODUÇÃO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é considerado um significativo problema de saúde pública no mundo, devido ao seu potencial etiológico no desenvolvimento de diversos tipos de cânceres em humanos, tais como o câncer do colo de útero, também conhecido como câncer cervical (WANG et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infecção pelo HPV é tão comum que a maioria das pessoas sexualmente ativas serão infectadas em algum momento de suas vidas, podendo ser repetidamente infectadas (WHO FACT SHEET, 2016).

A maioria das infecções pelo HPV desaparece espontaneamente sem o surgimento de sinais ou sintomas, e sem a necessidade de intervenções clínicas (FARZANEH et al., 2006). No entanto, uma pequena proporção das infecções pode persistir, e progredir para Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) e Câncer cervical (BRINGHENTI, 2010).

O câncer cervical é considerado o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres. Estima-se que aproximadamente 528 mil novos casos ocorrem anualmente no mundo, com cerca de 270 mil destes culminando em mortes (WHO FACT SHEET, 2016). No Brasil, estima-se 16.370 novos casos de câncer cervical para cada ano do biênio 2018-2019, com uma estimativa de risco de aproximadamente 15,43 casos/100.000 mulheres (INCA, 2017).

Estudos apontam o tipo do vírus, as condições ambientais, os cofatores exógenos e a resposta imuno/genética do hospedeiro como sendo as variáveis envolvidas no aumento para o risco do câncer cervical (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002; LI et al., 2016; SHRESTA et al., 2004; WANG et al., 2012). Várias citocinas desempenham um papel importante na modulação da resposta imune contra a infecção pelo HPV, e sendo relatadas por muitos estudos como possíveis moléculas responsáveis pela progressão da lesão cervical (BAHLS et al., 2017; HAZELBAG et al., 2001). Estudos têm demonstrado uma desregulação nos níveis de produção de citocinas em NIC e câncer cervical (PARADKAR et al., 2014; TORRES-POVEDA et al., 2016). Esta desregulação pode ser relacionada a Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNPs) em genes de citocinas (PARADKAR et al., 2014). Os SNPs localizados principalmente nas regiões regulatórias (promotores) podem alterar a atividade transcricional do gene, levando assim a um aumento ou diminuição da expressão gênica (ESKDALE et al., 1997). Portanto, estes SNPs podem ser candidatos a biomarcadores de susceptibilidade a NIC e ao câncer cervical.

Vários SNPs em genes de citocinas têm sido associado a infecção persistente e o desenvolvimento de NIC e do carcinoma cervical (BARBISAN et al., 2012; CONG et al.,

2015; FARZANEH et al., 2006; MARANGON et al., 2013). Entretanto, os resultados apresentam contradições na literatura, indicando que o papel destes SNPs na susceptibilidade a doenças cervicais ainda não tem sido totalmente elucidado. Mediante ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de polimorfismos presentes nos genes *Tumor Necrosis Factor (TNFA)* -308G>A (rs1800629), *Interleukin-10 (IL-10)* -819C>T (rs1800871), na susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas por HPV do agreste alagoano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contexto histórico

Os primeiros relatos de lesões condilomatosas foram descritos na Grécia e Roma antiga, onde pela primeira vez foi considerada a hipótese destas verrugas genitais estarem associadas ao comportamento sexual promíscuo (BURNS, 1992). Em 1842, o Dr. Rigoni-Stern foi o primeiro a observar uma associação entre o câncer cervical e o comportamento sexual, considerando em sua análise que o câncer cervical foi desproporcionalmente alto em prostitutas e mulheres casadas quando comparado a mulheres que não tinham iniciado a atividade sexual. Esta observação levou o físico italiano a pensar que o carcinoma cervical estaria sendo de alguma forma transmitido sexualmente (ROWSON; MAHY, 1967).

Em 1933, o Dr. Richard Shope publicou pela primeira vez a identificação do Papilomavírus no tecido verrugoso na pele de coelhos, o qual ficou conhecido como Shope Papilomavírus (SHOPE; HURST, 1933). Dois anos depois, o Dr. Rous demonstrou em seu estudo que a transmissão do Shope Papilomavírus apresentava um alto potencial neoplásico em coelhos domésticos (ROUS; BEARD, 1935). Desde então, o Papilomavírus passou a ser considerado um agente infeccioso comum entre os mamíferos. Com o avanço da tecnologia e o surgimento da microscopia eletrônica, em 1949, foram relatadas às primeiras observações de partículas virais em humano, ficando conhecido como Papilomavírus Humano (HPV) (STRAUSS et al., 1949).

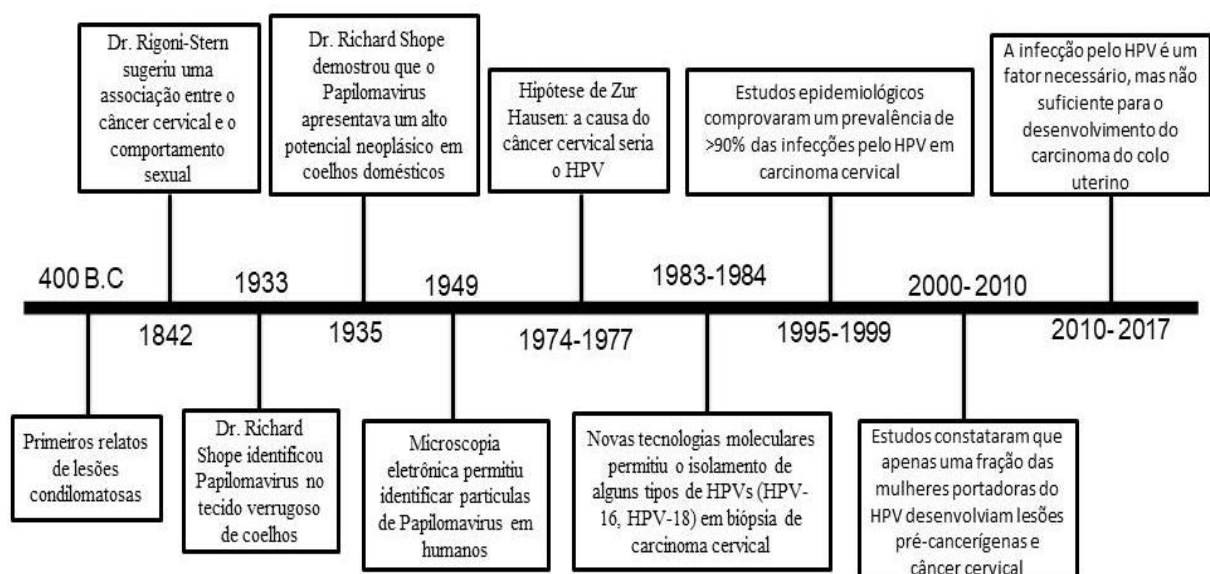
Durante décadas, muitos pesquisadores buscaram entender, sem sucesso, qual o principal agente causador do câncer do colo do útero, doença até então conhecida pela sua correlação com comportamento sexual. Apenas em 1972 surgiu às primeiras tentativas de estabelecer uma correlação entre o Papilomavírus e o câncer do colo do útero, baseado em relatos médicos publicados que tinham como princípio a conversão de condiloma acuminado (verrugas genitais) em carcinoma de células escamosas (HARARI; CHEN; BURK, 2014). Esta hipótese foi publicada em 1974 pelo pesquisador Harald zur Hausen, e forneceu evidências de que o câncer do colo do útero poderia se desenvolver a partir de infecções presentes em condiloma acuminado (HAUSEN, 1974). Em 1977, Huasen concluiu em uma publicação que o HPV apresentava um importante papel no desenvolvimento do câncer do colo uterino (ZUR HAUSEN, 1977). Esta descoberta foi reconhecida com o Prêmio Nobel de medicina em 2009 (ZUR HAUSEN, 2009).

Apesar das evidências encontradas por Hausen na década de 1970, suas publicações geraram resistência na época, devido a publicação anterior em que o pesquisador não

encontrou associação entre DNA do vírus Herpes simplex e biópsia de câncer cervical (HAUSEN, 1975). Entretanto, a partir da década de 1980, o advento de novas tecnologias moleculares, como a clonagem, replicação e sequenciamento de DNA, possibilitou o isolamento de alguns tipos de HPVs, principalmente o HPV16 e HPV18, em biópsia de carcinoma cervical (BOSHART et al., 1984; DÜRST, M, GISSMANN, L., IKENBERG, H. & ZUR HAUSEN, 1983). Estes resultados reforçaram o interesse dos pesquisadores da época em investigar o papel etiológico do vírus na carcinogênese do colo uterino. Com isto, surgiram vários estudos epidemiológicos que comprovaram uma prevalência >90% das infecções pelo HPV em carcinoma cervical, o que conduziu ao surgimento da tese mundialmente aceita de que o “HPV é um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical” (BOSCH et al., 1995; WALBOOMERS et al., 1999).

Na década de 2000 surgiram novos estudos que constataram que apenas uma fração das mulheres portadoras do HPV desenvolviam lesões pré-cancerígenas e câncer cervical, colocando em evidência a etiologia viral da doença, e concluindo-se que a infecção pelo HPV é um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento do carcinoma do colo uterino (BOSCH et al., 2002; TROTTIER; FRANCO, 2006a). Portanto, estudos recentes têm investigado outros fatores em conjunto com a infecção por HPV, na tentativa de elucidar a susceptibilidade do hospedeiro a lesões pré-cancerígenas e câncer cervical. A história do HPV e câncer cervical estão compilados na figura 1.

Figura 1 - História do HPV, câncer cervical e avanços tecnológicos



2.2 Epidemiologia

Atualmente o HPV é considerado a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum no mundo. De acordo com a OMS, a maioria das pessoas sexualmente ativas será infectada em algum momento de suas vidas, podendo ser repetidamente infectadas (WHO FACT SHEET, 2016). Esta infecção consiste em um problema de saúde pública significativa, devido ao seu potencial etiológico no desenvolvimento de diversos tipos de câncer em humanos, como o câncer do colo uterino, vagina, vulva, anal, pênis e de cabeça e pescoço (BRANNEY et al., 2014; DESHMUKH et al., 2017; DIMOPOULOS et al., 2012; LAWRENCE et al., 2015; WANG et al., 2011). Dentre estes, o câncer do colo uterino é o mais prevalente, e o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres. Segundo a OMS, a prevalência de infecção pelo HPV em 2012 foi de aproximadamente 630 milhões de casos, sendo 190 milhões clinicamente aparentes, conduzindo a 528 mil novos casos de câncer cervical, e destes, aproximadamente 266 mil culminaram em óbitos (Figura 1) (GLOBOCAN, 2012).

Na América, a estimativa é de aproximadamente 92 mil casos e 38 mil mortes por ano, configurando um significativo prejuízo aos cofres públicos, com uma previsão para ser potencialmente superior a US\$ 3,6 bilhões (PAHO, 2010). Em 2012, a Organização Panamericana de Saúde (OPS) apresentou uma estimativa de 36 mil mortes por câncer cervical, sendo 80% destas de ocorrência na América Latina e países Caribenhos (PAHO, 2015). Se essas tendências de mortes permanecerem ao longo dos anos, o número de mortes nas Américas deverá aumentar cerca de 45% até 2030 (XAVIER BOSCH, 2016).

No Brasil, o câncer cervical é um importante problema de saúde pública, sendo considerado o segundo tipo de câncer mais frequente entre mulheres no país, com uma estimativa de 16.370 novos casos para cada ano do biênio 2018-2019, e uma taxa de incidência de 15,44 casos/100.000 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA; SILVA, 2017). Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo uterino é o tipo de câncer mais incidente na região Norte (25,62/100 mil). Nas Regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil) apresentam segunda maior incidência; enquanto, nas regiões nas Regiões Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil) aparecem como o quarto mais incidente (INCA, 2017).

No nordeste do Brasil, o estado de Alagoas possui a maior estimativa de incidências para o ano de 2018, com 31,90/100 mil habitantes, seguido do Maranhão (30,55/100 mil) e Piauí (26,19/100 mil) (INCA, 2017).

2.3 Papiloma vírus Humano

2.3.1 Transmissão

A transmissão do HPV pode ocorrer principalmente de três formas, através do contato sexual, não sexual e materno fetal (AULT, 2006; RUFFIN IV et al., 2006). A transmissão sexual acontece pelo contato direto de pele com pele, durante o sexo oral, vaginal ou anal (MEDEIROS et al., 2005). De acordo com alguns autores, a transmissão é predominantemente pelo ato sexual, devido à teoria de que a maioria das mulheres são infectadas pelo HPV após o início da atividade sexual (CASTELLSAGUÉ et al., 2002; WIDDICE et al., 2013). Segundo estudos epidemiológicos, o principal fator de risco para adquirir a infecção pelo HPV está relacionado com comportamento sexual, como, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, histórico de ISTs, e o não uso de preservativo (SELLORS et al., 2000; TROTTIER; FRANCO, 2006b). Embora raros, os eventos de transmissão pelas vias não sexuais podem ocorrer através de fômites (sabonetes, toalhas, roupas íntimas) (SALES, 2014). Além disso, a transmissão pode ocorrer de mãe para filho durante o parto (RUFFIN IV et al., 2006).

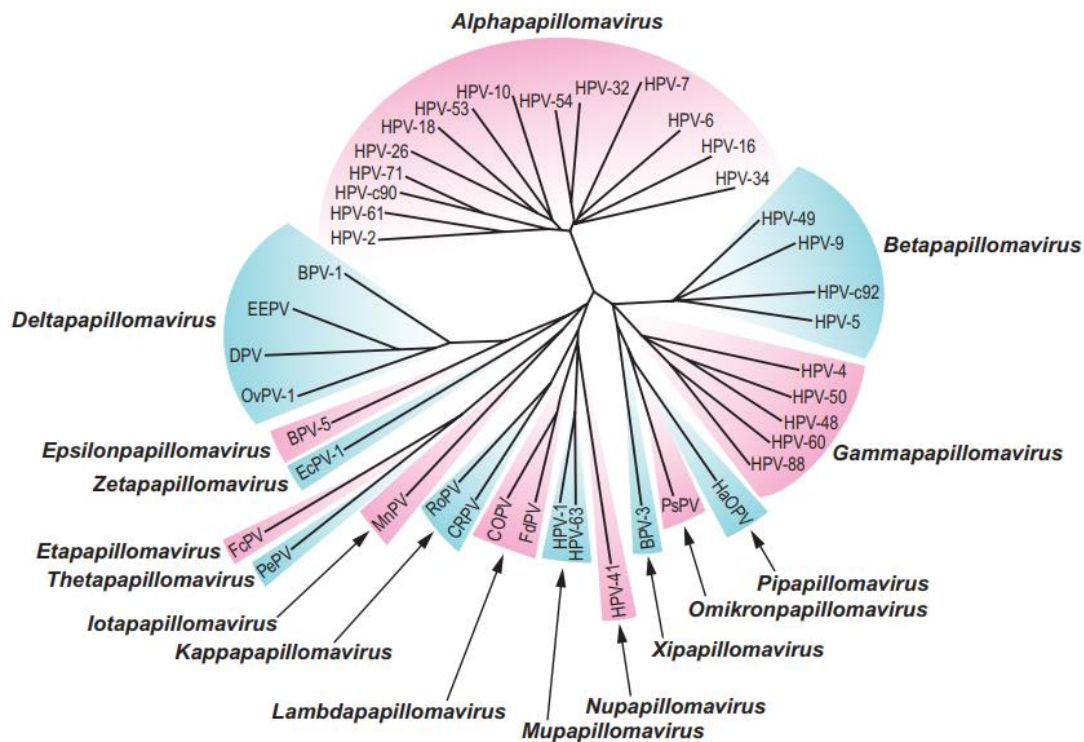
2.3.2 Classificação do HPV

O papilomavírus pertence à família *Papillomaviridae*, a qual é subdividida em duas subfamílias: *Firstpapillomavirinae* (52 gêneros) e *Secondpapillomavirinae* (1 gênero). Dentro da subfamília *Firstpapillomavirinae* são conhecidos cinco gêneros que compreendem os papilomavírus que infectam os humanos (HPV): *Alphapapillomavirus* (14 espécie), *Betapapillomavirus* (6 espécie), *Gammapapillomavirus* (27 espécies), *Mupapillomavirus* (3 espécies) e *Nupapillomavirus* (1 espécie) (ICTV, 2017) (Figura 2). Até o momento foram identificados e descritos mais de 200 genótipos de HPV, classificados de acordo com a região conservada da sequência do gene L1 do vírus.

O gênero *Alphapapillomavirus* é considerado o mais abrangente e de maior impacto clínico, contendo 14 espécies que inclui 64 tipos de HPVs. Destes aproximadamente 40 infectam a região anogenital, os quais incluem 15 tipos de HPV considerados de alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) e 11 de baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81), sendo assim classificados de acordo com o seu potencial carcinogênico nesse local. O *Betapapillomavirus* é o segundo maior gênero, caracterizado por infectar principalmente o epitélio cutâneo. São conhecidos mais de 50 tipos

desse gênero, no entanto, acredita-se que o número de representantes seja maior. A infecção pelos tipos de HPVs do grupo *Betapapillomavirus* está associada com verrugas cutâneas e o desenvolvimento de câncer de pele não melanoma, principalmente em pacientes com epidermodisplasia verruciforme. Os HPVs dos outros três gêneros (*Gamma**papillomavirus*, *Mu**papillomavirus* e *Nu**papillomavirus*) geralmente causam apenas lesões benignas.

Figura 2 - Árvore filogenética representando a sequência de 118 *Papillomaviruses*



Fonte: ICTV, 2012

Nota: A região filogenética informativa foi o gene L1 do vírus.

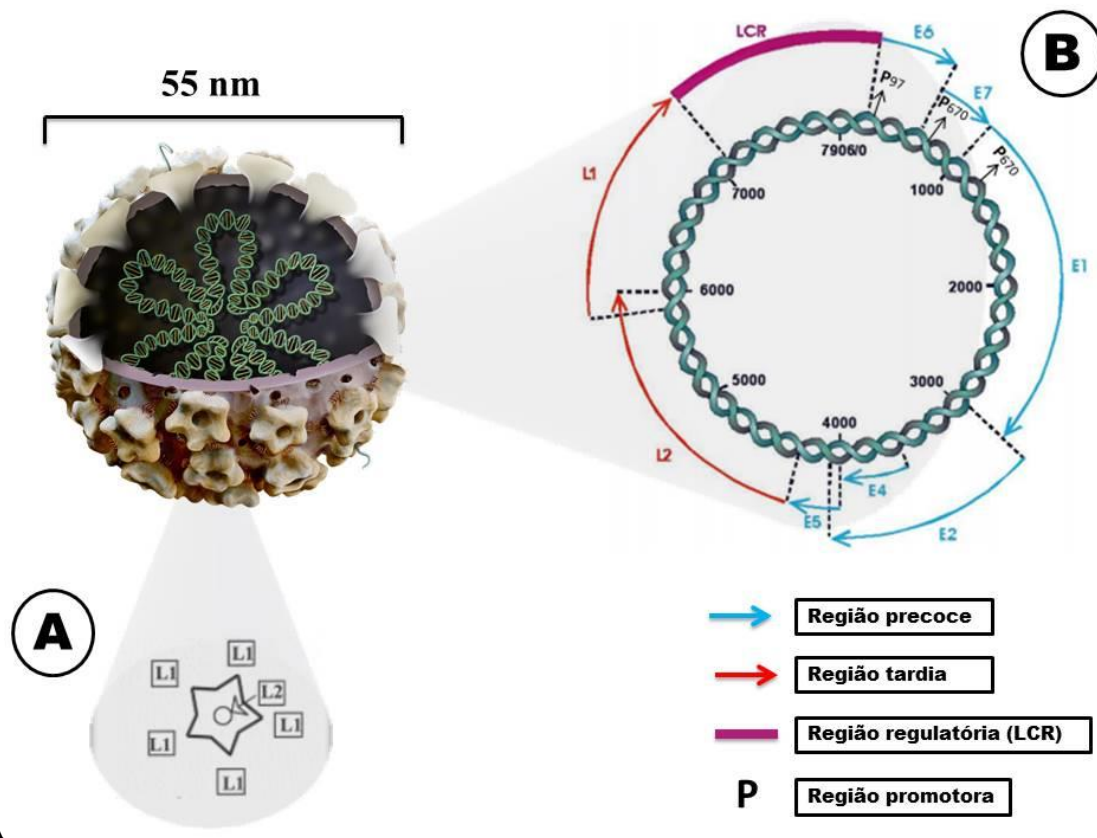
2.3.3 Estrutura e genoma viral

Os HPVs são caracterizados como vírus de DNA de fita dupla circular, com uma dimensão de aproximadamente 55 nanômetros (nm) de diâmetro. O capsídeo do vírion não é envelopado, e possui uma simetria icosaédrica que se arquiteta através de 360 cópias de proteínas de capsídeo maior (L1) organizadas em 72 capsômeros pentaméricos, que possivelmente apresentam uma cópia de proteína de capsídeo menor (L2) no seu centro (Figura 3A) (CONWAY; MEYERS, 2009; MODIS; TRUS; HARRISON, 2002).

O genoma viral tem aproximadamente 8.000 pares de bases (pb), e são associados a histonas celulares, formando um complexo histona-DNA que se assemelha à cromatina (Figura 3). A conformação genômica viral pode ser dividida em dois segmentos principais:

(1) Uma região aberta de leitura (ORF - do inglês: *Open Reading Frame*), onde estão localizados os genes precoce (E-early) e tardio (L-late); (2) e uma região regulatória (*Long Control Region* – LCR) (Figura 3B) (GRAHAM, 2017; SANTOS-LÓPEZ et al., 2015; VAN DOORSLAER et al., 2018).

Figura 3 - Estrutura morfológica e genômica comum do HPV



Legenda: (A) Estrutura tridimensional do capsídeo do vírion HPV. L1: capsídeo maior, L2: capsídeo menor. (B) Genoma comum do vírus HPV de aproximadamente 8.000 pares de bases. Genes precoces (em azul), genes tardios (em vermelho), LCR - região regulatória (em roxo), P (regiões promotoras).
Fonte: Adaptado de WORLD OF VIRUSES; PLOTKIN, 2009; BURK, 1999.

A região precoce compreende cerca de 4.000 pb, que codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Estas proteínas são expressas logo após a infecção do vírus a célula hospedeira, estando envolvidas principalmente nos processos de replicação e transcrição quando o vírus se encontra na forma episomal (estado em que o DNA viral permanece circular no núcleo da célula, não estando integrado ao DNA genômico da mesma) (GRAHAM, 2017).

A região tardia tem aproximadamente 3.000 pb, a qual apresenta duas ORFs, responsáveis por codificar duas proteínas estruturais, L1 e L2, que compõem o capsídeo do

vírus. A expressão destas proteínas ocorre tardiamente após infecção. O gene L1 é altamente expresso durante esta fase, visto que a proteína L1 representa 80% da proteína total do vírus, e é responsável pela formação da maior parte do capsídeo. Enquanto que o gene L2 codifica proteínas que participam, em sua maior parte, do empacotamento do DNA viral (BUCK et al., 2004; STANLEY; PETT; COLEMAN, 2007).

A região LCR compreende cerca de 10% do genoma total do vírus, que contem sequências regulatórias que atuam no controle da replicação, transcrição e pós-transcrição viral, através do elemento regulador tardio (do inglês: *Late Regulatory Element* - LRE) (GRAHAM, 2010).

2.3.4 Ciclo de vida normal

A infecção pelo HPV ocorre inicialmente através da penetração de vírions em pequenas lesões que dá acesso às camadas mais basais do epitélio escamoso estratificado. Os queratinócitos, que são residentes nessas camadas basais, são as primeiras células a serem infectadas pelo HPV, por conferir um estado indiferenciado e de alta atividade mitótica, proporcionando um ambiente favorável ao vírus, visto que, sua infecção está diretamente ligada à programação de diferenciação celular (CHOW, 2015; STANLEY, 2008). O ciclo normal da infecção pelo HPV passa por 5 principais etapas consecutivas: (1) entrada do vírus na célula (2) manutenção do genoma, (3) fase proliferativa, (4) amplificação genômica e (5) montagem e liberação de novas partículas virais (DOORBAR, 2005).

2.3.4.1 Entrada do vírus na célula

A entrada dos vírions nos queratinócitos ocorre através da ligação das proteínas do capsídeo viral com receptores presentes na superfície da célula-alvo (BOUSARGHIN et al., 2003; RAFF et al., 2013). O HPV se liga ao Proteoglicano *Heparan* Sulfato (PHS) presente na superfície das células da membrana basal, resultando na primeira mudança conformacional do capsídeo (SCHILLER; DAY; KINES, 2010; SURVILADZE; DZIDUSZKO; OZBUN, 2012). A enzima furina e/ou convertase 5/6 (PC5/6) cliva a região N-terminal da L2, promovendo uma segunda mudança conformacional no capsídeo viral. Em seguida, o vírion se liga a proteína integrina presente na membrana dos queratinócitos. Esta interação estimula a internalização do HPV através de vesículas, por meio de um processo chamado endocitose (BIENKOWSKA-HABA; PATEL; SAPP, 2009; KINES et al., 2009; RICHARDS et al., 2006).

As vesículas contendo as partículas virais são fundidas a lisossomos citoplasmáticos, cujo conteúdo ácido interno promove degradação das proteínas do capsídeo, causando uma desmontagem viral (ARALDI et al., 2018). Uma vez livre, o genoma viral permanece na forma episomal, e é transportado através de uma via mediada por uma proteína chamada de tubulina até o núcleo da célula infectada (DIGIUSEPPE et al., 2016). A trajetória do HPV que vai desde o primeiro contato do capsídeo com receptores de membrana plasmática até a chegada do genoma viral, na forma episomal, no núcleo da célula infectada, tem duração de aproximadamente 24 horas (DAY et al., 2004).

2.3.4.2 Manutenção do genoma

Inicialmente, o HPV mantém seu genoma episômico com um baixo número de cópias no núcleo das células da camada basal (DOORBAR, 2005). Durante este período, há uma baixa expressão dos genes E1, E2, E6 e E7, em um nível suficiente para preservar a manutenção genômica viral (STANLEY et al., 1989). As proteínas E1 e E2 tem uma importante função em manter o DNA viral na forma episomal (ZHANG et al., 1999). Apesar do importante papel designado no ciclo patogênico das proteínas E6 e E7, sua expressão também é essencial na replicação normal do HPV. Nesta fase inicial, a replicação do genoma viral é mantida na camada basal em um faixa de 50 a 100 cópias por núcleo de células infectadas (MAGLENNON; MCINTOSH; DOORBAR, 2011).

2.3.4.3 Fase proliferativa

As células basais não infectadas normalmente saem do ciclo de proliferação celular após migrarem para a camada intermediária do epitélio, e logo em seguida entram em um estágio de diferenciação terminal. Entretanto, durante a infecção pelo HPV, a proteína E7 ativa o ponto de verificação da fase G1 para S no percurso do ciclo celular dos queratinócitos, estimulando a progressão do ciclo celular, e retardando a diferenciação terminal dessas células (ROMAN; MUNGER, 2013). Esse processo favorece o aumento de células em estágio de replicação de DNA nas camadas intermediárias do epitélio. A proteína E6 atua em conjunto com a E7 para promover esse efeito na célula hospedeira (STOLER et al., 1989).

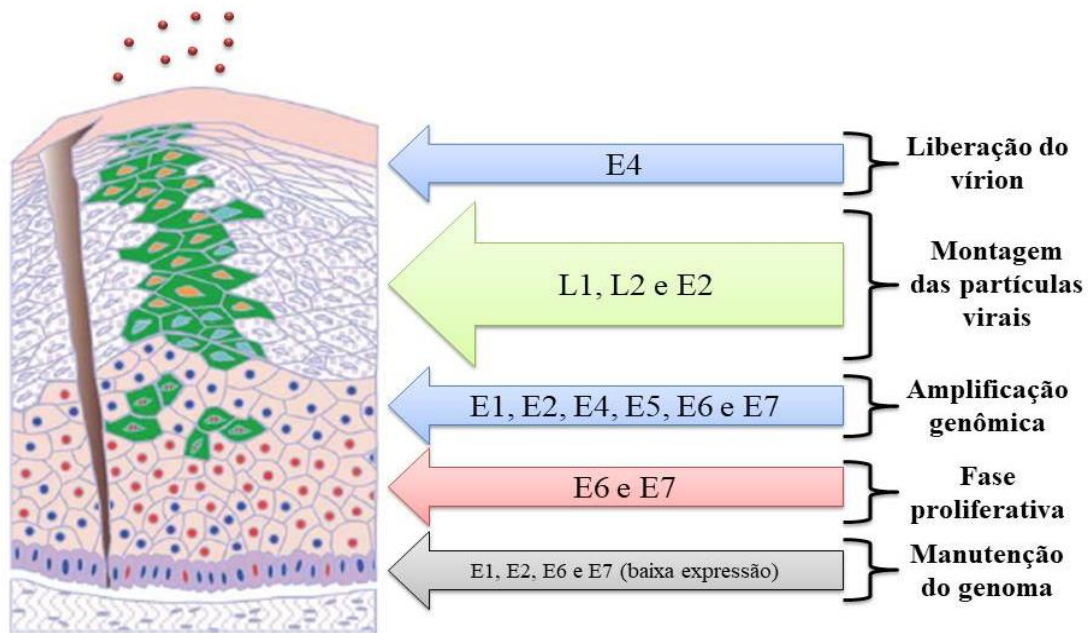
2.3.4.4 Amplificação genômica

Durante essa fase o HPV deve amplificar seus genomas virais para iniciar a produção de novas partículas virais infecciosas (vírion) (DOORBAR, 2005). Para alguns tipos de HPV, principalmente os do gênero alphapapillomavirus, esse processo ocorre nas camadas intermediárias ou superiores do epitélio cervical. O promotor tardio presente dentro da ORF do gene E7 inicia uma expressão aumentada de proteínas que participam ativamente do processo de replicação do DNA viral (E1, E2, E4 e E5), sem alterar a expressão das proteínas E6 e E7, que são importantes para o início da fase S do ciclo celular (MIDDLETON et al., 2003). Portanto, a amplificação do genoma viral necessita da expressão de todos os genes precoces do vírus (E1, E2, E4, E5, E6 e E7). No entanto, os mecanismos das proteínas E4 e E5 na replicação do genoma viral ainda não se encontram totalmente elucidados (FEHRMANN; KLUMPP; LAIMINS, 2003; PEH et al., 2004; WILSON; FEHRMANN; LAIMINS, 2005). As proteínas E1 e E2 atuam diretamente na replicação do DNA viral. A proteína E2 se liga na região regulatória (LCR) e em seguida recruta a E1 (DNA helicase) para a origem de replicação. A ligação das proteínas E1/E2 forma um complexo na origem de replicação, e amplificação do genoma viral (MCBRIDE, 2013; SANDERS; STENLUND, 1998, 2000). As expressões das proteínas do HPV são reguladas pelo uso do promotor e pela seleção de sítios de *splicing* diferencial. Durante a etapa de amplificação genômica os níveis das proteínas E1 e E2 são elevados, permitindo o aumento no número de cópias virais nas camadas epiteliais superiores (OZBUN; MEYERS, 1998).

2.3.4.5 Montagem e liberação de novas partículas virais

Quando a amplificação do genoma é concluída nas camadas superiores, inicia-se a expressão dos genes tardios (L1 e L2). O gene L2 é o primeiro a ser expresso, seguido da L1, e ambos são expressos em conjunto com o gene E2. As proteínas L1 e L2 são acumuladas no citoplasma, sendo conduzidos subsequentemente para o empacotamento dos genomas virais através da montagem do capsídeo (BUCK et al., 2004). A proteína E2 mostrou um aumento no empacotamento do DNA viral, sugerindo um importante papel na montagem do capsídeo (ZHAO et al., 2000). Por outro lado, a proteína E4 parece facilitar o processo de liberação dos vírions através da interação com diversos filamentos do citoesqueleto celular. Isto contribui para desestabilizar a estrutura da célula, deixando-a mais propensa a sofrer lise celular nas camadas superficiais escamosas do epitélio, e subsequentemente a liberar as partículas virais (Figura 4). Uma vez liberados, durante a descamação celular, os vírions tornam-se preparados para uma nova infecção (DOORBAR et al., 1991; WANG et al., 2004).

Figura 4 - Proteínas virais expressas em diferentes fases do ciclo de vida normal do HPV



Fonte: Adaptado de DOORBAR, 2005

2.3.5 Ciclo patogênico

O ciclo de vida normal do HPV pode ser interrompido por um mecanismo casual de alguns tipos de HPV (principalmente de alto risco) de integrar parcialmente o DNA viral no genoma da célula hospedeira (WHITE; PAGANO; KHALILI, 2014). Portanto, o material genético viral pode ser encontrado nas células cervicais, na forma episomal (lesões benignas), integrado no genoma da célula (lesões malignas), ou uma mistura de ambas as formas (lesões pré-malignas) (Figura 5) (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

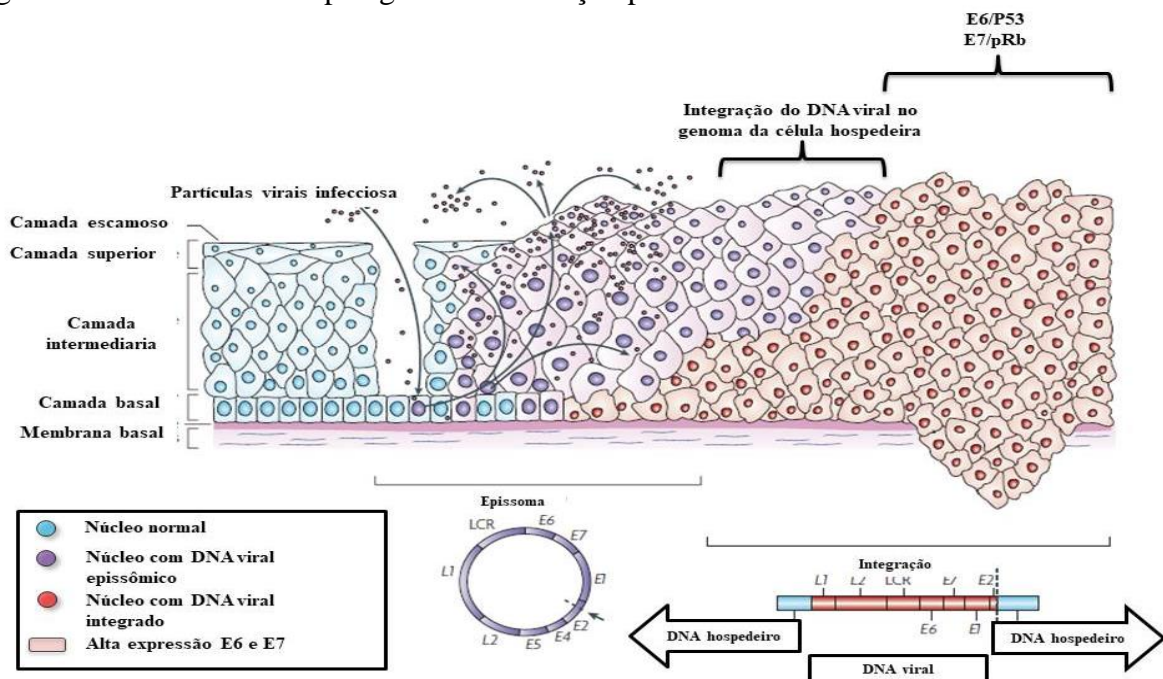
A integração do DNA viral ocorre de forma randômica no cromossomo celular, onde os genes E6 e E7 são preservados, e a região próxima aos genes E2 e E1 sofre deleção e/ou ruptura, resultando principalmente na perda da função da proteína E2, que tem como um dos seus mecanismos a regulação da expressão gênica das proteínas oncogênicas (E6 e E7) (Figura 5) (BECHTOLD; BEARD; RAJ, 2003). Esta regulação promove um feedback negativo, ou seja, controla a expressão de ambos os genes. Com a expressão descontrolada, as proteínas E6 e E7 são altamente expressas, o que favorece a ligação das mesmas com proteínas reguladoras do ciclo celular (supressores de tumor), induzindo a transformação e imortalização das células hospedeiras (STEBEN; DUARTE-FRANCO, 2007).

Normalmente, uma proliferação celular descontrolada é contida pela indução da apoptose. Portanto, durante uma infecção pelo HPV espera-se que a morte celular seja

ativada. No entanto, os HPVs de alto risco possuem um mecanismo para evitar esse processo e perpetuar a infecção. A proteína E6 liga-se a ubiquitina ligase e a P53, que são peças chave no controle do ciclo celular e importante regulador de apoptose, respectivamente. Esta interação promove degradação dessas moléculas, e subsequentemente prejudica suas funções (MARTINEZ-ZAPIEN et al., 2016; MOODY; LAIMINS, 2010). Além disso, a proteína E6 pode bloquear a função da P53 através da ligação com a histona acetiltransferase CBP/p300 e inibir a transcrição do gene responsável por expressar a P53 (TP53 – do inglês: tumor *protein* p53) (PATEL et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 1999).

Durante a infecção pelo HPV de alto risco, a proteína E7 também apresenta mecanismos que altera as funções do ciclo celular normal. A E7 ativa o ciclo celular das células infectadas através da associação e liberação ou degradação da proteína retinoblastoma (pRb) de um complexo de repressão transcricional que contém um fator de transcrição chamado E2F (DYSON et al., 1989; HELT; GALLOWAY, 2001). Após a saída da pRb do complexo, a E2F fica livre para ativar a transcrição de genes envolvidos com o ciclo celular, induzindo a passagem da fase G1 para a fase S (MOODY; LAIMINS, 2010) (Figura 5).

Figura 5 - História do ciclo patogênico da infecção pelo HPV



Fonte: Adaptado de WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007.

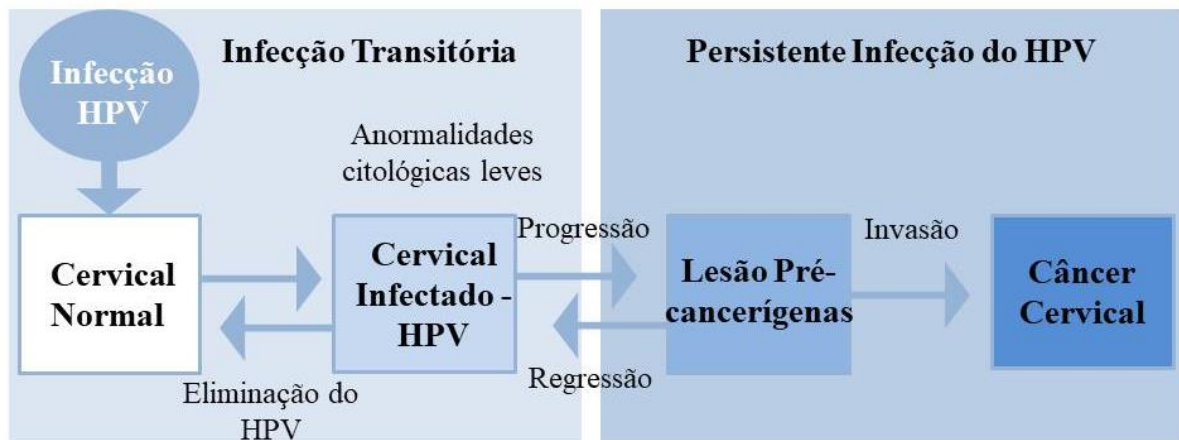
Nota: Uma parte das infecções pelo HPV de alto risco evolui para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (HGCIN). A progressão de lesões está associada à integração do genoma do HPV nos cromossomos do hospedeiro (núcleos vermelhos), com perda ou interrupção do gene E2 e subsequente hiper-regulação da expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7. proteína E6 pode bloqueia a função da P53, e E7 ativa a mitose de células infectadas através da proteína retinoblastoma (pRb), causando desregulação no ciclo celular, e podendo progredir para o carcinoma cervical invasivo.

Os mecanismos supracitados envolvendo as proteínas E6 e E7 conduzem as vias que favorecem a proliferação celular não programada, o que sugere o papel central dessas proteínas dos HPVs de alto risco no surgimento de neoplasias e carcinogênese (DYSON et al., 1989; MOODY; LAIMINS, 2010).

2.4 Patologias causadas pelo HPV

A maioria das infecções pelo HPV desaparece espontaneamente em torno de 12 a 24 meses, sem intervenção clínica ou sintomas, resultado de um sucesso imunológico do hospedeiro (WRIGHT; SCHIFFMAN, 2003). Entretanto, uma proporção entre 10% a 30% das infecções pelo HPV de alto riscos (oncongênicos) podem persistir e progredir para lesões pré-cancerígenas, tais lesões podem regredir ou desenvolver carcinoma cervical (TORTOLERO-LUNA, 1999) (Figura 6). Os HPVs de baixo risco são associados ao surgimento de condilomas.

Figura 6 - Histórico natural da infecção pelo HPV



Fonte: adaptado de (WRIGHT; SCHIFFMAN, 2003).

2.4.1 Condilomas

O condiloma acuminado, também conhecido como verruga genital, é um tumor benigno que produz projeções semelhantes às digitais dos dedos ou couve-flor, com tamanhos variados. A coloração pode se apresentar da cor da pele, eritematosa ou hiperpigmentada. Em homens, podem surgir preferencialmente no prepúcio, frênulo e glande. Enquanto que nas mulheres são mais frequentes nos lábios maiores e menores, clitóris, região posterior do

introito vaginal. Além disso, podem ser observadas lesões no meato uretral e na região perianal de ambos os gêneros (VERMA, 2014; WANG et al., 2008).

O período de incubação das verrugas genitais pode variar de 2 a 6 meses, e é mais frequentemente causado pelos HPV-6 e HPV-11. Como o condiloma acuminado não apresenta risco de desenvolver câncer, esses tipos de HPV são considerados de baixo risco (BRAVO; FELEZ-SANCHEZ, 2015).

2.4.2 Lesões Intraepiteliais Escamosa do Colo Uterino

As Lesões intraepiteliais escamosas compreendem as displasias leves ou graves do epitélio escamoso do colo uterino, que são caracterizadas por maturação anormal e atípicas, de graus variáveis, que proliferam parcialmente ou totalmente sobre a espessura do epitélio escamoso cervical. A proporção da espessura do epitélio contendo estas células com anomalias nucleares irá determina o grau da lesão, podendo ser leve, moderada ou grave (SLATER et al., 2005; WHO, 2018).

Baseado nas alterações observadas nas células displásicas, em 1968 foi introduzido o termo Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), para representar as diferentes formas de atipias exclusivas do epitélio escamoso. A NIC foi subdividida em três graus distintos: NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada) e NIC III (displasia grave), além do câncer in situ, que surge através da progressão do NIC (NAYAR; WILBUR, 2017; WHO, 2018).

Em 1988, a classificação das anomalias citopatológicas foi atualizada baseada no sistema Bethesda. O objetivo principal deste sistema foi propor uma nova classificação para determinar os diferentes graus de lesões do epitélio escamoso, utilizando o seguinte termo: Lesão Intraepitelial Escamosa (SIL – do inglês: *squamous intra-epithelial lesions*), o qual apresenta dois níveis de lesões distintos, Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo grau (LSIL – do inglês: *low-grade squamous intraepithelial lesions*) ou alto grau (HSIL – do inglês: *high-grade squamous intraepithelial lesions*) (WRIGHT et al., 2002). Os termos NIC I e NIC II foram substituídos por LSIL, enquanto que o NIC III passou a ser representado por HSIL, modificando os níveis de diagnóstico da lesão de três para dois graus (NAYAR; WILBUR, 2017) (Figura 7).

2.4.3 Câncer cervical

O câncer do colo de útero, também chamado de câncer cervical, é um tumor maligno que acomete a parte inferior do útero, região de conexão com a vagina. A infecção persistente pelos HPVs de alto risco é a principal causa dessa malignidade. Cerca de 90% dos casos de câncer cervical surgem de células escamosas, e inicia-se na zona de transformação da ectocérvix. O carcinoma de células escamosas evolui a partir de SIL. Os outros 10% dos casos são os adenocarcinomas, que são derivados das células glandulares epiteliais secretoras da ectocérvix (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2014).

A evolução do câncer cervical é lenta e silenciosa, podendo durar até vinte anos para se manifestar. Os principais sinais e sintomas que podem ser indicativos de câncer cervical são: sangramento vaginal (intermitente ou após a relação sexual), secreção vaginal anormal, dores abdominal ou pélvica constante e/ou queixa urinária (INCA, 2011).

O carcinoma cervical pode se apresentar em dois diferentes estágios, carcinoma in situ ou invasivo. No carcinoma in situ, as células cancerígenas estão localizadas superficialmente na região inferior do colo uterino, não atingindo as camadas mais profundas desse órgão (Figura 7). O carcinoma invasivo é caracterizado pela invasão das células cancerígenas ao estroma (tecido de sustentação de um órgão). A forma mais precoce do carcinoma invasivo é nomeada histologicamente como carcinoma microinvasivo (neoplasias de invasão ≥ 5 mm de profundidade e ≥ 7 mm largura do estroma cervical), onde as células invasivas penetram através da membrana basal e empurram o estroma subjacente. A composição macroscópica do carcinoma microinvasivo pode se apresentar como uma área granular, avermelhada e rugosa que sangra após o contato físico (INCA, 2011; WHO, 2018; WRIGHT et al., 2002).

O carcinoma invasivo mais avançado pode ser exofítico, endofítico ou a combinação das duas formas de expansão. O carcinoma exofítico é superficialmente invasivo, e seu crescimento ocorre para dentro da luz vaginal, resultando em um aspecto semelhante a cogumelo ou crescimento proliferativo protuberante. O carcinoma endofítico ocorre pela infiltração de forma extensiva através do estroma, sem apresentar crescimento visível na superfície. Esse tipo de neoplasia invasiva pode se expandir para dentro da endocérvix, deixando o colo do útero intacto até que a proliferação das células neoplásicas ultrapasse de 5 a 6 cm de diâmetro. Com um maior avanço da invasão, o carcinoma se espalha, podendo ocupar tecidos locais, como a vagina, parede lateral pélvica, paramétrio, bexiga e reto (Figura 7). Além da invasão local, em condições mais severas, pode aparecer metástase, que geralmente ocorre ao final da doença, e acomete principalmente os nódulos paraaórticos, pulmões, fígado, ossos, entre outros órgãos (WHO, 2018; WRIGHT et al., 2002).

Figura 7 - Evolução de lesões intraepitelial escamosa ao câncer de colo de útero



Fonte: <https://ckdnews.wordpress.com/2015/10/20/9-signs-of-cervical-cancer-to-look-out-for/>

2.5 Diagnóstico

O principal método de rastreamento de câncer cervical no Brasil é o exame citopatológico (exame de Papanicolau). A citologia é um exame que coleta um esfregaço de células cervicais e analisa em microscópio óptico, para verificar se existem alterações de células individuais, com o intuito de identificar precocemente as SIL (NIC) e sua classificação (LSIL, HSIL). As principais atipias citopatológicas que apresentam aspectos insuficientes para determinar um diagnóstico são denominadas de Células Escamosas Atípicas (ASC – do inglês: *atypical squamous cells*), podendo ser categorizado em células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não-neoplásicas (ASC-US) e células escamosas atípicas não se podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) (INCA, 2014; WRIGHT et al., 2002).

Pode-se sugerir a presença de SIL no exame citológico através da técnica de Papanicolau. No entanto, o diagnóstico final das SIL e câncer cervical são estabelecidos através da realização do exame anatomopatológico em biópsia do colo uterino. Quando o exame citológico apresenta alguma alteração (LSIL/HSIL, ASC-H, carcinoma) a paciente é submetida à colposcopia seguida de biópsia com Inspeção Visual com Ácido acético (IVA) ou Teste de Schiller para identificar a região lesada e realizar a punção. A amostra é

encaminhada para o exame histológico, onde a análise do tecido cervical é baseada nas características histológicas referentes à diferenciação, maturação e estratificação das células e anormalidades morfológicas nucleares (WHO, 2018).

A histologia pode apresentar resultados que revelem “Alterações sugestivas de infecção pelo HPV”. Entretanto, apenas as técnicas de biologia molecular permitem confirmar a presença do vírus. Os métodos de biologia molecular são desenhados para identificar o material genético viral. Atualmente são conhecidas duas técnicas: (1) hibridização, que compreende três tipos, *Southern Blot*, captura híbrida e hibridização *in situ*; (2) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês: *Polymerase chain reaction*) (CLAVEL et al., 1998; MOLIJN et al., 2005).

O teste molecular de captura híbrida ocorre através da hibridização entre o DNA viral e sondas específicas para HPV de baixo e alto risco. Quando formados, os híbridos são capturados por anticorpo anti-híbridos. Uma vez capturados, esse híbridos são detectados por meio de conjugados ligados ao complexo anticorpo-híbrido que emitem fluorescência e possibilita sua identificação (CLAVEL et al., 1998; GAGE et al., 2012).

A hibridização *in situ* permite detectar sequências específicas de DNA genômico do HPV através de sondas complementares marcadas com componentes radioativos ou químicos, sendo possível identificar material genético do vírus em células através da observação em microscópio óptico. Além de detectar a presença, tipo do HPV (alto ou baixo risco) e a localização da região infectada, essa técnica possibilita identificar o estado físico do vírus, na forma episomal ou integrado ao genoma da célula hospedeira (HOPMAN et al., 2005).

A PCR é uma das principais técnicas da biologia molecular, utilizada para amplificar milhares de cópias de uma região específica do DNA. A técnica é baseada em uma replicação de DNA *in vitro*, que utiliza primers específicos para delimitar a região que será amplificada. Como o HPV é um vírus de DNA, é possível detectar seu material genético utilizando primers específicos. Para a detecção do HPV geralmente são utilizados os primers MY09/MY11 e GP5+/GP6+ que amplifica o gene L1 do vírus. Para um diagnóstico mais sensível, pode ser realizado a técnica de nested-PCR (nPCR), onde o produto da amplificação por PCR com os iniciadores MY09/MY11 é submetido à outra reação de PCR, utilizando os iniciadores GP5+/GP6+ (DEMATHE A, BERNABÉ D G, GARCIA J F, NUNES, C M, 2010; FUESSEL HAWS et al., 2004).

2.7 Resposta imunológica do hospedeiro

O sistema imunológico é formado por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, que atua no processo de defesa contra microrganismos invasores substâncias nocivas ou células tumorais, com a finalidade de manter a homeostase do organismo (CRUVINEL et al., 2010). A imunidade do hospedeiro contra infecções virais é efetivada a partir de uma relação integrativa da resposta imune inata e adquirida. A atuação da resposta imune inata ocorre imediatamente, agindo no primeiro momento do contato do hospedeiro com os antígenos virais. Enquanto que a imunidade adquirida ocorre de forma mais lenta e sincronizada, resultando na produção de compostos capacitados a combater o invasor em possíveis infecções posteriores ao mesmo agente etiológico (ABBAS ABUL K.; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

A primeira linha de defesa da imunidade inata contra o HPV são as camadas superficiais do epitélio escamoso, pois o vírus só consegue penetrar e iniciar a infecção através de microlesões presentes na pele. Uma vez rompida esta linha de defesa epitelial, as primeiras células a serem infectadas pelo HPV são os queratinócitos presentes nas camadas basais (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011).

Na imunidade inata, normalmente, a primeira estratégia das células infectadas com patógenos virais é a produção de interferons (INFs) do tipo I (INF- α e INF- β), com a finalidade de inibir a replicação viral e ao mesmo tempo ativar a células Natural Killer (NKs) para matar as células portadoras do vírus. No entanto, estudos têm demonstrado que as proteínas E6 e E7 do HPV16 desregulam negativamente a produção de INFs tipo I nas células hospedeiras. Assim, uma das possíveis forma do HPV evadir o sistema imune do hospedeiro pode ser através da inibição do efeito anti-viral da imunidade inata através da desregulação do INFs tipo I (GRANDVAUX et al., 2002).

As células NKs têm um importante papel no controle da infecção viral na imunidade inata, visto que essa subpopulação de linfócitos inespecíficos causa a morte de células infectadas pelo vírus ou células tumorais, que não apresenta a expressão superficial do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012). Um estudo demonstrou que a atividade das células NKs estão associadas a regressão de lesões pré-neoplásicas, por induzir a morte de células infectadas pelo HPV (LEE et al., 2001). Adicionalmente, outro estudo identificou uma redução significativa nos receptores de ativação NKp30, NKp46 e NKG2D, em HSIL e carcinoma cervical diante da infecção pelo HPV16, sugerindo um mecanismo de evasão associado a

baixa atividade das células NKs, favorecendo a persistência da infecção pelo HPV16 e a progressão do câncer cervical (GARCIA-IGLESIAS et al., 2009).

Os macrófagos tem um importante papel na imunidade inata do hospedeiro tanto na infecção pelo HPV, quanto na carcinogênese cervical (CHEN et al., 2017). Os macrófagos são ativados pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através dos receptores Toll likes (TLRs) (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012). Uma vez ativados, pela via clássica, esses macrófagos (M1) produzem citocinas e quimiocinas. Os macrófagos M1 podem conduzir a uma resposta inflamatória, e estimular a morte de células infectadas pelo HPV via secreção do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) ou citotoxicidade dependente de anticorpo (ROUTES et al., 2005). Durante o processo inflamatório, os monócitos precisam ser recrutados para o local da injúria, e a proteína de quimioatração de monócito (MCP-1) realiza essa função. Queratinócitos normais (sem estresse de lesão) infectadas pelo HPV secretam MCP-1, estimuladas por TNF- α , podendo promover uma resposta antiviral durante a imunidade inata. No entanto, em células NIC e câncer cervical a secreção de MCP-1 é diminuída pela proteína E6 do HPV16, podendo inibir a translocação de macrófago para o sítio da infecção pelo HPV (HACKE et al., 2010). Esse mecanismo pode ser uma das possíveis evasões do HPV ao sistema imune inato, deixando o hospedeiro mais susceptível ao desenvolvimento de câncer cervical.

As células apresentadoras de antígeno (APCs), incluindo células dendríticas (CD) e macrófagos, capturam proteínas do HPV e as digere na forma de peptídeos. Em seguida, essas APCs ativadas são transportadas para os linfonodos, onde estes peptídeos virais serão expostos ao MHC de classe II, presentes na superfície dos linfócitos. Esta apresentação de antígeno acontece para os linfócitos T CD4+, os quais são diferenciados em linfócitos T auxiliares, e para os linfócitos TCD8+, que se diferencia em linfócito T citotóxico, dando início a resposta imune adaptativa (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012). Os linfócitos T auxiliares podem se diferenciar em células Th1 ou Th2. As células Th1 liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- α , Interferon-gama (IFN- γ) e Interleucina-12 (IL-2) que estimulam a ativação dos linfócitos T citotóxica, tornando-a uma célula efetora, capaz de matar células de NIC e câncer cervical, que apresentam antígenos do HPV (MOTAVALLI KHIAMI et al., 2018). Enquanto que células Th2 produzem citocinas como IL-10, IL-4 e IL-13, que possuem efeitos supressores na imunidade celular, bloqueando uma resposta contra células neoplásicas, e favorecendo o crescimento do tumor (GUIMARÃES et al., 2011). Um estudo recente tem indicado que os linfócitos T citotóxicos são mais frequentes em mulheres com citologia normal e infecção pelo HPV quando comparado com pacientes com câncer

cervical e HPV positivo (LIANG et al., 2018). Em adição, em outro estudo a resposta de linfócito T citotóxico na presença da proteína E6 e ausência de E7 do HPV16 mostrou associação com a “clearance” (eliminação) da infecção viral (NAKAGAWA et al., 2010).

2.7.1 Citocinas

Durante a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de células neoplásicas pode ser induzida uma imunoestimulação por citocinas secretadas por células Th1, tais como, TNF- α , IFN- γ , Interleucina-2 (IL-2) e IL-12, que estimulam a imunidade mediada por células, conduzindo a atividades antiviral e/ou supressoras de tumor. Por outro lado, as citocinas produzidas por células Th2, tais como, Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8) e Interleucina-IL-10, são imunoinibitórias de resposta mediada por células, e conduz a uma imunidade humoral (PARADKAR et al., 2014). Estudos têm demonstrado altos níveis de citocinas secretadas por células Th2 e baixos níveis de citocinas produzidas por células Th1 em mulheres com câncer cervical (BERMUDEZ-MORALES et al., 2008; TORRES-POVEDA et al., 2012, 2016). A predominância local de citocinas do tipo Th2 estaria inibindo a produção de citocinas do tipo Th1, promovendo uma imunossupressão no microambiente da infecção, e favorecendo o desenvolvimento de câncer cervical. Considerando estes aspectos, um estudo recente relatou que um desequilíbrio nos níveis de produção entre citocinas do tipo Th1 e Th2 está associado com a susceptibilidade à infecção pelo HPV e desenvolvimento do câncer cervical (TORRES-POVEDA et al., 2016).

Vários estudos têm investigado o perfil de citocinas em NIC, câncer cervical e HPV positivo (QIAN et al., 2010; TJIONG et al., 1999). Um aumento significativo das citocinas IL-1 α/β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-8, Interleucina-17 (IL-17), TNF- α , Fator de transformação do crescimento (TGF- β 1 do inglês: *Transforming growth factor*) e Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi encontrado em tecido e secreção do colo uterino e níveis séricos de mulheres diagnosticadas com NIC e câncer cervical (PARADKAR et al., 2010; QIAN et al., 2010; SHEKARI et al., 2012a; TJIONG et al., 1999; TORRES-POVEDA et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Enquanto que as citocinas Interferon-alfa (IFN- α), Interferon-beta (IFN- β), IFN- γ , IL-12 e IL-2 têm sido mostradas com níveis significativamente reduzidos em mulheres com carcinoma cervical (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002; LI et al., 2005; ZIJLMANS et al., 2007).

2.7.1.1 TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória secretada principalmente por macrófagos durante a inflamação aguda, e por células Th1 (PARADKAR et al., 2014). Esta citocina possui uma importante função antiviral e antitumoral, pela sua capacidade de induzir apoptose de células infectadas e neoplásicas (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010).

Diversos estudos têm mostrado as múltiplas funções do TNF- α na resposta contra células infectadas pelo HPV e doenças cervicais. Células normais dos queratinócitos infectadas por HPV ativa o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que por sua vez estimulando a hiper-regulação da p21, que inibe a quinase dependente de ciclina, diminuindo a ativação de proteínas mitóticas. Considerando que a replicação do DNA do HPV depende da atividade mitótica da célula hospedeira, este mecanismo pode ser um importante meio de controlar a expansão da infecção viral. Entretanto, a atividade anti-proliferativa do TNF- α pode ter sua ação inibida pela proteína oncogênica E6 do HPV, através da ligação desta proteína no receptor ativador de apoptose, inibindo a morte programada da célula.

Este mediador inflamatório multifuncional pode ser considerado uma faca de dois gumes. Se por um lado o TNF- α estimula a apoptose de células neoplásicas, por outro lado tem a capacidade de promover o crescimento, proliferação, angiogênese, invasão e metástase de células neoplásicas, através da indução de IL-8 e VEGF, favorecendo o crescimento e expansão do tumor (WANG; LIN, 2008). Altos níveis de expressão do gene *TNFA* tem sido identificado em tecido de leões pré-cancerígenas e câncer cervical. De acordo com dados da literatura, alterações nos níveis de produção de TNF- α pode promover respostas imunológicas diferenciadas do hospedeiro contra o HPV, e conduzir a susceptibilidade a lesões cervicais.

2.7.1.3 IL-10

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória, que tem um papel imunossupressor, especialmente durante uma resposta imune contra organismos patogênicos e células tumorais, promovendo a eliminação inadequada de vírus, como o HPV, e a persistência dessa infecção, favorece o crescimento do tumor (PARADKAR et al., 2014). A IL-10 diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , bloqueando a indução de uma resposta inflamatória contra patógenos (BIJJIGA; MARTINO, 2011). Esta regulação negativa ocorre através do bloqueio da ligação NF-

kB/DNA, impedindo a transcrição dos genes dessas citocinas pró-inflamatórias (KOHNO et al., 2003).

Um estudo propôs que a IL-10 em conjunto com TGF β 1 promove uma evasão ao sistema imune através de uma atividade imunossupressora no microambiente cervical, em mulheres infectadas por HPV (TORRES-POVEDA et al., 2012). Altos níveis locais de IL-10 tem sido encontrado em secreção cervicovaginal em mulheres com NIC associado a infecção pelo HPV (MHATRE et al., 2012). Ademais, os níveis séricos de IL-10 mostram também ser significativamente alto em mulheres com NIC e câncer cervical invasivo, quando comparado com mulheres saudáveis (FENG et al., 2012).

2.8 Polimorfismos em genes de citocinas

Polimorfismos são variações na sequência de DNA que são decorrentes de mutação, com uma frequência maior que 1% da população. Podem ocorrer de diferentes formas: como inserção ou deleção de segmento de DNA ao longo do genoma; no padrão de repetição de nucleotídeos, conhecidos como número variável de repetições em tandem (VNTR – do inglês: variable number of tandem repeats) ou microssatélites; e por fim, o SNP caracterizado pela troca de um nucleotídeo por outro. Os SNPs são os tipos de polimorfismos mais frequentes na maioria dos genomas, e podem estar localizados em diferentes regiões de um gene, incluindo éxons, introns e regiões reguladoras (como por exemplo, o promotor) (GRIFFITHS et al., 2006).

Os SNPs estão presentes em vários genes envolvidos no sistema imunológico, e são associados a variações fenotípicas que contribuem na susceptibilidade de diversas doenças (CARDOSO et al., 2011). Recentemente, estudos têm demonstrado a associação de polimorfismos em genes de citocinas com a susceptibilidade a inúmeras patologias, como, doenças alérgicas: Asma brônquica (NASSER; EZZAT, 2018), rinosinusite crônica; infecciosas: hanseníase (SALES-MARQUES et al., 2017), dengue (SANTOS et al., 2017b); e diversos tipos de cânceres: câncer intestinal (CÁRDENAS et al., 2018) e câncer cervical (TORRES-POVEDA et al., 2016).

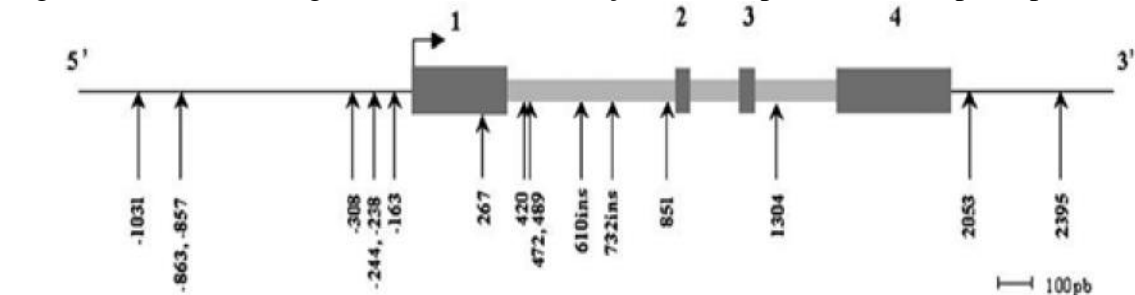
Os SNPs em genes de citocinas podem alterar a função ou atividade transcricional e, em muitos casos, promover variações nos níveis de expressão gênica (KROEGER; CARVILLE; ABRAHAM, 1997). Esta alteração nos níveis de produção das citocinas pode fornecer variadas respostas imunes contra o HPV, e está associada a diferenças na susceptibilidade do hospedeiro a infecção (TORRES-POVEDA et al., 2016). Considerando

tais aspectos, vários estudos têm investigado a associação de SNPs em genes de citocinas com a susceptibilidade a infecção pelo HPV, NIC e câncer cervical (SHI et al., 2013; WANG et al., 2012). SNPs presentes nos genes *TNFA* (-308G>A, -238G>A), *IL-1B* (-511T>C), *IL-6* (-174G>C), *IL-12B* (+1188A>C), *IFNG* (+874A>T), *IL-10* (-1080A>G, -819C>T, -592C>A), foram associados ao aumento ou diminuição do risco de desenvolver NIC e câncer cervical (CALHOUN et al., 2002; CHAGAS et al., 2013; CHEN et al., 2009; DUARTE et al., 2005; DUTTA et al., 2015; MARANGON et al., 2013; SHI et al., 2014; WANG et al., 2011).

2.8.1 *TNFA* -308G>A (rs1800629)

O gene *TNFA* está localizado no cromossomo 6 (6p21.3), na região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, tendo um comprimento de aproximadamente 3 kilobases (kb) que compõe 4 éxons responsáveis por codificar a citocina TNF- α (BAYLEY; OTTENHOFF; VERWEIJ, 2004; BOIN et al., 2001; FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004). A regulação transcricional do gene *TNFA* é um importante mecanismo para evitar condições adversar a homeostase através da produção inadequada ou excessiva de TNF- α . Polimorfismos localizados na região promotora do gene *TNFA* podem alterar a transcrição e expressão gênica, e promover variações imunológicas que conduzem a susceptibilidade de diversas doenças.

Figura 8 - Estrutura do gene *TNFA* e a localização de seus polimorfismos principais



5' ___ região promotora

■ éxons

□ introns

___ 3' 3'UTR

Fonte: Code, 2010.

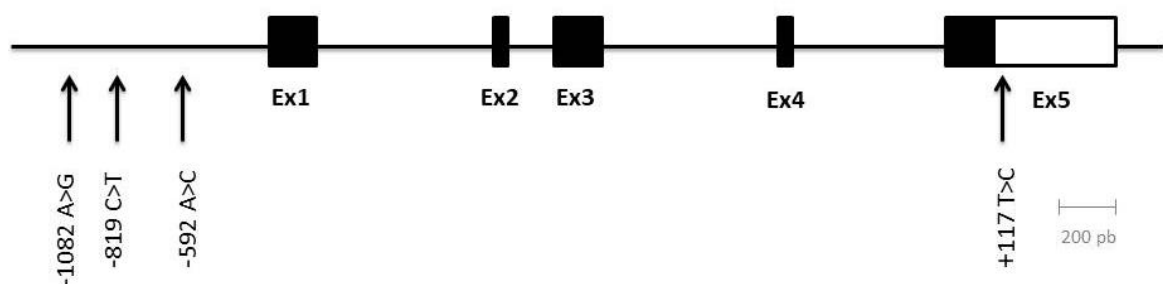
Nota: Polimorfismos no gene *TNFA* nas regiões promotora, éxons, íntrons e 3'UTR (___3').

No gene *TNFA* polimorfismos são localizados na região promotora, transcrita (éxos e íntros) e 3'UTR. Uma importante variável no gene *TNFA* é o SNP -308 G>A (rs1800629) presente na região promotora, que se destaca por ser o polimorfismos mais estudado deste gene. O SNP -308 G>A é denominado dessa forma por está localizado a 308 nucleotídeos anteriormente ao início da região transcrita. Sua variante consiste na transição de uma Guanina (G) por uma Adenina (A). A presença do alelo A na posição -308 possui maior afinidade a fatores transcripcionais culminando em uma maior produção da citocina (BAYLEY; OTTENHOFF; VERWEIJ, 2004). Estudos mostraram associação deste polimorfismo com a susceptibilidade a diversos tipos de doenças, tais como a dengue, diabetes Mellitus, esquizofrenia, anemia, artrite reumatoide e câncer cervical relacionado a infecção pelo HPV (FENG et al., 2011; HOPPE et al., 2007; HUANG et al., 2011; SANTOS et al., 2016).

2.8.3 *IL-10* -819 C>T (rs1800871)

O gene que codifica a citocina IL-10 está localizado no cromossomo 1 entre 1q31 e 1q32, ocupando aproximadamente 5 kb, que comporta 5 éxons. Vários polimorfismos são estão presentes em diferentes regiões do gene IL-10. Os mais conhecidos e estudados são três SNPs presentes na região promotora (-1082A>G, -819C>T, -592A>C) e um no éxon 5 (+117 T>C) (figura 9).

Figura 9 - Localização e estrutura do gene *IL-10* no cromossomo 1, e a identificação dos seus polimorfismos



Fonte: Aguilon, 2002.

Nota: Ex: éxons; SNPs -1082A>G, -819C>T, -592A>C localizados na região promotora do gene IL-10.

Vários estudos encontraram associação do SNP *IL-10* -819 C>T (rs1800871) com vários tipos de câncer em humanos. Um estudo recente associou o SNP *IL-10* -819C>T com o câncer intestinal na população colombiana (CÁRDENAS et al., 2018). Análises metanalíticas identificaram uma associação entre este polimorfismo e o aumento do risco para o câncer de mama (MOGHIMI et al., 2018). Na população do Egito, o SNP *IL-10* -819C>T foi associado a susceptibilidade a leucemia mielóide aguda (RASHED et al., 2018). Além disso, estudos recentes encontraram associações significativas entre este polimorfismo e o câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV (DU et al., 2019; TORRES-POVEDA et al., 2016).

A atividade transcricional do gene *IL-10* pode ser regulada pelo haplótipo de três SNPs (-1082A>G, -819C>T, -592A>C) localizados na região promotora (ESKDALE et al., 1997; KIM et al., 1992). Estes SNPs afetam a atividade transcricional do gene *IL-10*, resultando em um aumento ou diminuição nos níveis de expressão gênica. O haplótipo GCC (-1082, -819, -592) mostrou aumentar significativamente os níveis de produção da *IL-10* (TESSE et al., 2012). Entretanto, no estudo de Singhal et al., (2014) o haplótipo GTC (-1082, -819, -592) mostrou aumentar os níveis séricos de *IL-10* em mulheres diagnosticadas com carcinoma cervical. Portanto, os resultados da literatura mostram que os polimorfismos presentes na região promotora do gene *IL-10* podem afetar a síntese da citocina e influenciar na susceptibilidade a diversas patologias, incluindo o câncer cervical causado por HPV.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a influência dos polimorfismos *TNFA* -308G>A (rs1800629), *IL-10* -819C>T (rs1800871) na susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas por HPV do agreste alagoano.

3.2 Específicos

- Realizar uma revisão sistemática com meta-análise com os polimorfismos do estudo;
- Detectar a presença do HPV em mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde no município de Arapiraca;
- Avaliar a associação dos polimorfismos *TNFA* -308G>A, *IL-10* -819C>T na susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Para cumprir com as resoluções nº 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos, o projeto foi submetido à plataforma Brasil para fins avaliativos dos aspectos éticos pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), obtendo aprovação em janeiro de 2015 (número do parecer: 921.700) (ANEXO I).

Todas as participantes do estudo foram orientadas acerca da pesquisa, e aquelas que consentiram seu envolvimento assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) autorizando sua participação no projeto (ANEXO II).

4.2 População e local do estudo

O estudo foi realizado com a população da região metropolitana do agreste alagoano que está localizado no centro de Alagoas, ocupando uma área de aproximadamente 5.769 km² (DEEPASK, 2015). A região é composta pela cidade de Arapiraca e mais 19 municípios circunvizinhos, como Campo Grande, Coité do Noia, Craíbas, Feira Grande, Girau do Ponciano, Igaci, Junqueiro, Lagoa da Canoa, Limoeiro de Anadia, Olho d'Água Grande, São Sebastião, Taquarana, Traipu, Palmeira dos Índios, Estrela de Alagoas, Belém, Tanque d'Arca, São Brás e Jaramataia. É considerada a segunda região metropolitana de Alagoas, com uma estimativa de 662.046 habitantes (IBGE, 2015). As coletas e acesso ao banco de amostras com câncer cervical foram obtidos na cidade de Arapiraca, a qual designa o centro de referência do agreste para consultas ginecológicas e análises patológicas.

4.3 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, realizado em uma amostra da população do agreste alagoano. A amostra da população estudada foi composta por mulheres maiores de 18 anos, que já haviam iniciado a atividade sexual, e residiam no agreste de Alagoas. Os critérios de inclusão para selecionar os grupos casos foram: mulheres diagnosticadas com câncer cervical e com resultado positivo para a infecção pelo HPV. O grupo controle foi constituído por mulheres clinicamente saudáveis, com exame citopatológico normal e

diagnóstico negativo para o HPV. Os critérios de exclusão foram: mulheres imunossuprimidas, com imunodeficiência, menores de 18 e grávidas.

4.4 Coleta e armazenamento das amostras

4.4.1 Amostras do grupo controle

Inicialmente as amostras foram coletadas por demanda espontânea. Os materiais foram coletados de mulheres que buscaram atendimento ginecológico em cinco centros de saúde (1º, 2º, 3º, 4º e 5º centro) e duas unidades básicas (Cacimbas e Manoel Teles) do município de Arapiraca pelo convenio do Sistema Único de Saúde (SUS), no período de novembro de 2014 a dezembro de 2015. Todas as pacientes passaram por avaliação clínica (anamnese, exame físico, seguida da inspeção vulvar e do colo uterino). Posteriormente, o material cervical foi coletado através da colpocitologia oncótica (Papanicolau), da qual se procederam amostras da endocervice e ectocervice por meio da descamação celular com auxílio de escova cervical estéreo e espátula de Ayre. Realizou-se esfregação das escovas cervicais e espátulas em lâminas para análise citológica. Posteriormente a escova cervical foi conservada em tubos de 2 mL etiquetados com um código de identificação da paciente, contendo 600 µL de PBS (Tampão fosfato salina 10 Mm pH 7,4), os quais foram destinadas a extração do DNA para identificação viral. As amostras foram preservadas em refrigeração durante o transporte e conservadas a -80 °C.

A colpocitologia oncótica foi procedida por discentes de enfermagem capacitados pela UFAL e supervisionados por enfermeiros das referidas atenção básica. Estes alunos de enfermagem envolvidos nas coletas participam de projetos de extensão da UFAL: “Vigilância em Saúde: um enfoque multiprofissional” do Programa de Ações Interdisciplinares (PAINTER) e “Ações integradas em saúde do adulto: com foco em vigilância em saúde e doenças sexualmente transmissíveis (DSTs)”, aprovado no Edital 2014/2015 do Programa institucional de bolsas de iniciação à pesquisa – AÇÃO (PIBIP-AÇÃO).

Para a análise dos polimorfismos foi realizada a coleta de células do epitélio bucal ou sangue periférico total. Na coleta das células do epitélio bucal, foi solicitado, a princípio, lavagem bucal com 100 mL de água destilada; posteriormente, foi realizada a descamação das células superficiais com auxílio de escova citológica esterilizada, em movimentos circulares de aproximadamente 30 vezes. O material foi armazenado em tubos de 2 mL contendo 400 µL de TES (TRIS HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM pH 7,6; SDS 0,6%), sob refrigeração. A coleta de sangue periférico foi realizada com agulha vacutainer, tubo de citrato de sódio e

conservadas a -4°C . Todas as amostras foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica da Universidade Federal de Alagoas (LABMEG-UFAL), Campus Arapiraca.

4.4.2 Amostras do grupo caso

Todas as mulheres que participaram do projeto nas unidades básicas de saúde apresentaram resultados citológicos dentro dos limites da normalidade. Portanto, foi necessária a utilização de um banco de amostras do Núcleo de prevenções e diagnóstico de câncer (NPDC) do município de Arapiraca, para compor o grupo caso. O banco continha 141 amostras com diagnóstico confirmado para o carcinoma cervical, no período entre 2015 a 2017. Os tecidos se encontravam embebidos em parafina no formato de blocos quadrados. As amostras foram obtidas a partir de 10 cortes de $10\ \mu\text{m}$ de espessura cada. Em seguida, os cortes foram armazenados em tubos de 2 mL. Antes da extração de DNA, estas amostras foram submetidas a lavagem com xilol para retirada da parafina.

4.5 Procedimentos de biologia molecular

4.5.1 Extração de DNA

Foram realizadas quatro diferentes coletas de material biológico: sangue periférico, células do esfregaço da mucosa oral, células do esfregaço do colo uterino e tecido parafinado. As extrações de DNA genômico humano das amostras de sangue periférico, células do esfregaço do colo uterino e tecido parafinado foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial Promega® (Company Eppendorf, Hamburg, Germany). A extração do material genético a partir de células do esfregaço da mucosa oral foi realizado pelo método utilizando NaCl, etanol a 70%-99,8%, e proteinase K diluída em 10 mg/mL através do método salting out de acordo com Abrão (2005). As amostras de DNA extraídas foram armazenadas a -20°C em tubos de 1,5mL etiquetados em forma de códigos para preservar a identidade dos pacientes.

4.5.2 Quantificação e verificação do estado do DNA

Para avaliar o quantitativo e qualitativo das amostras extraídas foi realizada quantificação das mesmas por meio da técnica de espectrofotometria (Biophotometerplus,

Eppendorf), e a razão das absorvâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (nanômetro) que estiveram entre 1,7 e 1,9 apresentaram um DNA mais puro.

Em seguida, o material foi aplicado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese a 100 V (volts) por 80 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas através do transluminador com luz UV (Ultra Violeta) e posteriormente fotografadas por meio do equipamento sistema de fotodocumentação de gel L.PixTransilluminator (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) para verificar a integridade do DNA.

4.5.3 Detecção do HPV

As amostras que apresentaram uma concentração satisfatória (>20 ng/ μ L) e um estado adequado de DNA no gel foram submetidas à amplificação por PCR com primers específico para o gene da β -actina humana forward (5'- AGCGGGAAATCGTGCGTG - 3') e reverse (5' - GGTGATGACCTGGCCGTC - 3') que amplifica um fragmento de 134 pb, o qual consiste em um gene estrutural usado para verificar a qualidade do DNA e também como controle interno da reação. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 μ L, contendo 6,25 μ L de GoTaq® Green Master Mix (Promega®), 1 μ L de cada primer (forward, reverse) e 3,25 μ L de H₂O livre de nuclease. As reações de amplificações foram realizadas em equipamento termociclador Swift® de ESCO®, sob as seguintes condições: 95 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 5 minutos. Em todos os conjuntos de reações foram usados controles negativos, formados por todos os reagentes, exceto as amostras de DNA. Os resultados das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese e visualizados em gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio e, em seguida fotografados por meio do equipamento de captura de imagem L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

As amostras positivas para o gene β -actina humana foram destinadas à PCR com os primers MY09 e GP5+/GP6+ para amplificação do gene L1, localizado no material genético do vírus HPV. Para aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico e diminuir a probabilidade de resultados falso-positivos, foi realizado a técnica de nested-PCR de acordo com Demathe et al. (2010). Desse modo, 1 μ L do produto da amplificação por PCR com os iniciadores MY09/MY11 foram submetidos à outra reação de PCR, utilizando-se os iniciadores GP5+/GP6+. A PCR de ambos iniciadores foi realizada em 12,5 μ L de volume final, contendo 6,25 μ L de GoTaq Green Master Mix, 1 μ L de cada primer (MY09/MY11-

GP5+/GP6+) e 3,25µL de H₂O livre de nucleases. O produto da reação de PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio, e posteriormente fotografado pelo aparelho L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia). As informações sobre a sequência dos primers utilizados na detecção do HPV, bem como os ciclos e o tamanho dos fragmentos esperado na amplificação por PCR estão contidas na Tabela 1.

4.5.4 Genotipagem dos polimorfismos

As amostras de DNA extraído que apresentaram absorvância maior ou igual a 20 ng/µL, razão das absorvâncias 260/280 nm entre 1,7-1,9, e que foram visualizadas após corrida eletroforética foram diluídas na concentração de 4 ng/µL. Os genótipos dos participantes da pesquisa em relação ao SNP -308 G>A (rs1800629) do gene *TNFA* e -819C>T (rs1800871) do gene *IL-10* foram determinados pelo método de discriminação alélica através da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real utilizando sonda TaqMan.

Tabela 1 - Iniciadores de oligonucleotídeos e condições da reação utilizadas na detecção do HPV através da técnica nested Polymerase Chain Reaction (nPCR).

Iniciadores	Ciclos da reação	Tamanho do fragmento	Gene alvo
MY09 5' - CGTCCMARRGGAWACTGATC -3'	95 °C por 2min. 95 °C por 30s 55 °C por 1min.	34x	450pb
MY11 5' - GCMCAGGGWCATAAYAATGG - 3'	72 °C por 1min. 72 °C por 5min.		
GP5+ 5' - TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC - 3'	95 °C por 2min. 95 °C por 1min. 45 °C por 1min.	35x	150pb
GP6+ 5' -GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC -3'	72 °C por 1min. 72 °C por 5min		

Fonte: Autor desta pesquisa, 2018.

O volume final da reação foi de 10µL, contendo 5µL de solução TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems® - TaqDNA polimerase, desoxirribonucleotídeos trifosfatados e tampão com MgCl₂); 0,125µL de sonda referente aos SNPs rs1800629 (*TNFA* -308G>A) e rs1800871 (*IL-10* -819C>T) e 4,87 µL de DNA extraído (4 ng/µL). As reações foram realizadas em equipamento ABI StepOneplus da Applied Biosystems® sob as seguintes condições: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 92 °C por 15s, 60 °C por 1min. Em todas as reações foram usados controles negativos, formados por todos os reagentes,

exceto a amostra de DNA. Os resultados das reações foram fornecidos pelo StepOne Software versão 2.2.2 em forma de gráfico com as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada indivíduo.

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas do estudo foram feitas através do *software* SPSS 23.0. As frequências genótípicas foram testadas quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) por meio do teste qui-quadrado (χ^2). As associações genótípicas e alélicas entre os grupos do estudo foram comparadas mediante a regressão logística, onde foi obtido valores de associação e Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Valor de OR<1 indica a proteção, enquanto OR>1 indica o risco. As associações genótípicas foram comparadas em diferentes modelos genéticos (codominate, dominate, recessivo, sobredominate e log aditivo). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos. Análise do poder do tamanho da amostra foi conduzido pelo software G*power versão 3.0, utilizando os testes Qui-quadrado, Goodness-of-fit: Contingency tables e Post hoc, segundo Silva et al. (2016).

4.7 Método da meta-análise

Esta revisão sistemática com meta-análise foi realizada como procedimento estabelecido (PROSPERO ID: CRD42017065227) (TACCONELLI, 2010). Para elaboração e planejamento desta revisão sistemática foi utilizada a lista de verificação PRISMA (Itens de Relatórios Preferidos para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises) (MOHER et al., 2009). As buscas foram realizadas nos bancos de dados MEDLINE, Scielo, BIREME, Pubmed, Scopus, Web of Science e Science Direct para estudos de casos-controles, utilizando as combinações dos seguintes termos: “*human papillomavirus*”, “HPV”, “*cytokine*”, “*cervical cancer*”, “*cervical carcinoma*”, “*cervical intraepithelial neoplasia*”, “*Squamous intraepithelial lesions*”, “*cervical lesions*” and “*polymorphism*”, sem restrição de período.

O método PICOS foi utilizado para definição dos descritores (SANTOS; PIMENTA; NOBRE, 2007). Participantes destes artigos foram pacientes (P) com câncer cervical ou neoplasia intraepitelial cervical; a intervenção (I): identificação de polimorfismos em genes de citocinas; em comparação aos grupos controle (C): ausência de HPV no grupo controle; desfecho (O): presença ou ausência de polimorfismos em genes de citocinas no grupo de

pacientes com câncer cervical ou neoplasia intraepitelial cervical; Desenho do estudo (S): caso-controle.

Os critérios de elegibilidade incluíram: (1) estudos de caso-controle que investigaram a relação entre SNPs em gene de citocinas e suscetibilidade a lesões pré-cancerígenas e câncer cervical, associados ou não à infecção pelo HPV; (2) com pelo menos uma das seguintes características no grupo caso: mulheres diagnosticadas com câncer cervical; mulheres com câncer cervical e HPV positivo, mulheres diagnosticadas com lesões intraepiteliais escamosas ou mulheres com lesões intraepiteliais escamosas e HPV positivo; (3) os grupos controles devem ter os seguintes perfis: mulheres saudáveis com citologia normal, livres de doença cervical e HPV negativo; (4) artigos completos disponíveis eletronicamente em inglês ou português e (5) frequência genotípicas suficientes ou dados originais apresentados.

Os critérios de exclusão incluíram: (1) Artigos com dados sobre polimorfismos não mostrados; (2) artigos duplicados; (3) Inconsistência dos artigos de acordo com os critérios de inclusão; (4) Artigos com outros SNPs que não sejam em genes de citocinas; (5) Artigos com outros tipos de polimorfismos, além de SNPs; (6) Estudos in vitro, revisão e coorte.

Os títulos, resumo e texto completo dos artigos foram avaliados por três autores para aplicar os critérios de inclusão e selecionar os estudos de interesse. Inconsistências entre os pesquisadores foram elucidadas através de debates para reavaliar a qualidade metodológica. A avaliação foi baseada em três dimensões: seleção, comparabilidade e exposição em estudos de caso-controle. Três investigadores avaliaram independentemente a qualidade dos estudos incluídos usando os padrões da Escala de *Newcastle-Ottawa* (NOS) (STANG, 2010). Estudos que tivessem escore 7 ou mais, considerados de média a alta qualidade, foram incluídos na revisão, conforme relatado em outros estudos (SANTOS et al., 2017a). As seguintes informações em estudos foram extraídas: primeiro autor, ano de publicação, etnia, país, amostra de tamanho, idade dos pacientes e controles, método de genotipagem, frequências genotípicas.

O metafor package (NICODEMUS, 2008) na linguagem de programação R e o software Review Manager 5.3 foram usados para análise estatística. O Odds Ratio (OR) e o Intervalo de Confiança de 95% para cada estudo e os resultados agrupados foram calculados para avaliar a sensibilidade. Analisamos os seguintes modelos genéticos: associação alélica, modelo codominante, modelo dominante e modelo recessivo (HORITA; KANEKO, 2015). Valores de OR agrupados foram estabelecidos pelo teste Z (valor de $p > 0,05$). O teste χ^2 foi utilizado para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) considerando valor de $p > 0,05$ como significativo. A heterogeneidade foi examinada por Q^2 (HIGGINS et al., 2003) e

estatística I² (HIGGINS; THOMPSON, 2002). Quando o fator genético tem um resultado semelhante na suscetibilidade à doença nos estudos incluídos em uma meta-análise é usado o modelo de efeito fixo (na ausência de heterogeneidade) ou modelo aleatório (na presença de heterogeneidade) (DERSIMONIAN; LAIRD, 1986). O teste de Egger foi usado para detectar viés nas comparações (EGGER; SMITH; PHILLIPS, 1997).

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos gerais

As características gerais como idade, infecção pelo HPV e tipo de câncer do colo de útero estão listadas na tabela 2. A distribuição categorizada por faixa etária (≤ 35 anos, 36-50, >50) não foi significativamente diferente entre os grupos câncer cervical e controles ($p=0,144$). O tipo de câncer cervical mais frequente no grupo caso foi o carcinoma de células escamosas no estágio in situ com 77,8% ($n=35$), e o menos frequente foi o adenocarcinoma no estágio in situ com 4,4% ($n=2$) (tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização dos grupos câncer cervical e controles saudáveis

	*CC n (%)	Controles n (%)	χ^2	P
Idade (Média)				
Idade por faixa etária				
≤ 35 anos	10 (22,2%)	58 (32,4%)	3.873	0.144
36-50	26 (57,8%)	54 (30,2%)		
>50	9 (20%)	48 (26,8%)		
Não relataram idade	0 (0%)	19 (10,6)		
Infecção pelo HPV				
HPV-positivo	45 (100%)	0 (0%)		
HPV-negativo	0 (0%)	179 (100%)		
Tipo de câncer				
Carcinoma de células escamosas (in situ)	35 (77,8%)			
Carcinoma de células escamosas (invasivo)	4 (8,9%)			
Adenocarcinoma (in situ)	4 (8,9%)			
Adenocarcinoma (invasivo)	2 (4,4%)			

Fonte: Autor desta pesquisa, 2019.

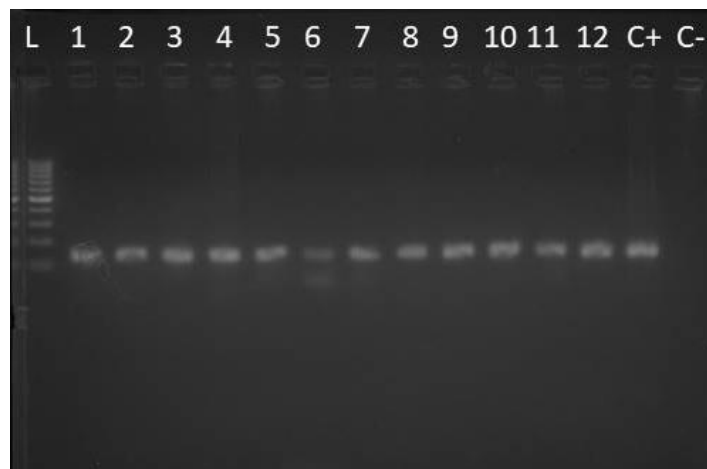
*CC = carcinoma cervical

5.2 Detecção do HPV

Foi utilizado um banco de amostras de mulheres diagnosticadas com câncer cervical do Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer (NPDC) do município de Arapiraca, contendo 141 blocos de tecido parafinado no período entre 2015 a 2017. Dentre as 141 amostras, 96 não amplificaram na PCR do controle interno e da detecção viral, resultando de um material genético degradado após o procedimento de extração de DNA. Das que

amplificaram 100% (n=45) apresentaram HPV positivo. Portanto, o grupo caso do estudo foi constituído por estas 45 amostras (tabela 2). 179 mulheres que foram submetidas ao exame preventivo de rotina apresentaram resultados negativos para a infecção pelo HPV, e foram incluídas no grupo controle. O diagnóstico molecular do HPV foi realizado por nPCR convencional utilizando os primers β -actina humano (forward e Reverse), MY09/11, GP5+/6+, e os resultados foram visualizados em gel de agarose a 2% corado em brometo de etídio, como mostram as figuras 10, 11 e 12, respectivamente.

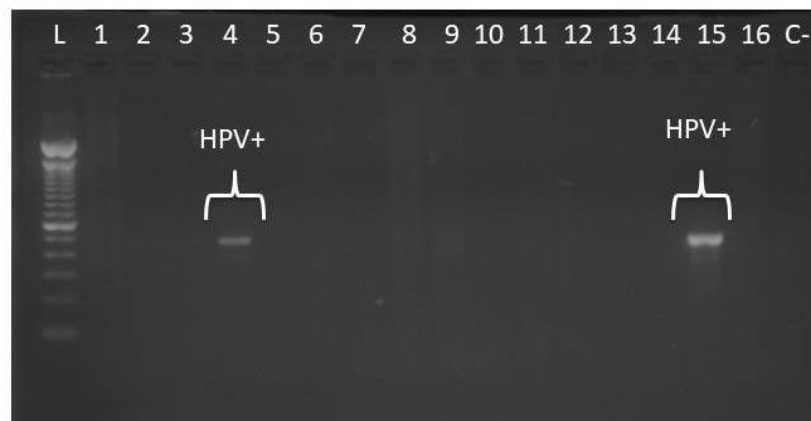
Figura 10 - Gel de eletroforese da PCR com os primers β -actina humano para controle interno da detecção do HPV



Legenda: L- ladder 100pb; 1-12: amostras; C+: controle positivo; C-: controle negativo; tamanho do fragmento: 134pb.

Fonte: Autor desta pesquisa, 2019.

Figura 11 - Gel de eletroforese da PCR com primers MY09/11 que anelam na região L1 do HPV para detecção viral



Legenda: L- ladder 100pb; 1-16: amostras; C-: controle negativo; tamanho do fragmento: 450pb.

Fonte: Autor desta pesquisa, 2019.

Figura 12 - Gel de eletroforese da nPCR com primers GP5+/6+ que anelam na região L1 do HPV para detecção viral



Legenda: L- ladder 100pb; 1-17: amostras; C+: controle positivo; C-:controle negativo; tamanho do fragmento: 150pb.

Fonte: Autor desta pesquisa, 2019.

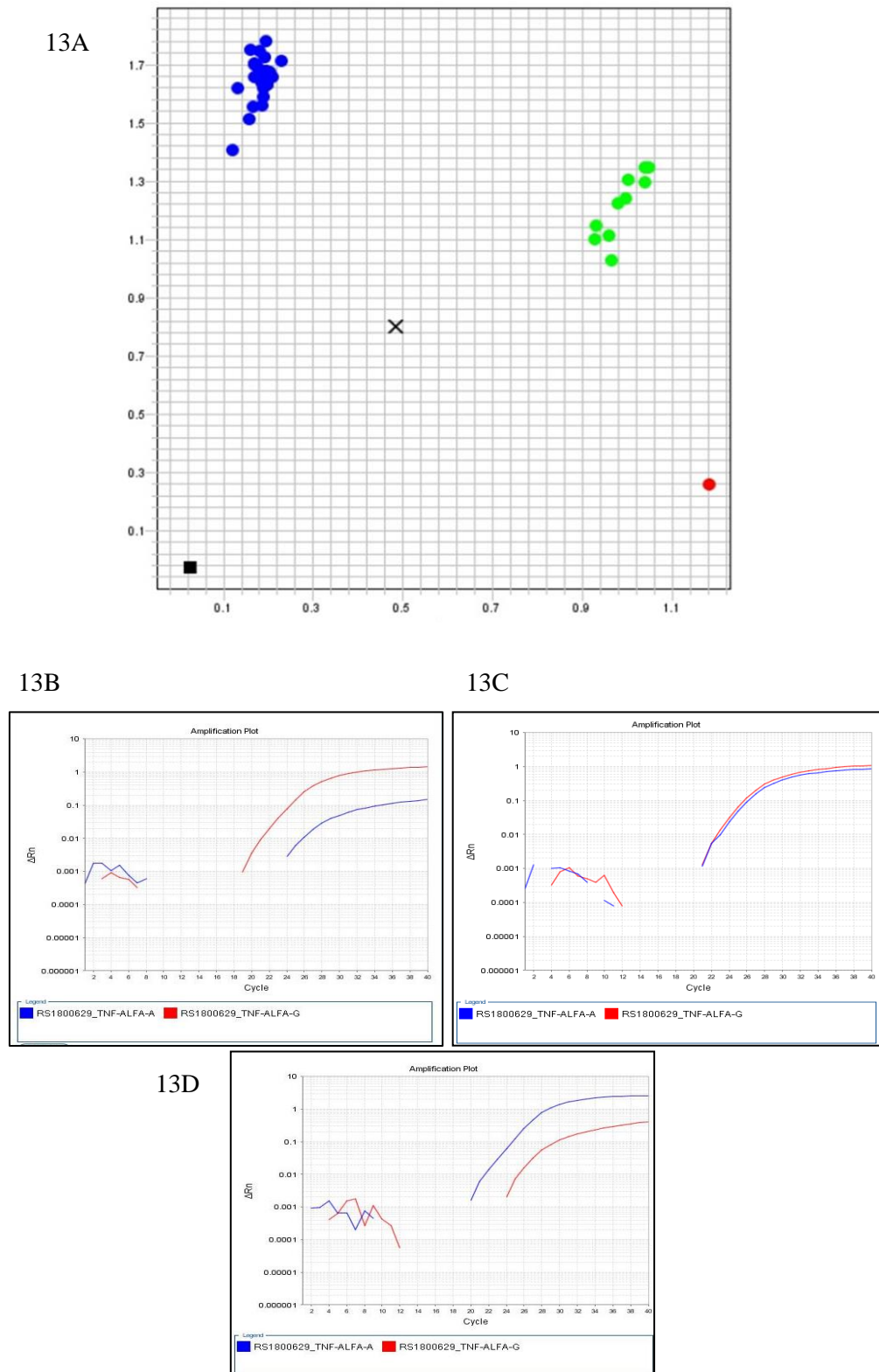
5.3 Genotipagem por discriminação alélica

Os SNPs *TNFA* -308G>A (rs1800629) e *IL-10* -819C>T (rs1800871) foram genotipados por discriminação alélica através da PCR em tempo real, como descrito na metodologia. O sucesso de amplificação e genotipagem foi superior 97% para o SNP *TNFA* -308G>A (rs1800629) (exemplo: figura 13), e 93% para o SNP *IL-10* -819C>T (rs1800629).

5.3.1 Frequência genotípica e alélica do SNP -308 G>A no gene *TNFA*

A tabela 3 mostra as distribuições das frequências alélica e genotípica do SNP *TNFA* -308 G>A, obtidas nos grupos câncer cervical e controles. As análises das frequências genotípicas mostraram que o genótipo ancestral -308G/G foi mais frequente nos dois grupos do estudo: controles (78,2%) e câncer cervical (84,4%). O genótipo raro -308A/A foi ausente no grupo câncer cervical, enquanto no grupo controle apresentou uma baixa frequência (2,2%). Na Tabela 3 estão listados os valores de OR e *p*-valor para determinar as associações alélicas e genotípicas do SNP *TNFA* -308 G>A distribuídas nos modelos genéticos codominante, dominante, recessivo e sobredominante. A comparação das frequências alélicas e genotípicas do SNP *TNFA* -308 G>A não apresentaram diferença significativa entre os grupos do estudo. Entretanto, esta análise mostrou um poder amostral moderado, com 70%, indicando o número amostral limitado.

Figura 13 - Método de discriminação alélica por PCR em tempo real para análise do SNP - 308 (1800629) no gene *TNFA*



Fonte: Autor desta pesquisa, 2019.

Nota: Genotipagem do gene *TNFA* -308G>A. 13A: Cada ponto representa uma amostra. Os eixos determinam a intensidade de fluorescência para cada sonda. Representação dos genótipos: G/G (em azul), G/A (verde) e A/A (vermelho), as amostras indeterminadas (símbolo x), controle negativo (preto). A curva de amplificação 13B representa o genótipo G/G, a 13C o heterozigoto G/A e a 13D o genótipo raro A/A.

Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do SNP *TNFA* -308 G>A e suas associações com o carcinoma cervical

<i>TNFA</i> -308G>A	Controles	CC	Controles versus ¹ CC	² EHW	Gpower
	Nº (frequências)		OR com 95% IC	P	
Associação alélica					
G	315 (88%)	83 (92,2%)	Referência		
A	43 (12%)	7 (7,8%)	0.62 (0.27-1.42)	0.26	
Modelos gênicos					
Codominante	G/G	140 (78,2%)	38 (84,4%)	Referência	
	G/A	35 (19,6%)	7 (15,6%)	0.74 (0.30-1.79)	0.50
	A/A	4 (2,2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	0.99
Dominante	G/G	140 (78,2%)	38 (84,4%)	Referência	
	G/A+A/A	39 (21,8%)	7 (15,6%)	0.66 (0.27-1.60)	0.36
Recessivo	G/G+G/A	175 (97,8%)	45 (100%)	Referência	
	A/A	4 (2,2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	0.99
Sobredominante	G/G+A/A	144 (80,4%)	38 (84,4%)	Referência	
	G/A	35 (19,6%)	7 (15,6%)	0.76 (0.31-1.84)	0,54

Fonte: Autor desta pesquisa, 2019.

¹CC = carcinoma cervical; ²EHW = Equilíbrio de Hardy Weinberg; NA: não avaliado.

5.3.2 Frequência genotípica e alélica do SNP -819 C>T no gene *IL-10*

A tabela 4 apresenta as distribuições das frequências alélica e genotípica do SNP *IL-10* -819 C>T, obtida nos grupos do estudo. A análise das frequências genotípicas mostrou que o genótipo -819C/C (49,1%) foi mais frequente no grupo controle. Enquanto que no grupo câncer cervical o genótipo mais predominante foi o heterozigoto -819C/T (57,1%). A tabela 4 mostra a associação do SNP *IL-10* -819C>T com o câncer cervical. Foi observada uma associação significativa entre o SNP *IL-10* -819 C/T e o câncer cervical.

O genótipo -819C/T (57,1%) no modelo codominante foi significativamente mais frequente no grupo caso em relação ao genótipo -819C/C (28,6%) quando comparado ao grupo controle, -819C/T (38,9%) e -819C/C (49,1%). Portanto, o genótipo -819C/T foi associado com o aumento do risco para o câncer cervical e HPV positivo ($p=0,035$; OR com 95% CI = 2.52 [1.07-5.97]). Em adição, os genótipos -819C/T+TT no modelo dominante foram significativamente mais frequentes no grupo caso quando comparado ao grupo controle. Portanto, os carreadores do alelo -819T também foram associados com o aumento do risco para o câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV ($p=0,037$; OR com 95% CI = 2.41 [1.06-5.50]). Esta associação mostrou um poder amostral de 99%, indicando que a amostra é representativa para esta análise. Estes resultados sugerem que os carreadores T (-819C/T+TT) pode aumentar o risco para o câncer cervical, em mulheres infectadas por HPV.

Tabela 4 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do SNP *IL-10* -819 G>A e suas associações com o carcinoma cervical

<i>IL-10</i> -819C>T	Controles	¹ CC	Controles versus CC	² EHW	Gpower
	Nº (frequências)		OR com 95% IC	P	
Associação alélica					
C	148 (68,5%)	40 (57,1%)	Referência		
T	68 (31,5%)	30 (42,9%)	1.63 (0.94-2.84)	0.083	
Modelos gênicos					
Codominante					
C/C	53 (49,1%)	10 (28,6%)	Referência		
C/T	42 (38,9%)	20 (57,1%)	2.52 (1.07-5.97)	0.035	0.71 99%
T/T	13 (12%)	5 (14,3%)	2.04 (0.59-7.00)	0.258	
Dominante					
C/C	53 (49,1%)	10 (28,6%)	Referência		
C/T+T/T	55 (50,9%)	25 (71,4%)	2.41 (1.06-5.50)	0.037	
Recessivo					
C/C+C/T	95 (88%)	30 (85,7%)	Referência		
T/T	13 (12%)	5 (14,3%)	1.22 (0.40-3.70)	0.728	
Sobredominante					
C/C+T/T	66 (61,1%)	15 (42,9%)	Referência		
e C/T	42 (38,9%)	20 (57,1%)	2.09 (0.97-4.54)	0,061	

Fonte: Autor desta pesquisa, 2018

¹CC = carcinoma cervical; ²EHW = Equilíbrio de Hardy Weinberg

5.4 Meta-análises dos estudos de associação dos SNPs *TNFA* -308G>A (rs1800629) e *IL-10* -819 (rs1800871) na susceptibilidade a lesões intraepiteliais escamosas (SIL), câncer cervical e infecção pelo HPV

A meta-análise foi realizada através de estudos de caso-controle que investigaram a influência dos polimorfismos *TNFA* -308G>A e *IL-10* -819C>T na susceptibilidade ao câncer cervical, SIL e infecção pelo HPV. Após as buscas, seleção e aplicação dos critérios de exclusão, foram incluídos 10 estudos (BARBISAN et al., 2012; CALHOUN et al., 2002; CHAGAS et al., 2013; DUARTE et al., 2005; GOVAN et al., 2006; IVANSSON; JUKO-PECIREP; GYLLENSTEN, 2010; LI et al., 2016; MARANGON et al., 2013; NIEVES-RAMIREZ et al., 2011; SINGHAL et al., 2015). As caracterizações dos estudos estão listadas na tabela 5. O período de publicação foi de 2002 á 2016 em populações de diferentes países, tais como: Brasil (CHAGAS et al., 2013; MARANGON et al., 2013), Estados Unidos (CALHOUN et al., 2002), Portugal (DUARTE et al., 2005), África do Sul (GOVAN et al., 2006), Suécia (IVANSSON; JUKO-PECIREP; GYLLENSTEN, 2010), México (NIEVES-RAMIREZ et al., 2011), Argentina (BARBISAN et al., 2012), Índia (SINGHAL et al., 2015) e China (LI et al., 2016).

Tabela 5 - Caracterização dos estudos incluídos na meta-análise

Autores	País	Grupos	SNPs estudados	EHW
Calhoun et al., 2002	Estados Unidos	Câncer cervical vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	sim
Duarte et al., 2005	Portugal	Câncer cervical vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	-
Govan et al., 2006	África do Sul	Câncer cervical vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	-
Emma, Ivana, Ulf, 2010	Suécia	Câncer cervical vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	sim
Nieves-Ramirez et al., 2011	México	SIL+HPV vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	sim
Barbisan et al., 2012	Argentina	Câncer cervical vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	sim
Chagas et al., 2013	Brasil	SIL+HPV vs. Controles	IL-10 -819C>T (rs1800871)	sim
Marangon et al., 2013	Brasil	SIL+HPV vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629) e IL-10 -819C>T (rs1800871)	sim
Singhal et al., 2014	Índia	SIL vs. Controles; Câncer cervical vs. Controles	IL-10 -819C>T (rs1800871)	sim
Li et al., 2016	China	Câncer cervical vs. Controles	<i>TNFA</i> -308G>A (rs1800629)	sim

Fonte: Autor desta pesquisa, 2018

Dos 10 estudos, 8 identificaram que as distribuições das frequências genotípicas das populações estavam de acordo com EHW (CALHOUN et al., 2002; EMMA, 2010; NIEVES-RAMIREZ et al., 2011; BARBISAN et al., 2012; CHAGAS et al., 2013; MARANGON et al., 2013; SINGHAL et al., 2014; LI et al., 2016), e 2 estudos não analisaram o EHW da população estudada (DUARTE et al., 2005; GOVAN et al., 2006). De acordo com o perfil do grupo caso dos estudos incluídos, 6 estudos possuíam nos seus grupos casos mulheres diagnosticadas com câncer cervical (CALHOUN et al., 2002; DUARTE et al., 2005; GOVAN et al., 2006; EMMA, 2010; BARBISAN et al., 2012; LI et al., 2016), em 3 estudos os grupos casos foram constituídos por mulheres diagnosticadas com SIL e infectadas pelo HPV (NIEVES-RAMIREZ et al., 2011; CHAGAS et al., 2013; MARANGON et al., 2013) e um estudo avaliou tanto SIL quanto câncer cervical (SINGHAL et al., 2014). Devido a esta diferença apresentada entre os grupos casos dos estudos, a meta-análise foi realizada separadamente, agrupando os estudos que avaliaram mulheres com câncer cervical em uma análise, e os estudos que avaliaram mulheres com SIL em outra análise.

5.4.1 Meta-análise SNP *TNFA* -308G>A (rs1800629)

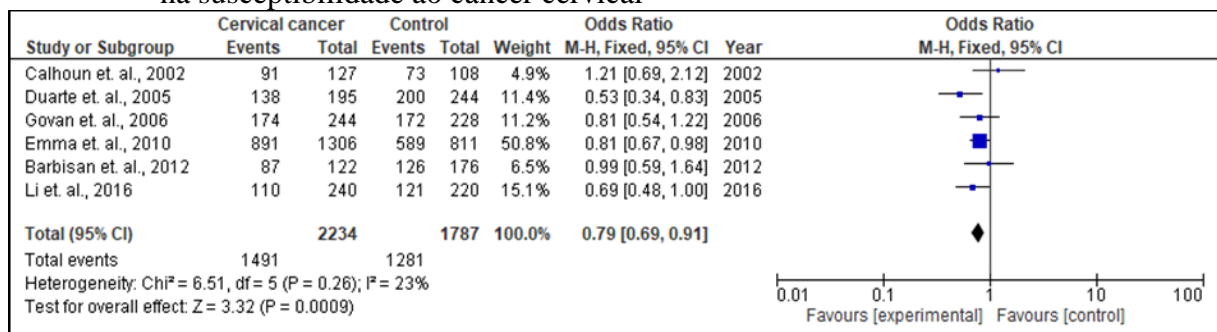
Para investigar a associação do polimorfismo *TNFA* -308G>A com a susceptibilidade ao câncer cervical foram meta-analisados seis estudos com um total de 4476 mulheres (2191 casos e 2285 controles) (CALHOUN et al., 2002; DUARTE et al., 2005; GOVAN et al.,

2006; EMMA, 2010; BARBISAN et al., 2012; LI et al., 2016). Como mostra a tabela 6 e os gráficos de dispersão *forest plots* (figura 14) e funil (funnel plots) (figura 16), o genótipo *TNFA* -308G/G no modelo codominante foi associado com efeito protetor para o câncer cervical ($p=0,0009$; OR com 95% CI = 0.79 [0.69-0.91]). Esta análise mostrou um forte poder da amostra, com 100%. Para a comparação entre os grupos SIL com HPV e controles saudáveis foram meta-analisados dois estudos com 576 mulheres envolvidas (270 casos e 306 controles) (NIEVES-RAMIREZ et al., 2011; MARANGON et al., 2013). Nesta comparação foi observada uma associação entre os genótipos *TNFA* -308G/A+A/A no modelo dominante com aumento do risco para SIL com HPV ($p=0,04$; OR com 95% CI = 1.69 [1.01-2.82]) (tabela 6, figura 15 e figura 17). Esta análise mostrou um forte poder da amostra, com 96%.

5.4.2 Meta-análise SNP *IL-10* -819C>T (rs1800871)

Utilizando as estratégias de buscas nas bases de dados traçadas pelo nosso estudo de meta-análise foi encontrado apenas um artigo que investigou a associação do polimorfismo *IL-10* -819C>T com o câncer cervical (SINGHAL et al., 2014). Portanto, não foi possível realizar meta-análise deste polimorfismo com o câncer cervical. Na meta-análise de associação entre o polimorfismo *IL-10* -819C>T e SIL com HPV foram incluídos dois estudos com um total de 542 mulheres (249 casos e 293 controles) (CHAGAS et al., 2013; MARANGON et al., 2013). Nesta meta-análise foi observada uma associação dos genótipos *IL-10* -819C/T+TT no modelo dominante com aumento do risco para SIL com HPV ($p=0,01$; OR com 95% CI = 1.76 [1.13-2.74]) (tabela 6). Nesta análise foi observado um moderado poder da amostra, com 70%). Os gráficos de dispersão em floresta (forest plots) e funil (funnel plots) desta associação são mostrados nas figuras 18 e 19, respectivamente.

Figura 14 - Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo *TNFA* -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical

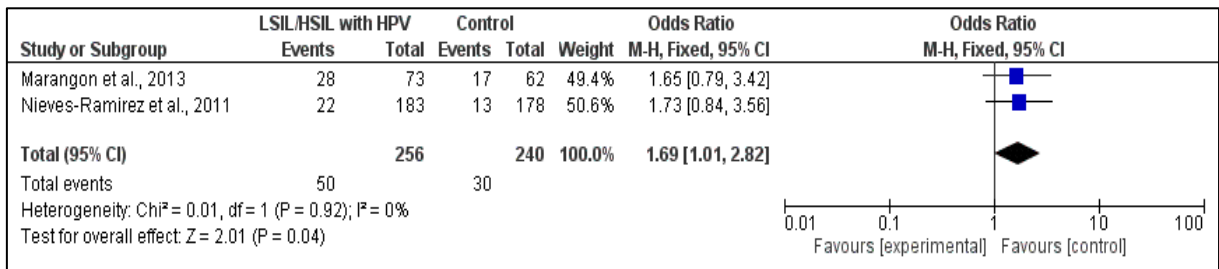


Genótipo -308G/G no modelo codominante foi associado com a proteção contra o câncer cervical.

Tabela 6 - Meta-análise da associação entre os SNPs TNFA -308G>A e IL-10 -819C>T e câncer cervical ou SIL com HPV

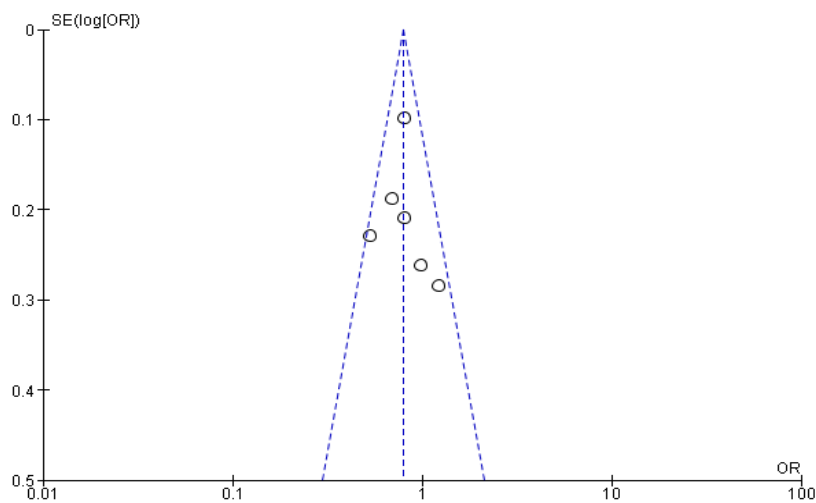
Polimorfismo		Frequências		Teste de associação			Modelo	Teste de heterogeneidade			Egger test		G Power	
Câncer cervical		Casos/controles (%)		OR (95% CI)	Z	p-value		χ^2	p-value	I ² (%)	Z	P		
TNFA (-308G>A - rs1800629)	Genótipos	GG	1491(68.1)/1787(78.2)	0.79 (0.69 - 0.91)	3.32	0.0009	F	6.51	0.26	23	5.71	<0.0001	100%	
		GA	577(26.3)/375(16.4)	1.35 (0.97 - 1.87)	1.79	0.07	R	17.95	0.003	72	9.22	<0.0001		
		AA	123(5.6)/123(5.4)	0.83 (0.63 - 1.09)	1.34	0.18	F	5.36	0.37	7	0.37	0.71		
	Alelos	G	3559(81.2)/1813(74.5)	1.52 (0.31 - 7.56)	0.51	0.61	R	789.96	<0.00001	99	4.60	<0.0001	-	
		A	825(18.8)/621(25.5)	1.10 (0.98 - 1.24)	1.64	0.10	F	6.61	0.25	24	4.01	<0.0001	-	
	Modelo Dominante	GG	1491(68.1)/1787(78.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GA+AA	700(31.9)/498(21.8)	1.31 (0.95 - 1.81)	1.63	0.10	R	11.13	0.03	64	2.86	0.0043	-	
	Modelo Recessivo	AA	123(5.6)/123(5.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GG+GA	2068(94.4)/1656(93.1)	0.76 (0.57 - 1.01)	1.87	0.06	F	7.86	0.17	35	0.44	0.66	-	
SIL+HPV														
TNFA (-308G>A - rs1800629)	Genótipo	GG	240(88.9)/256(83.7)	1.51 (0.92 - 2.49)	1.64	0.10	F	0.10	0.75	0	NA	NA	96%	
		GA	28(10.4)/49(16)	0.63 (0.38 - 1.04)	1.82	0.07	F	0.01	0.93	0	NA	NA		
		AA	2(0.7)/1(0.3)	1.77 (0.30 - 10.39)	0.63	0.53	F	1.67	0.20	40	NA	NA		
	Alelo	G	508(94.1)/561(91.7)	1.39 (0.87 - 2.20)	1.38	0.17	F	0.57	0.45	0	NA	NA	-	
		A	32(5.6)/51(8.3)	0.72 (0.45 - 1.15)	1.38	0.17	F	0.57	0.45	0	NA	NA	-	
	Modelo dominante	GG	240(88.9)/256(80)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GA+AA	30(11.1)/50(20)	1.69 (1.01 - 2.82)	2.01	0.04	F	0.01	0.92	0	NA	NA	-	
	Modelo Recessivo	AA	2(0.7)/1(0.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GG+GA	268(99.3)/305(99.7)	1.79 (0.30 - 10.45)	0.64	0.52	F	0.64	0.52	41	NA	NA	-	
IL-10 (-819A>T - rs1800871)	Genótipos	CC	87(34.9)/118(40.3)	0.80 (0.56 - 1.14)	1.24	0.21	F	0.27	0.61	0	NA	NA	70%	
		CT	126(50.6)/132(45.1)	1.25 (0.89 - 1.75)	1.27	0.20	F	0.48	0.49	0	NA	NA		
		TT	36(14.5)/43(14.7)	0.98 (0.16 - 1.58)	0.09	0.93	F	0.10	0.75	0	NA	NA		
	Alelos	C	300(60.2)/368(62.8)	0.90 (0.70 - 1.15)	0.83	0.40	F	0.03	0.86	0	NA	NA	-	
		T	198(39.8)/218(37.2)	1.11 (0.87 - 1.42)	0.83	0.40	F	0.03	0.86	0	NA	NA	-	
	Modelo Dominante	CC	87(34.9)/118(40.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CT+TT	162(65.1)/175(59.7)	1.76 (1.13 - 2.74)	2.49	0.01	F	0.53	0.47	0	NA	NA	-	
	Modelo Recessivo	TT	36(14.5)/43(14.7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CC+CT	213(85.5)/250(85.3)	0.97 (0.60 - 1.58)	0.11	0.92	F	0.14	0.71	0	NA	NA	-	

Figura 15 - Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo TNFA -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV



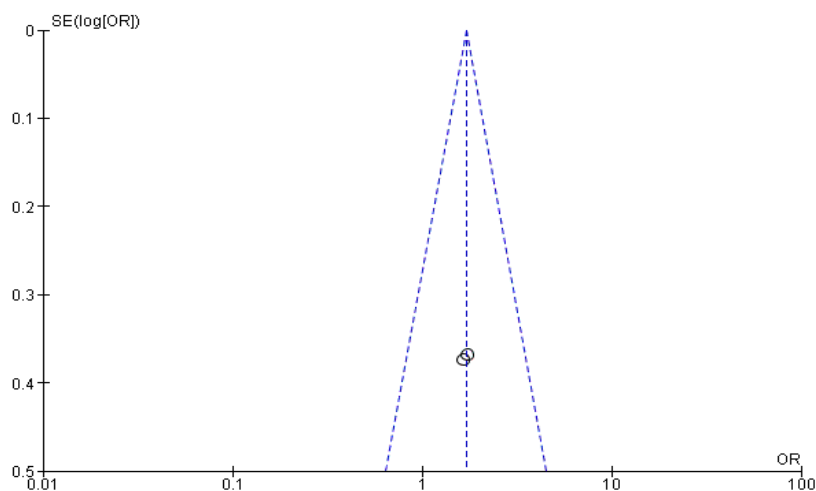
Genótipos G/A+A/A no modelo dominante foram associados com aumento do risco para lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.

Figura 16 - Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TNFA -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical



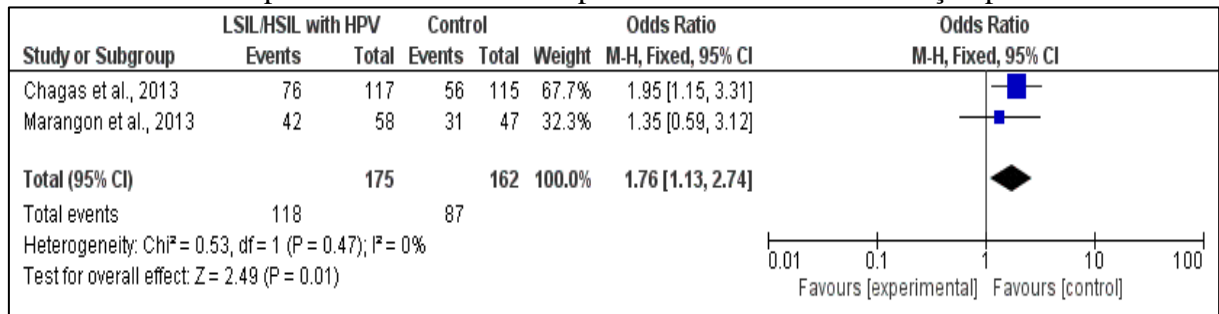
Genótipo -308G/G no modelo codominante foi associado com a proteção contra o câncer cervical.

Figura 17 - Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TNFA -308G>A (rs1800629) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV



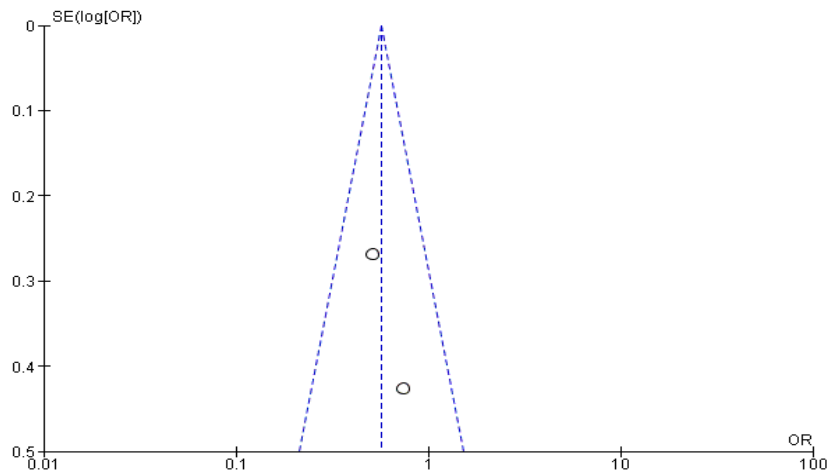
Genótipos G/A+A/A no modelo dominante foram associados com aumento do risco para lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.

Figura 18 - Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo IL-10 -819C>T (rs1800871) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV



Genótipos C/T+T/T no modelo dominante foram associados com aumento do risco para lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.

Figura 19 - Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo IL-10 -819G>A (rs1800871) na susceptibilidade a lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV



Genótipos C/T+T/T no modelo dominante foram associados com aumento do risco para lesão intraepitelial escamosa com infecção pelo HPV.

6 DISCUSSÃO

O câncer de colo de útero é considerado um importante problema de saúde pública em no mundo (WHO, 2018). No Brasil, lesões no colo uterino, embora preveníveis, apresentam uma alta frequência de evolução para o câncer cervical (INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA; SILVA, 2017). Atualmente, uma vacina 4-valente contra o HPV é fornecida pelo Sistema único de Saúde (SUS), que contém dois tipos de HPV de baixo risco (HPVs 6-11) e dois de alto risco (HPVs 16-18) (OSIS; DUARTE; DE SOUSA, 2014). Este tipo de vacina tem um efeito significativo na prevenção de doenças do colo de útero, mas não tem valor terapêutico (FERRIS et al., 2017). Portanto, a identificação de biomarcadores genéticos relacionados ao risco de câncer cervical pode ser uma importante ferramenta futura para o prognóstico precoce da doença (MI et al., 2014). Neste estudo, foi avaliada a associação dos polimorfismos *TNFA* -308 G> A (rs1800629) e *IL-10* -819 C> T (rs1800871) na susceptibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV.

6.1 *TNFA* -308G>A (rs1800629)

O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória do sistema imune que modula a resposta imunológica contra patógenos (WANG; DU; WANG, 2008). Variações nos níveis de TNF- α pode alterar a imunomodulação da inflamação aguda e conduzir a um fracasso ou sucesso imunológico frente a infecção pelo HPV (FARZANEH et al., 2006; LI et al., 2018). O fracasso imunológico está associado a persistência da infecção e o desenvolvimento de câncer cervical (TORRES-POVEDA et al., 2016). Um dos fatores que podem afetar os níveis de expressão gênica são polimorfismos presentes na região promotora do gene (BAYLEY; OTTENHOFF; VERWEIJ, 2004). Polimorfismos nos genes *TNFA* e receptor do TNF têm sido associados ao desenvolvimento de câncer cervical (DU et al., 2019; SINGHAL et al., 2016). De acordo com estudos realizados *in vitro*, o polimorfismo *TNFA* -308 G>A pode alterar os níveis de expressão gênica (WILSON et al., 1997). Portanto, essa capacidade do SNP -308G>A de alterar os níveis de expressão gênica torna-o um forte candidato a biomarcador genético de diversas doenças, incluindo a susceptibilidade a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões pré-malignas e câncer cervical.

No presente estudo, o SNP *TNFA* -308G>A não apresentou associação significativa com o carcinoma cervical. Corroborando com estes resultados, estudos realizados no México, Tailândia, Estado Unidos, Argentina, África do Sul, Suécia, China e Brasil, não encontraram associação entre o SNP *TNFA* -308 G>A e a susceptibilidade a NIC e câncer cervical

(BARBISAN et al., 2012; CALHOUN et al., 2002; CHINCHAI et al., 2016; GOVAN et al., 2006; IVANSSON; JUKO-PECIREP; GYLLENSTEN, 2010; MARANGON et al., 2013; TORRES-POVEDA et al., 2016; WANG et al., 2012, 2011). Apesar da análise do presente estudo apresentar um moderado poder amostral (70%), os resultados foram condizentes com os da literatura, uma vez que na maior parte das populações estudadas não identificaram associação do SNP *TNFA* -308G>A com NIC ou câncer cervical. No entanto, é importante ressaltar que nenhum destes estudos analisou o poder da amostra.

A meta-análise do polimorfismo *TNFA* -308G>A, realizada com diferentes populações, mostrou um resultado diferente da análise encontrada na população de Alagoas. No resultado da meta-análise o genótipo -308G/G foi associado com efeito protetor contra o câncer cervical, e os carreadores A (-308G/A+AA) foram associados com o aumento do risco para SIL com HPV. Corroborando com estes achados, dois estudos sugeriram o genótipo -308A/A, carreadores A (-308G/A+A/A) e alelo -308A como fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (DU et al., 2019; DUARTE et al., 2005). Por outro lado, no estudo de Kirkpatrick (2004) e colaboradores, o genótipo -308G/G foi associado com aumento do risco de NIC. Fatores como, diferentes perfis genéticos entre as populações estudadas, ambientais, desenho do estudo, método analítico, podem ter contribuído para os resultados inconsistentes da literatura.

6.2 *IL-10* -819C>T (rs1800871)

A *IL-10* é uma citocina anti-inflamatória, caracterizada principalmente pela sua atividade imunossupressora durante as infecções virais (PARADKAR et al., 2014). Estudos revelaram aumentos significativos nos níveis de *IL-10* em infecções virais e diversos tipos de câncer. Um estudo recente mostrou altos níveis séricos de *IL-10* em pacientes com câncer cervical, quando comparado a mulheres saudáveis (TORRES-POVEDA et al., 2016). A predominância local de *IL-10* induz a diminuição na produção de citocinas pró-inflamatória, tais como $TNF-\alpha$ e $INF\gamma$, que apresentam importantes papéis nas atividades antiviral e antitumoral (BIJJIGA; MARTINO, 2011). Sendo assim, altos níveis de *IL-10* podem promover um efeito imunossupressor contra o HPV, predispondo o hospedeiro a infecção persistente e o desenvolvimento de câncer cervical. SNPs presentes na região promotora do gene *IL-10* (-1082, -819 e -592) podem alterar os níveis de expressão gênica (ESKDALE et al., 1997). Portanto, estes SNPs podem estar associados a susceptibilidade ao câncer cervical.

Neste estudo o genótipo -819C/T e os carreadores T (-819C/T+TT) foram associados com aumento do risco de desenvolver câncer cervical. Curiosamente, a meta-análise mostrou um resultado similar ao da população Alagoana, onde os carreadores T (-819C/T+TT) foram identificados como fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Corroborando com estes resultados, o estudo de Torre-Poveda et al. (2016) encontrou uma associação entre os genótipos -819C/T e -819T/T e o aumento do risco para o câncer cervical causado por HPV. Adicionalmente, um recente estudo sugeriu o genótipo heterozigoto -819C/T como fator de risco para o câncer cervical (DU et al., 2019). Em contra partida, três estudos não encontraram associação entre o polimorfismo IL-10 -819C>T e lesões ou câncer cervical (CHAGAS et al., 2013; MARANGON et al., 2013; SINGHAL et al., 2015).

Outros polimorfismos na região promotora do gene IL-10, como os SNPs -1082 A>G e -592 C>A, foram associados com o câncer cervical (SHEKARI et al., 2012b; SINGHAL et al., 2015). Além disso, um estudo que investigou as três variantes na região promotora do gene IL-10 mostrou a associação do haplótipo GTC (-1082, -819, -592) com os níveis séricos aumentados de IL-10 e suscetibilidade ao câncer cervical (SINGHAL et al., 2015). O papel da IL-10 na carcinogênese cervical ainda não foi totalmente elucidado na literatura, porém todos os estudos que investigaram a associação do polimorfismo *IL-10* -819C>T mostraram que as mulheres infectadas pelo HPV e portadoras do alelo T apresentam uma maior predisposição ao câncer cervical.

A limitação do presente estudo foi o pequeno número amostral do grupo caso e o moderado poder da amostra na análise do polimorfismo TNFA-308 G> A (rs1800629). Este estudo apresenta uma perspectiva futura na colaboração para uma melhor compreensão do papel das citocinas TNF- α e IL-10 na carcinogênese cervical, além de contribuir para a identificação de biomarcadores genéticos relacionados ao aumento do risco para o câncer cervical na infecção pelo HPV.

7 CONCLUSÃO

- Os carreadores do alelo T (C/T+T/T) do SNP *IL-10* -819C>T (rs1800871), foram associadas com o aumento do risco para o desenvolvimento do câncer cervical na infecção pelo HPV, na população de Alagoas, Brasil.
- Não houve associação significativa entre o polimorfismo *TNFA* -308 G>A (rs1800629) e o câncer cervical na população Alagoana.
- Na meta-análise de outras populações, os carreadores do alelo T (-819C/T+T/T) do SNP *IL-10* -819C>T (rs1800871) e do alelo A (-308G/A+AA) do SNP *TNFA* -308G>A (rs1800629) foram associados como a susceptibilidade a SIL na infecção pelo HPV. Enquanto que o genótipo -308G/G do SNP *TNFA* -308G>A (rs1800629) foi associado com o efeito protetor contra o câncer cervical.

8 REFERÊNCIAS

- ARALDI, R. P.; SANT'ANA, T.A.; MODOLO, D. G.; MELO, T. C.; SPADACCI-MORENA, D.D.; STCCO, R.C.; CERUTTI, J.M.; SOUZA, E.B. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. April, p. 1537–1556, 2018.
- AULT, K. A. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 2006.
- BAHLS, L. et al. Human leukocyte antigen class I and class II polymorphisms and serum cytokine profiles in cervical cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.
- BARBISAN, G. et al. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 1549–56, 2012.
- BAYLEY, J.-P.; OTTENHOFF, T. H. M.; VERWEIJ, C. L. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes and immunity**, v. 5, n. 5, p. 315–29, 2004.
- BECHTOLD, V.; BEARD, P.; RAJ, K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. **Journal of virology**, v. 77, n. 3, p. 2021–8, 2003.
- BERMUDEZ-MORALES, V. H. et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: A mechanism for immune response escape. **Cancer Investigation**, 2008.
- BIENKOWSKA-HABA, M.; PATEL, H. D.; SAPP, M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 7, 2009.
- BIJJIGA, E.; MARTINO, A. T. Interleukin 10 (IL-10) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, 2011.
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. **The role of inflammation in HPV carcinogenesis** Carcinogenesis, 2010.
- BOIN, F. et al. Association between -G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. **Molecular psychiatry**, v. 6, p. 79–82, 2001.
- BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, p. 796–802, 1995.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 55, n. 4, p. 244–65, 2002.
- BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **The EMBO journal**, v. 3, n. 5, p. 1151–7, 1984.
- BOUSARGHIN, L. et al. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. **Journal of virology**, v. 77, n. 6, p. 3846–50, 2003.

- BRANNEY, P. et al. Masculinities, humour and care for penile cancer: A qualitative study. **Journal of Advanced Nursing**, 2014.
- BRAVO, I. G.; FELEZ-SANCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015.
- BRINGHENTI, M. E. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da Citologia Oncótica a Novas Técnicas de Biologia Molecular na Detecção do Papilomavírus Humano (HPV). **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 3, p. 135–140, 2010.
- BUCK, C. B. et al. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 78, n. 2, p. 751–757, 2004.
- BURK, R. D. Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. **Hosp Pract (1995)**, v. 34, n. 12, p. 103–111, 1999.
- BURNS, D. “Warts and all” -the history and folklore of warts: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 85, n. January, p. 37–40, 1992.
- CALHOUN, E. S. et al. Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 1218–1224, 2002.
- CÁRDENAS, D. M. et al. Preliminary analysis of single-nucleotide polymorphisms in IL-10, IL-4, and IL-4R α genes and profile of circulating cytokines in patients with gastric Cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 18, n. 1, p. 184, 10 dez. 2018.
- CARDOSO, C. C. et al. **Leprosy susceptibility: Genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome** *Future Microbiology*, 2011.
- CASTELLSAGUÉ, X. et al. Male Circumcision, Penile Human Papillomavirus Infection, and Cervical Cancer in Female Partners. **New England Journal of Medicine**, 2002.
- CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. **Environmental co-factors in HPV carcinogenesis**. *Virus Research. Anais...*2002
- CHAGAS, B. S. et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 32–37, 2013.
- CHEN, X.-J. et al. Clinical Significance of CD163+ and CD68+ Tumor-associated Macrophages in High-risk HPV-related Cervical Cancer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 18, p. 3868–3875, 2017.
- CHEN, X. et al. Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 1, p. 400–405, 2009.
- CHINCHAI, T. et al. Lack of Associations between TNF- α Polymorphisms and Cervical Cancer in Thai women. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 17, n. 3, p. 953–6, 2016.
- CHOW, L. T. **Model systems to study the life cycle of human papillomaviruses and HPV-associated cancers** *Virologica Sinica*, 2015.
- CLAVEL, C. et al. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection.

Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. **Journal of clinical pathology**, v. 51, n. 10, p. 737–40, 1998.

CONG, J. et al. Association between interleukin-17 gene polymorphisms and the risk of cervical cancer in a Chinese population. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 8, p. 9567–73, 2015.

CONWAY, M. J.; MEYERS, C. **Replication and assembly of human papillomaviruses** **Journal of Dental Research**, 2009.

CRUVINEL, W. et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira Reumatologia**, 2010.

DAY, P. M. et al. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 39, p. 14252–14257, 2004.

DEEPASK. **Mesorregião agreste alagoano - População nas mesorregiões do Brasil: Veja o número de habitantes e a densidade demográfica**. Disponível em: <<http://www.deepask.com/goes?page=mesorregiao-agreste-alagoano-Populacao-nas-mesorregioes-do-Brasil:-Veja-o-numero-de-habitantes-e-a-densidade-demografica>>. Acesso em: 9 fev. 2019.

DEMATHE A, BERNABÉ D G, GARCIA J F, NUNES, C M, M. G. I. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 2, p. 85–90, 2010.

DETSIMONIAN, R.; LAIRD, N. Meta-analysis in clinical trials. **Controlled Clinical Trials**, v. 7, n. 3, p. 177–188, set. 1986.

DESHMUKH, A. A. et al. Adjuvant HPV vaccination for anal cancer prevention in HIV-positive men who have sex with men: The time is now. **Vaccine**, 2017.

DIGIUSEPPE, S. et al. Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 22, p. 6289–6294, 2016.

DIMOPOULOS, J. C. A. et al. Treatment of locally advanced vaginal cancer with radiochemotherapy and magnetic resonance image-guided adaptive brachytherapy: Dose-volume parameters and first clinical results. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 2012.

DOORBAR, J. et al. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, n. 6338, p. 824–827, 1991.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 7–15, 2005.

DU, G.-H. et al. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 are associated with an increased risk of cervical cancer. **International Immunopharmacology**, v. 66, p. 154–161, 16 jan. 2019.

DUARTE, I. et al. G-308A TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of

invasive cervical cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 2, p. 588–592, 2005.

DÜRST, M, GISSMANN, L., IKENBERG, H. & ZUR HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 3812–3815, 1983.

DUTTA, S. et al. Persistent HPV16/18 infection in Indian women with the A-allele (rs6457617) of HLA-DQB1 and T-allele (rs16944) of IL-1 β -511 is associated with development of cervical carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 7, p. 843–851, 2015.

DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934–937, 1989.

EGGER, M.; SMITH, G. D.; PHILLIPS, A. N. Meta-analysis: Principles and procedures. **BMJ**, 1997.

ESKDALE, J. et al. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, 1997.

FARZANEH, F. et al. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, 2006.

FEHRMANN, F.; KLUMPP, D. J.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus Type 31 E5 Protein Supports Cell Cycle Progression and Activates Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation. **Journal of virology**, 2003.

FENG, Q. et al. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma. **Gynecologic Oncology**, 2012.

FENG, R.-N. et al. Meta-Analysis of TNF 308 G/A Polymorphism and Type 2 Diabetes Mellitus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18480, 8 abr. 2011.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T. et al. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 4, p. 469–472, 2004.

FERRIS, D. G. et al. 4-Valent Human Papillomavirus (4vHPV) Vaccine in Preadolescents and Adolescents After 10 Years. **Pediatrics**, v. 140, n. 6, p. e20163947, 22 dez. 2017.

FUESSEL HAWS, A. L. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5 +/6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, n. 1, p. 87–93, 2004.

GAGE, J. C. et al. Comparison of the cobas human papillomavirus (HPV) test with the hybrid capture 2 and linear array HPV DNA tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 61–65, 2012.

GARCIA-IGLESIAS, T. et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 186, 16 dez. 2009.

Globocan 2012 - Home. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em:

20 jun. 2018.

GOVAN, V. A. et al. The allelic distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. **BMC Cancer**, v. 6, p. 24, 2006.

GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, v. 131, n. 17, p. 2201–2221, 2017.

GRAHAM, S. V. **Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies** *Future Microbiology*, 2010.

GRANDVAUX, N. et al. **The interferon antiviral response: From viral invasion to evasion** *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2002.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a Genética**. [s.l: s.n.]. v. Nona edição

GUIMARÃES, M. V. M. B. et al. Resposta imune ao HPV e as neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV: perfil de citocinas. **Femina**, 2011.

HACKE, K. et al. Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. **Molecular Cancer**, 2010.

HARARI, A.; CHEN, Z.; BURK, R. D. Human papillomavirus genomics: past, present and future. **Current problems in dermatology**, v. 45, n. 718, p. 1–18, 2014.

HAUSEN, H. ZUR. Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. **Cancer Research**, v. 36, p. 794, 1974.

HAUSEN, H. ZUR. **Oncogenic herpes viruses** *BBA - Reviews on Cancer*, 1975.

HAZELBAG, S. et al. Cytokine profile of cervical cancer cells. **Gynecologic Oncology**, 2001.

HELT, A. M.; GALLOWAY, D. A. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. **Journal of virology**, v. 75, n. 15, p. 6737–47, 2001.

HIGGINS, J. P. T. et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ : British Medical Journal**, 2003.

HIGGINS, J. P. T.; THOMPSON, S. G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statistics in Medicine**, 2002.

HOPMAN, A. H. N. et al. HPV in situ hybridization: Impact of different protocols on the detection of integrated HPV. **International Journal of Cancer**, v. 115, n. 3, p. 419–428, 2005.

HOPPE, C. et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**, 2007.

HORITA, N.; KANEKO, T. Genetic model selection for a case-control study and a meta-analysis. **Meta Gene**, 2015.

HUANG, H.-H. et al. TNF- α -308 G>A polymorphism and weight gain in patients with schizophrenia under long-term clozapine, risperidone or olanzapine treatment. **Neuroscience Letters**, v. 504, n. 3, p. 277–280, 31 out. 2011.

IBGE. **IBGE :: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

ICTV. **Virus Taxonomy, classification and nomenclature of viruses**. [s.l.] Elsevier, 2012.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 28 jul. 2018.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. **The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting** Cytokine and Growth Factor Reviews, 2002.

INCA. **INCA - Câncer - Tipo - Colo do Útero - Sintomas**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/sintomas>. Acesso em: 7 ago. 2018.

INCA. **Ministério da Saúde FICHA TÉCNICA DE INDICADORES DAS AÇÕES DE CONTROLE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/84f26080469faa79859bed5120665fa8/FICHA+TÉCNICA+Indicadores+Colo+14.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=84f26080469faa79859bed5120665fa8>>. Acesso em: 12 ago. 2018.

INCA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 - Síntese de Resultados e Comentários**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA; SILVA. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

IVANSSON, E. L.; JUKO-PECIREP, I.; GYLLENSTEN, U. B. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 3, p. 544–548, 2010.

KIM, J. M. et al. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **J Immunol**, 1992.

KINES, R. C. et al. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20458–20463, 2009.

KIRKPATRICK, A. et al. TNF?? polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 92, n. 2, p. 675–679, 2004.

KOHNO, T. et al. Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. **Cancer Research**, 2003.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. **Molecular immunology**, v. 34, n. 5, p. 391–9, abr. 1997.

LAWRENCE, M. S. et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck

squamous cell carcinomas. **Nature**, 2015.

LEE, S.-J. et al. Both E6 and E7 Oncoproteins of Human Papillomavirus 16 Inhibit IL-18-Induced IFN- Production in Human Peripheral Blood Mononuclear and NK Cells. **The Journal of Immunology**, 2001.

LI, H. et al. Association of tumor necrosis factor alpha polymorphisms with cervical cancer in a Chinese population. v. 9, n. 2, p. 2200–2207, 2016.

LI, J. et al. Cervical Cancer HeLa Cell Autocrine Apoptosis Induced by Coimmobilized IFN- γ plus TNF- α Biomaterials. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 10, p. 8451–8464, 14 mar. 2018.

LI, Y. et al. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.

LIANG, Y. et al. Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. **Diagnostic Pathology**, v. 13, n. 1, p. 93, 24 dez. 2018.

LORENZI, J. C. C.; COELHO-CASTELO, A. A. M. Resposta imune contra infecções virais. **Scire Salutis**, 2011.

MAGLENNON, G. A.; MCINTOSH, P.; DOORBAR, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. **Virology**, v. 414, n. 2, p. 153–163, 2011.

MARANGON, A. V. et al. The Association of the Immune Response Genes to Human Papillomavirus-Related Cervical Disease in a Brazilian Population. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

MARTINEZ-ZAPIEN, D. et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 541–545, 2016.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, 2013.

MEDEIROS, L. R. et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. **Cadernos de Saúde Pública**, 2005.

MHATRE, M. et al. Cervical Intraepithelial Neoplasia Is Associated With Genital Tract Mucosal Inflammation. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 39, n. 8, p. 591–597, ago. 2012.

MI, Y. et al. Genetic variants in microRNA target sites of 37 selected cancer-related genes and the risk of cervical cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

MIDDLETON, K. et al. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10186–10201, 2003.

MODIS, Y.; TRUS, B. L.; HARRISON, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **EMBO Journal**, v. 21, n. 18, p. 4754–4762, 2002.

MOGHIMI, M. et al. Association of IL-10 rs1800871 and rs1800872 Polymorphisms with Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 12, p. 3353–3359, 1 dez. 2018.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Annals of internal medicine**, v. 151, n. 4, p. 264–9, W64, ago. 2009.

MOLIJN, A. et al. **Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections**. **Journal of Clinical Virology**, 2005.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. **Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation**. **Nature Reviews Cancer**, 2010.

MOTAVALLI KHIAMI, F. et al. A Dual-Type L2 11-88 Peptide from HPV Types 16/18 Formulated in Montanide ISA 720 Induced Strong and Balanced Th1/Th2 Immune Responses, Associated with High Titers of Broad Spectrum Cross-Reactive Antibodies in Vaccinated Mice. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–15, 2018.

NAKAGAWA, M. et al. A favorable clinical trend is associated with CD8 T-cell immune responses to the human papillomavirus type 16 E6 antigens in women being studied for abnormal pap smear results. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, 2010.

NASSER, M. Z.; EZZAT, D. A. Association of -308G/A Polymorphism and Serum Level of TNF- α with Bronchial asthma in Children. **The Egyptian journal of immunology**, v. 25, n. 2, p. 117–124, jun. 2018.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. **The Bethesda system for reporting cervical cytology: A historical perspective**. **Acta Cytologica**, 2017.

NICODEMUS, K. K. Catmap: Case-control and TDT meta-analysis package. **BMC Bioinformatics**, 2008.

NIEVES-RAMIREZ, M. E. et al. Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor α Promoter Region and in Lymphotoxin α in Squamous Intraepithelial Lesions, Precursors of Cervical Cancer. **Translational Oncology**, v. 4, n. 6, p. 336–344, 2011.

OSIS, M. J. D.; DUARTE, G. A.; DE SOUSA, M. H. SUS users' knowledge of and attitude to HPV virus and vaccines available in Brazil. **Revista de Saude Publica**, 2014.

OZBUN, M. A.; MEYERS, C. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. **Journal of virology**, 1998.

PAHO. **ESTRATEGIA Y PLAN DE ACCIÓN REGIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y EL CONTROL DEL CÁNCER CERVICOUTERINO EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE**. 2010.

PAHO. **PAHO WHO | Cervical cancer in the Americas**. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9574%3Acervical-cancer-in-the-americas&catid=6648%3Afact-sheets&Itemid=40721&lang=en>. Acesso em: 21 jun. 2018.

PARADKAR, P. H.; AGASHE, S.V.; JOSHI, J.V.; JAGTAP, S.S.; AFFANDI M.Z.; VAIDYA, R.A. SERUM IL-6 AND MICROMETRY OF Pap smears in women with cervical low-grade intraepithelial lesions. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 11, n. 4, p. 989–92, 2010.

PARADKAR, P. H. et al. Role of Cytokines in Genesis, Progression and Prognosis of

Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2014.

PATEL, D. et al. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. **EMBO Journal**, v. 18, n. 18, p. 5061–5072, 1999.

PEH, W. L. et al. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. **Journal of virology**, 2004.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: the fourth century. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 16, n. 12, p. 1709–19, dez. 2009.

QIAN, N. et al. Circulating IL-1 β levels, polymorphisms of IL-1B, and risk of cervical cancer in Chinese women. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 5, p. 709–716, 2010.

RAFF, A. B. et al. The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: a Review of Binding and Entry. **Journal of Virology**, v. 87, n. 11, p. 6062–6072, 2013.

RASHED, R. et al. Associations of interleukin-10 gene polymorphisms with acute myeloid leukemia in human (Egypt). **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1083, 2018.

RICHARDS, R. M. et al. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1522–7, 2006.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, 2013.

ROUS, P.; BEARD, J. W. The Progression To Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). **The Journal of experimental medicine**, v. 62, n. 4, p. 523–48, 1935.

ROUTES, J. M. et al. Macrophages Kill Human Papillomavirus Type 16 E6-Expressing Tumor Cells by Tumor Necrosis Factor Alpha- and Nitric Oxide-Dependent Mechanisms. **Journal of Virology**, 2005.

ROWSON, K. E.; MAHY, B. W. Human papova (wart) virus. **Bacteriological reviews**, v. 31, n. 2, p. 110–31, 1967.

RUFFIN IV, M. T. et al. Human papillomavirus in amniotic fluid. **BMC Pregnancy and Childbirth**, 2006.

SALES-MARQUES, C. et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

SALES, K. J. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. In: **Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects**. [s.l: s.n.].

SANDERS, C. M.; STENLUND, A. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: An ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. **EMBO Journal**, v. 17, n. 23, p. 7044–7055, 1998.

SANDERS, C. M.; STENLUND, A. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3522–3534, 2000.

- SANTOS-LÓPEZ, G. et al. General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus. **Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 53, 2015.
- SANTOS, A. C. M. et al. Meta-Analysis of the Relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Dengue. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 2, 2017a.
- SANTOS, C. M. D. C.; PIMENTA, C. A. D. M.; NOBRE, M. R. C. A estratégia PICO para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 2–5, 2007.
- SANTOS, A. C. M. DOS et al. Meta-Analysis of the Relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Dengue. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 2, p. 201–220, 2016.
- SANTOS, A. C. M. DOS et al. Association of TNFA (-308G/A), IFNG (+874 A/T) and IL-10 (-819 C/T) polymorphisms with protection and susceptibility to dengue in Brazilian population. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2017b.
- SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. **Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer** *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2012.
- SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. **Current understanding of the mechanism of HPV infection** *Gynecologic Oncology*, 2010.
- SELLORS, J. W. et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. **CMAJ**, 2000.
- SHEKARI, M. et al. Effect of Anti-inflammatory (IL-4, IL-10) Cytokine Genes in Relation to Risk of Cervical Carcinoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 6, p. 514–519, 2012a.
- SHEKARI, M. et al. Effect of anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokine genes in relation to risk of cervical carcinoma. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, 2012b.
- SHI, T. Y. et al. Polymorphisms of the Interleukin 6 gene contribute to cervical cancer susceptibility in Eastern Chinese women. **Human Genetics**, v. 132, n. 3, p. 301–312, 2013.
- SHI, W.-J. et al. Stratification Analysis and Case-control Study of Relationships between Interleukin-6 Gene Polymorphisms and Cervical Cancer Risk in a Chinese Population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, p. 7357–7362, 2014.
- SHOPE, R. E.; HURST, E. W. Infectious Papillomatosis of Rabbits: With a Note on the Histopathology. **The Journal of experimental medicine**, v. 58, n. 5, p. 607–24, 1933.
- SHRESTA, S. et al. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **Journal of virology**, v. 78, n. 6, p. 2701–10, 2004.
- SINGHAL, P. et al. Association of IL-10 GTC haplotype with serum level and HPV infection in the development of cervical carcinoma. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2287–2298, 2015.

SINGHAL, P. et al. Identification of genetic variants in TNF receptor 2 which are associated with the development of cervical carcinoma. **Biomarkers**, 2016.

SLATER, D. N. et al. Proposed Sheffield quantitative criteria in cervical cytology to assist the grading of squamous cell dyskaryosis, as the British Society for Clinical Cytology definitions require amendment. **Cytopathology**, v. 16, n. 4, p. 179–192, 2005.

STANG, A. **Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses** **European Journal of Epidemiology**, 2010.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, n. 2 SUPPL., 2008.

STANLEY, M. A. et al. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. **International Journal of Cancer**, 1989.

STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 6, p. 1456–1460, 2007.

STEBEN, M.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. **Gynecologic Oncology**, v. 107, n. 2 SUPPL., 2007.

STOLER, M. H. et al. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. **Virology**, v. 172, n. 1, p. 331–340, 1989.

STRAUSS, M. J. et al. "Crystalline" Virus-Like Particles from Skin Papillomas Characterized by Intranuclear Inclusion Bodies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 72, n. 1, p. 46–50, 1949.

SURVILADZE, Z.; DZIDUSZKO, A.; OZBUN, M. A. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012.

TACCONELLI, E. Systematic reviews: CRD's guidance for undertaking reviews in health care. **The Lancet Infectious Diseases**, 2010.

TESSE, R. et al. Association of interleukin-(IL)10 haplotypes and serum IL-10 levels in the progression of childhood immune thrombocytopenic purpura. **Gene**, 2012.

TJIONG, M. Y. et al. Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, 1999.

TORRES-POVEDA, K. et al. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. **Infectious Agents and Cancer**, 2012.

TORRES-POVEDA, K. et al. Risk allelic load in Th2 and Th3 cytokines genes as biomarker of susceptibility to HPV-16 positive cervical cancer: A case control study. **BMC Cancer**, 2016.

TORTOLERO-LUNA, G. **Epidemiology of genital human papillomavirus** **Hematology/Oncology Clinics of North America**, 1999.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. **The American journal of managed care**, v. 12, n. 17 Suppl, p. S462-72, 2006a.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. **The epidemiology of genital human papillomavirus infection** *Vaccine*, 2006b.

VAN DOORSLAER, K. et al. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 8, p. 989–990, 2018.

VERMA, S. Bilateral Linear Location of Condylomata Acuminata in the Groin: An Uncommon Presentation Aggravated by Topical Steroids. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 6, p. 1–2, 2014.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WANG, L.; DU, F.; WANG, X. TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 693–703, 16 maio 2008.

WANG, N. et al. TNF-Alpha rs1800629 Polymorphism Is Not Associated with HPV Infection or Cervical Cancer in the Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

WANG, Q. et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. **Journal of virology**, v. 78, n. 2, p. 821–33, 2004.

WANG, Q. et al. Association between cytokine gene polymorphisms and cervical cancer in a Chinese population. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 158, n. 2, p. 330–333, 2011.

WANG, X. L. et al. Distinctive features of foreskin condylomata acuminata associated with diabetes mellitus. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 88, n. 6, p. 578–583, 2008.

WANG, X.; LIN, Y. **Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?** *Acta Pharmacologica Sinica*, 2008.

WHITE, M. K.; PAGANO, J. S.; KHALILI, K. Viruses and human cancers: A long road of discovery of molecular paradigms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 463–481, 2014.

WHO. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes**. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2&lang=4>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

WHO | Cervical cancer. **WHO**, 2018.

WHO FACT SHEET. **WHO | Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

WIDDICE, L. et al. Concordance and transmission of human papillomavirus within heterosexual couples observed over short intervals. **Journal of Infectious Diseases**, 2013.

WILSON, A. G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis

factor promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1997.

WILSON, R.; FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Role of the E1 E4 Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. **Journal of Virology**, v. 79, n. 11, p. 6732–6740, 2005.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. **The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues** *Nature Reviews Cancer*, 2007.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Comprehensive Cervical Cancer Control** *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/cervical-cancer-guide/en/>>.

WORLD OF VIRUSES. **Inside Viruses | Biology of Human/World of Viruses**. Disponível em: <<http://worldofviruses.unl.edu/category/inside-viruses/>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

WRIGHT, T. C. et al. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2120–2129, 2002.

WRIGHT, T. C.; SCHIFFMAN, M. Adding a Test for Human Papillomavirus DNA to Cervical-Cancer Screening. **New England Journal of Medicine**, 2003.

XAVIER BOSCH, F. Eradication of cervical cancer in latin America. **Salud Publica de Mexico**, v. 58, n. 2, p. 97–100, 2016.

ZHANG, P. et al. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. **Virology**, 1999.

ZHANG, T. et al. Aberrant frequency of TNFR2<sup>+</sup> Treg and related cytokines in patients with CIN and cervical cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 4, p. 5073–5083, 12 jan. 2018.

ZHAO, K. N. et al. BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. **Virology**, v. 272, n. 2, p. 382–393, 2000.

ZIJLMANS, H. J. M. A. A. et al. Role of tumor-derived proinflammatory cytokines GM-CSF, TNF- α , and IL-12 in the migration and differentiation of antigen-presenting cells in cervical carcinoma. **Cancer**, v. 109, n. 3, p. 556–565, 1 fev. 2007.

ZIMMERMANN, H. et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **Journal of virology**, v. 73, n. 8, p. 6209–19, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 78, p. 1–30, 1977.

ZUR HAUSEN, H. **Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account** *Virology*, 2009.

APÊNDICE I – Artigo de revisão sistemática e meta-análise submetido

Gynecologic Oncology Elsevier Editorial System(tm) for
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Association of polymorphisms in cytokine genes with susceptibility to precancerous lesions and cervical cancer: a systematic review with meta-analysis

Article Type: Review Article

Keywords: Single Nucleotide Polymorphism; Cytokine; Human Papillomavirus; Cervical cancer.

Corresponding Author: Dr. Edilson Leite De Moura,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Edilson Leite De Moura

Order of Authors: Edilson Leite De Moura; Ana Caroline M dos Santos, master's degree; Denise M da Silva; Bruna B dos Santos; Diego S Figueredo, doctor; Alexandre Wendell A Moura; Adriely F da Silva; Ithallo Sathio B Tanabe; Eloiza L de Lira; Abel B Lira Neto; Aline Cristine P Silva, doctor; Carlos Alberto C Fraga, doctor; José Luiz Lima Filho, doctor; Karol F de Farias, doctor; Elaine Virginia M de Souza Figueiredo, doctor

Abstract: Background: Single nucleotides polymorphisms (SNPs) in cytokines genes are associated with phenotypic variations that may influence in the outcome of HPV infection and in susceptibility to cervical cancer. This study investigated the relationship between SNPs in cytokines genes and susceptibility to Squamous Intraepithelial Lesions (SIL), cervical cancer and HPV infection, through a systematic review with meta-analysis. And to investigate the effect of SNPs, we analyzed the transcription factor binding affinity. Method: Seven electronic databases including MEDLINE, Scielo, BIREME, PubMed, Scopus, Web of Science and Science Direct for case-controls studies. Results: A total of 35 relevant case-control studies were meta-analyzed. SNPs in TNFA (rs1800629 and rs361525), IL-17 (rs2275913, rs3748067 and rs763780), IL-1B (rs16944), IL-6 (rs1800795), IL-12 (rs3212227 and rs568408) genes, were associated with protective effect or increased risk for cervical cancer. Protective association was observed between SNPs in IL-10 (rs1800871), IFNG (rs2430561), TNFA (1800629) genes and SIL in women confirmed with HPV infection. Conclusion: Overall, 11 SNPs in cytokines genes were associated with decreased (protection) or increased risk to SIL and cervical cancer. Therefore, in our meta-analysis these SNPs are potential candidates for predicting to identify cases of high risk for SIL and cervical cancer.

Suggested Reviewers: Shulan Zhang
zhangsl0909@163.com

Lixia Sun
sunlixial19907@126.com

1 **Association of polymorphisms in cytokine genes with susceptibility to precancerous**
2 **lesions and cervical cancer: a systematic review with meta-analysis**

3 Edilson Leite de Moura^{a,d}, Ana Caroline Melo dos Santos^{a,d}, Denise Macedo da Silva^a,
4 Bruna Brandão dos Santos^a, Diego de Siqueira Figueredo, Alexandre Wendell Araújo
5 Moura^a, Adriely Ferreira da Silva^a, Ithallo Sathio Bessoni Tanabe^a, Eloiza Lopes de Lira
6 Tanabe^a, Abel Barbosa Lira Neto^{a,d}, Aline Cristine Pereira e Silva^a, Carlos Alberto de
7 Carvalho Fraga^{a,b}, José Luiz de Lima Filho^c, Karol Fireman de Farias^a, Elaine Virginia
8 Martins de Souza Figueiredo^a.

9 ^aLaboratory of Molecular Biology and Gene Expression (LABMEG), Federal University of
10 Alagoas (UFAL), Arapiraca, Alagoas, Brazil.

11 ^bFaculty of Medicine, Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Alagoas, Brazil.

12 ^cLaboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco,
13 Recife, Pernambuco, Brazil.

14 ^dPost-graduation Program in Health Science, Institute of Biological Sciences and Health
15 (ICBS), Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas, Brazil.

16

17 Corresponding Author: Edilson Leite de Moura

18 E-mail: edilsonleite17@hotmail.com; edilsonleite17@gmail.com.

19 AL 115, Km 6,5, Bom Sucesso, city of Arapiraca-Alagoas, Brazil – CEP: 57300-970.

20 Telephone: +55 82 3482-1830

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

Abstract

50 **Background:** Single nucleotides polymorphisms (SNPs) in cytokines genes are
51 associated with phenotypic variations that may influence in the outcome of HPV
52 infection and in susceptibility to cervical cancer. This study investigated the relationship
53 between SNPs in cytokines genes and susceptibility to Squamous Intraepithelial Lesions
54 (SIL), cervical cancer and HPV infection, through a systematic review with meta-
55 analysis. And to investigate the effect of SNPs, we analyzed the transcription factor
56 binding affinity. **Method:** Seven electronic databases including MEDLINE, Scielo,
57 BIREME, PubMed, Scopus, Web of Science and Science Direct for case-controls
58 studies. **Results:** A total of 35 relevant case-control studies were meta-analyzed. SNPs
59 in *TNFA* (rs1800629 and rs361525), *IL-17* (rs2275913, rs3748067 and rs763780), *IL-1B*
60 (rs16944), *IL-6* (rs1800795), *IL-12* (rs3212227 and rs568408) genes, were associated
61 with protective effect or increased risk for cervical cancer. Protective association was
62 observed between SNPs in *IL-10* (rs1800871), *IFNG* (rs2430561), *TNFA* (1800629)
63 genes and SIL in women confirmed with HPV infection. **Conclusion:** Overall, 11 SNPs
64 in cytokines genes were associated with decreased (protection) or increased risk to SIL
65 and cervical cancer. Therefore, in our meta-analysis these SNPs are potential candidates
66 for predicting to identify cases of high risk for SIL and cervical cancer.

67 **Keywords:** Single Nucleotide Polymorphism; Cytokine; Human Papillomavirus;
68 Cervical cancer.

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

APÊNDICE II – Artigos publicados durante o mestrado

26/01/2019

Suicide attempt in mental disorders (MeDi): Association with 5-HTT, IL-10 and TNF-alpha polymorphisms - ScienceDirect




Get Access

Share

Export

Journal of Psychiatric Research

Volume 91, August 2017, Pages 36-46

Suicide attempt in mental disorders (MeDi): Association with 5-HTT, IL-10 and TNF-alpha polymorphisms

Verônica de Medeiros Alves ^a, , Aline Cristine Pereira e Silva ^b, Elaine Virgínia Martins de Souza ^c, Leilane Camila Ferreira de Lima Francisco ^d, Edilson Leite de Moura ^e, Valfrido Leão de-Melo-Neto ^f, Antonio E. Nardi ^g

 **Show more**

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.02.022>

[Get rights and content](#)

Highlights

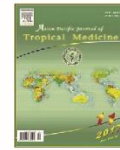
- TNF- α rs1800629 -308A/G was associated with a protective effect for the control group compared with the MeDi without SA group.
- The TNF- α rs1800629 -308G allele was a possible risk factor for MeDi compared with the control group in females.
- Carrier A (A/G+A/A) was a protective factor for the control group compared to MeDi in females.
- Young adults, low educational level, single, unemployed, religious and had a family history of MeDi have a history of SA.
- The quality of life of patients with MeDi and SA was more affected for all assessed domains.
- Psychotic syndrome, obsessive-compulsive, post-traumatic stress, depression, manic and anxiety presented risk for SA.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: <http://ees.elsevier.com/apjtm>



Original research <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.009>

Association of *TNFA* (–308G/A), *IFNG* (+874 A/T) and *IL-10* (–819 C/T) polymorphisms with protection and susceptibility to dengue in Brazilian population

Ana Caroline Melo dos Santos¹, Edilson Leite de Moura¹, Jean Moises Ferreira¹, Alexandre Wendell Araujo de Moura¹, Ailson Darlan Sales Ferreira¹, Rubens Pereira Bezerra¹, Diego de Siqueira Figueiredo¹, Karol Fireman de Farias¹, Tiago Gomes de Andrade^{1,2}, Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo^{1,2*}

¹Molecular Biology and Gene Expression Laboratory, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Av Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, Arapiraca, AL, 57309-005, Brazil

²Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas, Campus AC Simões, Tabuleiro dos Martins, Maceió, Alagoas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 Jul 2017

Received in revised form 23 Aug 2017

Accepted 24 Sep 2017

Available online 28 Oct 2017

Keywords:

Immune system
IFNG
TNFA
IL-10
Dengue
Polymorphism

ABSTRACT

Objective: To evaluate gene polymorphisms and their association with susceptibility to dengue.

Methods: A retrospective case-control study was performed with 262 subjects, comprising 78 dengue fever (DF) patients, 49 dengue hemorrhagic fever (DHF) patients and 135 healthy controls. Genotypic and allelic profiles were identified using polymerase chain reaction based in real time and amplification-refractory mutation system.

Results: We observed a protective association of *IL-10* (–819 C/T) C allele ($P = 0.028$, $OR = 0.56$, $CI = 0.34–0.91$) against DHF, while the C/T ($P = 0.047$, $OR = 2.10$, $CI = 1.01–4.38$) and T/T ($P = 0.008$, $OR = 3.82$, $CI = 1.38–10.59$) genotypes were associated with DHF and DF, respectively. The dominant model *TNFA* –308 GA + AA ($P = 0.043$, $OR = 0.45$, $CI = 0.20–1.00$) genotypes were found to have protective effect against dengue infection. A protective association among the *IFNG* (+874 A/T) A/T genotype against DF ($P = 0.02$, $OR = 0.46$, $CI = 0.24–0.89$) and DHF ($P = 0.034$, $OR = 0.43$, $CI = 0.19–0.95$) was observed. When the studied single-nucleotide polymorphism was analyzed in combination, the combination GTA ($P = 0.022$, $OR = 2.95$, $CI = 1.18–7.41$) was statistically significantly associated with susceptibility to DF and the combination GCT ($P = 0.035$, $OR = 0.28$, $CI = 0.08–0.90$) with protection against the development of DHF.

Conclusions: This research identifies the association of the *IFNG* (+874 A/T), *TNFA* (–308G/A), *IL-10* (–819 C/T) genotypes as a factor for protection, susceptibility and severity to dengue.

1. Introduction

Dengue is a public health problem and its incidence has a wide geographical spread [1,2]. It is endemic in more than 100

countries and the World Health Organization estimated a 50–100 million dengue infections reported worldwide each year [3]. However, a cartographic study estimated that there are approximately 390 million dengue cases per year around the world including symptomatic and asymptomatic [4]. According to the Pan American Health Organization in 2015, Brazil was the country that reported most cases of dengue in the Americas with 1 649 008 of suspected dengue records and an incidence rate of 820.27 cases [5].

Dengue infection presents diverse a wide spectrum of clinical presentation, from asymptomatic and mild dengue fever (DF), to the most serious forms: dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome. DHF is characterized by increased vascular permeability, followed by vascular leakage, which promotes the appearance of hemorrhagic manifestations and

First author: Ana Caroline Melo dos Santos, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, CEP 57072-970, Brazil.
Tel: +55 82 99603 3197.
E-mail: anacaroline12305@gmail.com

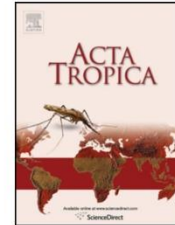
*Corresponding author: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo, Laboratory of Molecular Biology and Gene Expression, Federal University of Alagoas, CEP: 57309-005, Arapiraca, Brazil.
Tel: +55 82 99931 0827.
E-mail: elainevms@yahoo.com.br

Peer review under responsibility of Hainan Medical University.
Foundation project: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) – Programa Primeiros Projetos (PPP/2011).

Accepted Manuscript

Title: Association of polymorphisms in serotonin and nitric oxide genes with clinical outcome of dengue in Brazilian northeast population

Authors: Ana Caroline Melo dos Santos, Edilson Leite de Moura, Denise Macêdo da Silva, Alexandre Wendell Araujo Moura, Jean Moises Ferreira, Abel Barbosa Lira Neto, Aline Cristine Pereira e Silva, Verônica de Medeiros Alves, Tatiane Luciano Balliano, Karol Fireman de Farias, José Luiz de Lima Filho, Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo



PII: S0001-706X(17)31492-4
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.015>
Reference: ACTROP 4831

To appear in: *Acta Tropica*

Received date: 4 January 2018
Revised date: 5 November 2018
Accepted date: 14 November 2018

Please cite this article as: dos Santos ACM, de Moura EL, da Silva DM, Araujo Moura AW, Ferreira JM, Lira Neto AB, Pereira e Silva AC, de Medeiros Alves V, Balliano TL, de Farias KF, de Lima Filho JL, de Souza Figueiredo EVM, Association of polymorphisms in serotonin and nitric oxide genes with clinical outcome of dengue in Brazilian northeast population, *Acta Tropica* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.015>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ANEXO I – PARECER SUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo genético dos pacientes com dengue no estado de Alagoas e a sua relação com a infecção e progressão da doença

Pesquisador: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 18558913.1.0000.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 405.940

Data da Relatoria: 04/10/2013

Apresentação do Projeto:

Infecções pelo vírus da dengue ocorrem em mais de 100 países. A infecção pode causar dengue clássica (DF), que se caracteriza por um estado febril, ou pode progredir para uma dengue hemorrágica (DHF) caracterizada por manifestações como a síndrome hemorrágica de choque na dengue (DSS). Esse é um estudo de casos e controles que busca demonstrar, a exemplo de outros já realizados, a relação entre os polimorfismos genéticos no sistema imune inato humano e respostas diferenciais à infecção ocasionada pelo Vírus da dengue, de forma que estejam associados com uma maior susceptibilidade a esta infecção, promovendo uma progressão mais grave para a doença. Os pacientes e casos controle do estudo serão do agreste alagoano. A genotipagem será realizada utilizando combinação entre reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise dos fragmentos gerado por enzimas de restrição (PCR-RFLP). O foco do estudo será os genes do Fator de necrose tumoral, IL-10 e complemento (C3 e C4). Todos os resultados serão analisados e publicados com o intuito de gerar e ampliar competência científica em grupo de pesquisa em polimorfismos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Campus A . C Simões Cidade Universitária

Bairro: Tabuleiro dos Martins **CEP:** 57.072-900

UF: AL **Município:** MACEIO

Telefone: (82)3214-1041 **Fax:** (82)3214-1700 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

Continuação do Parecer: 739.340

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Identificar a presença do HPV por PCR em amostras cervicais;
- Avaliar os principais marcadores genéticos (polimorfismos) de risco envolvidos nas infecções por HPV;
- Investigar os fatores de risco socioambientais para o câncer cervical em mulheres infectadas;
- Avaliar a associação de polimorfismos dos genes envolvidos na resposta imune inata humana e a susceptibilidade à infecção pelo vírus HPV;
- Identificar a correlação dos polimorfismos com os fatores ambientais para a predisposição de infecção por HPV com a construção do banco de dados;
- Mensurar a atividade e expressão de enzimas humanas e proteínas presentes nas amostras das pacientes atendidas no SUS;
- Realizar diagnósticos de biologia molecular e celular na plataforma diagnóstica;
- Identificar os tipos de vírus circulantes na população de mulheres do agreste alagoano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se classifica como risco mínimo e será utilizado o sangue do indivíduo saudável ou com o vírus do HPV com o consentimento do mesmo. A coleta sanguínea é um procedimento simples e que não traz nenhum risco para a população de estudo, e será realizada utilizando as boas práticas laboratoriais. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da veia. Complicações de coleta de sangue

rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. O acesso ao prontuário do paciente poderá conter informações pessoais e sigilosas, e a exposição dessas poderá ser constrangedora para os participantes da pesquisa. Porém, os pesquisadores envolvidos afirmam que os resultados da pesquisa não terão os pacientes identificados. O sigilo e a privacidade do pesquisado será mantida e após o término da pesquisa, os resultados

serão divulgados em encontros científicos e em publicação em revistas especializadas.

Benefícios:

Todos os resultados serão analisados com o intuito de gerar e ampliar o conhecimento sobre o polimorfismo na doença e informações referentes ao acompanhamento, caso esteja ocorrendo com algum dos sujeitos. Obter na população de estudo a frequência gênica na população normal e com HPV, bem como o efeito do polimorfismo no organismo com a doença.

O Relator não entende que a minimização dos riscos encontrem-se adequados a resolução

Endereço: Campus A . C Simões Cidade Universitária
Bairro: Tabuleiro dos Martins **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041 **Fax:** (82)3214-1700 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 739.340

466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados de acordo com a Resolução 466/12

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As solicitações apontadas para adequação do protocolo de pesquisa foram realizadas, portanto o mesmo encontra-se de acordo com a 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MACEIO, 05 de Agosto de 2014

Assinado por:
Deise Juliana Francisco
(Coordenador)

Endereço: Campus A - C Simões Cidade Universitária
Bairro: Tabuleiro dos Martins **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041 **Fax:** (82)3214-1700 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.”(Resolução nº 466/12 – V, do Conselho Nacional de Saúde)

Você está sendo convidado para participar, como voluntária, na pesquisa **“ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS COM HPV EM AMOSTRAS CERVICAIS NAS PACIENTES ATENDIDAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE DO AGRESTE ALAGOANO”**. Após ser esclarecida sobre os objetivos do projeto, e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Alagoas pelo telefone (82) 3214-1041.

Os objetivos principais deste estudo constituem o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce, rápido, eficiente e de baixo custo para doenças causadas pelo papilomavírus, como por exemplo, o câncer do colo do útero, bem como, a formulação de novos medicamentos que possam ser usados na prevenção da infecção ou no tratamento da doença causada por este micróbio.

Participar desta pesquisa é uma opção e no caso de não aceitar participar ou desistir em qualquer fase da pesquisa fica assegurado que não haverá perda de qualquer benefício no tratamento que estiver fazendo. Caso aceite participar deste projeto de pesquisa gostaríamos que soubesse que:

A) Sua contribuição consiste na doação de sangue e/ou SWAB bucal (utilizando a escovinha com uma leve pressão na mucosa da boca), células epiteliais e/ou biopsia para diagnósticos laboratoriais a partir de amostras da região perineal, vulva, vagina e/ou colo do útero. A coleta de sangue não faz parte do procedimento padrão de exames ginecológicos implementados pelo Ministério da Saúde, sendo este um desconforto adicional. O estudo consistirá ainda em

entrevista semi-estruturada e acesso ao seu prontuário, arquivado na unidade de saúde em que ele esteja arquivado, município de Arapiraca - AL.

B) Neste projeto, sua identidade será totalmente preservada. Fica claro que você como participante não terá ganho ou perda financeira relacionada com a participação no projeto, e a qualquer momento pode desistir de colaborar da pesquisa.

C) Com a participação no projeto às informações geradas pelo diagnóstico serão informadas através da equipe do posto de saúde em que você foi atendida, e no caso de necessidade de tratamento será dado o encaminhamento devido.

C) Assim como num exame ginecológico periódico, existe apenas um desconforto no momento da observação do colo do útero, de onde será feita uma coleta. Os riscos relacionados à coleta de sangue, que não faz parte do exame ginecológico periódico, são: leve desconforto no momento da coleta, e possibilidade de surgimento de um pequeno trauma no local da coleta que desaparecerá após 24 ou 48 horas. Os riscos à minha saúde física e mental são mínimos. Eu terei como benefício ser informado (a) do resultado da minha contribuição e da pesquisa em geral.

D) As informações obtidas desta pesquisa serão publicadas em congressos, jornais e revistas científicas, bem como, veiculadas em meios de acesso do público em geral, sempre respeitando o sigilo dos participantes da pesquisa. Os produtos e serviços obtidos a partir desta pesquisa serão disponibilizados a toda a população, principalmente aos colaboradores do referido projeto.

E) O estudo se destina as mulheres atendidas nas unidades de saúde pública do município de Arapiraca - AL. Esse estudo começará em Maio 2014 e terminará em Maio de 2016.

Tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo; recebi da pesquisadora profª. Mcs Karol Fireman de Farias do curso de graduação em enfermagem – UFAL - Campus Arapiraca, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. Que as informações conseguidas através da minha participação no estudo não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto pelos responsáveis, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. **Que não haverá ressarcimento de despesas, caso eu apresente algum custo na realização desta pesquisa e de que eu não serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.**

F) Caso aceite participar, uma cópia deste termo onde consta o nome, telefone e endereço do principal pesquisador, será disponibilizada para o esclarecimento de dúvidas sobre o desenvolvimento projeto a qualquer momento.

Declaro ter recebido as devidas explicações sobre a referida pesquisa, que a participação é voluntária e que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento sem que ocorram quaisquer prejuízos físicos, mentais ou no acompanhamento deste serviço.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Eu, _____

(nome da paciente)

portadora do RG _____, residente _____

_____ fone: _____

aceito participar desta pesquisa.

Nome da mãe: _____.

Endereço do(a) participante-voluntário(a):

Domicílio: _____ (rua, _____ praça, _____ conjunto)

_____ Bloco,nº _____

Complemento: _____ Bairro: _____

CEP/cidade: _____ Telefone: _____

Ponto de Referência: _____

Endereço da responsável pela pesquisa:

Sr.(a): Karol Fireman de Farias

Endereço: Rua São Cristovão, nº 302.

Bairro: Primavera, Cidade: Arapiraca-AL CEP: 57304-400

FONE: (82) 9620-6444 / 8174-8192

E-mail: karolfireman@hotmail.com

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:

Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária. Maceió-AL. Telefone: 82 3214-1041

Arapiraca, _____ de _____ de 2014.

Assinatura da paciente

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha 1

Assinatura da testemunha 2

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos, através dos telefones (82) 9620-6444 / 81748192, falar com **Karol Fireman de Farias**, pesquisadora responsável pela pesquisa.

ANEXO III – Protocolo do kit comercial para extração de DNA



3.D. Isolating Genomic DNA from Tissue Culture Cells and Animal Tissue

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- 15ml centrifuge tubes (for animal tissue)
- small homogenizer (Fisher Tissue Tearor, Cat.# 15-338-55, or equivalent) (for animal tissue)
- trypsin (for adherent tissue culture cells only)
- PBS (for tissue culture cells)
- liquid nitrogen (optional; for tissue culture cells, Step 1.d; for animal tissue grinding, Step 2.b, in place of small homogenizer; and for mouse tail, Step 3.b)
- mortar and pestle (optional; for animal tissue grinding, Step 2.b, in place of small homogenizer; and for mouse tail, Step 3.b)
- 95°C water bath (optional; for tissue culture cells, Step 1.d)
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 0.5M EDTA (pH 8.0) (for mouse tail)
- Proteinase K (20mg/ml in water; Cat.# V3021) (for mouse tail)
- 55°C water bath (for mouse tail)

1. Tissue Culture Cells

- a. Harvest the cells, and transfer them to a 1.5ml microcentrifuge tube. For adherent cells, trypsinize the cells before harvesting.
- b. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 10 seconds to pellet the cells.
- c. Remove the supernatant, leaving behind the cell pellet plus 10–50µl of residual liquid.
- d. Add 200µl PBS to wash the cells. Centrifuge as in Step 1.b, and remove the PBS. Vortex vigorously to resuspend cells.

Note: For cells that do not lyse well in Nuclei Lysis Solution alone (e.g., PC12 cells), perform an additional freeze-thaw step as follows before proceeding to Step 1.e: Wash the cells as in Step 1.d; then freeze in liquid nitrogen. Thaw the cells by heating at 95°C. Repeat this procedure for a total of 4 cycles.

- e. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution, and pipet to lyse the cells. Pipet until no visible cell clumps remain.
- f. Proceed to Section 3.D, Step 4.

2. Animal Tissue (Mouse Liver and Brain)

- a. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution to a 15ml centrifuge tube, and chill on ice.
- b. Add 10–20mg of fresh or thawed tissue to the chilled Nuclei Lysis Solution and homogenize for 10 seconds using a small homogenizer. Transfer the lysate to a 1.5ml microcentrifuge tube. Alternatively, grind tissue in liquid nitrogen using a mortar and pestle that has been prechilled in liquid nitrogen. After grinding, allow the liquid nitrogen to evaporate and transfer approximately 10–20mg of the ground tissue to 600µl of Nuclei Lysis Solution in a 1.5ml microcentrifuge tube.

ANEXO IV – Protocolo de extração de DNA genômico por NaCl (salting out)

1. Aos tubos contendo swab adicionar **600µl** (para tubos de 2ml) ou **400µl**(para tubos de 1,5ml) de TES (Tris HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e **7 µl**(para 600 µl) ou **10 µl** (para 400 µl) de proteinase K (10mg/ml);
2. Incubar por 2h a 42°C;
3. Após a incubação retirar o swab (este passo exige o máximo de cuidado para a retirada da escova que deve ser realizada com uma pinça pequena e exclusiva para o procedimento);
4. Adicionar **84µl** (para 600 µl)ou **116 µl** (para 400 µl) de NaCl e agitar manualmente com vigor;
5. Centrifugar por 1 minuto a 15.000×g;
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 2 vezes **(800 µl)** o volume de etanol absoluto;
7. Agitar e centrifugar os tubos por 1 minuto a 15.000×g;
8. Descartar o etanol absoluto e adicionar **1ml** (1000 µl) de etanol a 70%;
9. Inverter os tubos diversas vezes para lavar o pellet;
10. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 15.000×g e desprezar o sobrenadante;
11. Deixar os tubos abertos por 30min invertidos em papel limpo, para evaporação do etanol residual;
12. Dissolver o DNA em **60µl** de TE 10:0,1 (Tris HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM)
OBS: Passar no vortex;
13. A concentração de DNA obtida é em torno de **80ng/µl**.