

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *INF-*
γ E *IL-12B* EM PACIENTES COM E SEM LESÕES INTRA-
EPITELIAIS CERVICAIS CAUSADAS POR HPV.**

VIVIANE DO CARMO VASCONCELOS DE CARVALHO

RECIFE

2011

VIVIANE DO CARMO VASCONCELOS DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *INF- γ* E *IL-12B* EM PACIENTES COM E SEM LESÕES INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS CAUSADAS POR HPV.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Figueiredo Porto.

COORIENTADOR: Prof^º Dr^º Paulo Roberto Eleutério de Souza.

RECIFE
2011

Carvalho, Viviane do Carmo Vasconcelos de

Avaliação dos polimorfismos dos genes INF- γ e IL-12B em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais causadas por HPV/ Viviane do Carmo Vasconcelos de Carvalho. – Recife: O Autor, 2011.

68 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Papilomavírus 2. Vírus- genética 3. Câncer de útero I. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

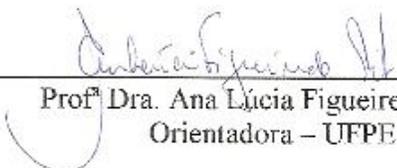
UFPE/CCB-2011-160

VIVIANE DO CARMO VASCONCELOS DE CARVALHO

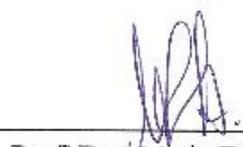
AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *INF- γ* E *IL-12B* EM PACIENTES COM E SEM LESÕES INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS CAUSADAS POR HPV.

Aprovada em: 23 / 02 / 2011

Banca examinadora:


Profª Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Orientadora – UFPE


Profª Dra. Maria de Mascena Diniz Maia
Membro – UFRPE


Profª Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vicira
Membro – UFRPE

Dedicatória

A Deus, meus pais, meus
irmãos, noivo e família.

Agradecimentos

A Deus, pelo amor maior, pela proteção e força;

A minha mãe Marleide e meu noivo Antônio Senilson pelo amor, incentivo e compreensão;

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco;

À direção do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, na pessoa do Dr. José Luiz de Lima Filho.

A minha orientadora, Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela oportunidade;

Ao prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza pela orientação, compreensão, oportunidade e ajuda;

A todos do laboratório de Biologia Molecular do LIKA;

A Dra. Yara Gomes, pelo apoio e compreensão;

A Camilla, Jamilly, Conceição, Mayara e Sérgio pela amizade, contribuição e parceria do desenvolvimento desse trabalho;

A Ana Lisa, Cássia Docena, Tatiana Nunes, Raimundo Pimentel, Priscila Neves e Bruna Santos pela amizade, apoio e incentivo.

Resumo

O Papilomavírus Humano (HPV) é um agente sexualmente transmissível capaz de infectar pele e mucosas, sendo o principal causador de câncer cervical e suas lesões precursoras, as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). A maioria dos casos de infecção pelo HPV regride espontaneamente, mesmo quando o vírus possui genótipo oncogênico. Sabe-se que os componentes genéticos e imunológicos do indivíduo assumem papel importante na eliminação do vírus. Vários estudos sugerem que alguns sítios polimórficos em genes de citocinas levam a variações nos níveis dessas moléculas, o que pode influenciar o desenvolvimento de câncer cervical em pacientes infectadas por HPV. Neste estudo avaliou-se a possível correlação entre a infecção por HPV de alto risco oncogênico e os polimorfismos existentes nas regiões +874 do gene *INF- γ* e 3'UTR +1188 do gene *IL-12B* em amostras de DNA de secreção vaginal. A população estudada foi composta de 76 mulheres saudáveis e 162 mulheres, HPV positivas, com lesão cervical, NIC I (45), NIC II (55), NIC III (53) e câncer cervical (9), na cidade de Recife – Brasil. Ao ser avaliado o polimorfismo +874 (T/A), verificou-se que não houve diferença significativa nas distribuições genotípica ($p = 0,4192$) e alélica ($p = 0,370$) entre os grupos de pacientes e o grupo controle. Comparando-se as pacientes com NIC de baixo grau com as de alto grau, também não se verificou diferença genotípica ($p = 0,8099$) e alélica ($p = 1,00$). Para o gene *IL-12B*, a presença do genótipo AA ($p = 0,009$) e do alelo A ($p = 0,0038$) estavam mais presentes no grupo de pacientes com lesão cervical que no grupo controle. Quando as amostras foram estratificadas de acordo com grau de lesão cervical, o genótipo AA ($p = 0,0036$) e o alelo A ($p = 0,0010$) estavam mais frequentes no grupo com lesão cervical de alto grau que no grupo com lesão cervical de baixo grau. O alelo mutante C mostrou-se importante na proteção contra as lesões. Por outro lado, o polimorfismo +874 T/A no gene *INF- γ* não parece interferir no desenvolvimento de lesões cervicais. Estes resultados mostram que diferentes citocinas podem apresentar papéis diferentes na susceptibilidade a infecção e na progressão de lesões cervicais.

Palavras Chaves: HPV, Lesão Intraepitelial cervical, *INF- γ* e *IL-12B*.

Abstract

The Human Papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted agent that infects the skin and mucous membranes, and is the main cause of cervical cancer and its precursor lesions, the cervical intraepithelial neoplasia (NICs). Most cases of HPV infection resolves spontaneously, even when the virus has oncogenic genotype. It is known that genetic and immunological components of an individual play an important role in eliminating the virus. Several studies suggest that some polymorphic sites in cytokine genes lead to variations in levels of these molecules, which may influence the development of cervical cancer in HPV infected patients. In this study we evaluated the possible correlation between high risk HPV infection and polymorphisms in the regions +874 *INF- γ* gene and 3'UTR +1188 *IL-12B* gene in DNA samples of vaginal secretion. The study population consisted of 76 healthy women and 162 women, HPV positive with cervical lesion, CIN I (45), CIN II (55), CIN III (53) and cervical cancer (9), in Recife - Brazil. The assessment of the +874 polymorphism (T/A), showed that there was no significant difference in genotype ($p = 0.4192$) and allele ($p = 0.370$) distribution between patient and control groups. Comparing the low and high CIN degree patients, there was no genotypic ($p = 0.8099$) and allele ($p = 1.00$) differences. For the *IL-12B* gene, the presence of AA genotype ($p = 0.009$) and A allele ($p = 0.0038$) were observed mainly in patients with cervical injuries than control group. When samples were stratified according to grade of cervical lesion, the AA genotype ($p = 0.0036$) and A allele ($p = 0.0010$) were more frequent in high grade cervical lesions group than in low-grade cervical lesion group. The mutant C allele was important in protecting from injury. Moreover, polymorphism +874 T/A gene *INF- γ* does not seem to interfere the development of cervical lesions. These results show that different cytokines may have different roles in susceptibility to infection and progression of cervical lesions.

Keywords: HPV, cervical intraepithelial lesion, *INF- γ* and *IL-12B*.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Micrografia eletrônica de partículas de papilomavírus.....pág 17
- Figura 2.** Representação esquemática do genoma do HPV. Observam-se, em azul, a região precoce “E”, em vermelho, a região tardia “L” e, em lilás, a região reguladora “LCR”. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. Na parte interna estão indicadas as posições dos genes no genoma viral.....pág 18
- Figura 3.** Classificação do HPV com base na homologia da sequência do DNA da região L1.....pág 19
- Figura 4.** Árvore filogenética mostrando os tipos de PV identificados até 2010....pág 20
- Figura 5.** Traumas no epitélio deixam as células basais susceptíveis à infecção pelo HPV. Após entrada no núcleo da célula, o DNA viral permanece como um epissomo e se divide simultaneamente, mas de forma independente do genoma da célula hospedeira. Após a divisão, as células migram da camada basal até a superficial. Durante a migração, as células infectadas continuam se multiplicando e o genoma viral é amplificado. Na camada intermediária, as proteínas L1 e L2 são expressas. Há montagem e empacotamento dos vírus na camada superficial e as partículas infecciosas liberadas com a esfoliação da pele.....pág 23
- Figura 6.** Prevalência da infecção por HPV. Em (a) câncer cervical invasivo (CCI) e (b) lesão de alto grau (HSIL) por continente.....pág 25
- Figura 7.** Através de microlesões no epitélio cervical, os HPV atingem as células basais. O vírus se replica como DNA epissomal (núcleos roxos), com expressão das proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Nas camadas imediatamente superiores, o genoma é replicado e os genes L1 e L2 são expressos, promovendo a encapsidação dos genomas e novas infecções. Lesões não tratadas podem evoluir ao câncer invasivo, com integração do DNA ao genoma do hospedeiro (núcleo vermelho), com a perda ou rompimento de E2 e superexpressão de E6 e E7.....pág 27
- Figura 8.** Perfis de resposta imune derivados da diferenciação de células T CD4+ *naïve*, com as respectivas citocinas que induzem a diferenciação, as citocinas produzidas características de cada perfil e os fatores de transcrição críticos para a determinação do perfil imunológico.....pág 31

- Figura 9.** Estrutura morfológica da IL-12 e de seu receptor.....pág 33
- Figura 10.** Ações biológicas da IL-12.pág 34
- Figura 11.** Ações biológicas do INF- γpág 36
- Artigo - Figura 1.** Curva de *melting* gerada na genotipagem das amostras para o *INF-g*.
Em a – homozigoto selvagem T/T (1 pico). Em b – heterozigoto T/A (2 picos). Em c – homozigoto mutante A/A (1 pico).....pág 53
- Artigo – Figura 2.** Detecção dos genótipos possíveis para o polimorfismo +874 T/A do gene *INF-g*. Coluna 1: Ladder 100pb; colunas 2 e 3: amostra 1, apresentando amplificação apenas no alelo A (genótipo AA); colunas 4 e 5: amostra 2, apresentando amplificação apenas com o alelo T (genótipo TT); e colunas 6 e 7: amostra 3, apresentando amplificação com os dois alelos, (genótipo AT).....pág 53
- Artigo - Figura 3.** Gel de agarose a 3% corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia), demonstrando a presença dos três genótipos possíveis para o polimorfismo +1188 A/C do gene *IL-12B*. 1: Ladder 100pb; 2A: amostra 1 não-digerida; 2B: amostra 1 digerida (selvagem AA); 3A: amostra 2 não-digerida; 3B: amostra 2 digerida (mutante homozigota CC) , 4A: amostra 3 não-digerida; 4B: amostra 3 digerida (mutante heterozigota AC).....pág 55

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição das funções dos genes do papilomavírus humano.....pág 18

Artigo - Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas do gene *INF- γ* (+874 T/A) entre o grupo controle, os casos de NIC e os de câncer cervical.....pág 55

Artigo - Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas do gene *IL-12B* (+1188 A/C) entre o grupo controle, os casos de NIC e os de câncer cervical.....pág 56

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. HPV – Papilomavírus Humano
2. DST – Doença sexualmente transmissível
3. DNA – Ácido desorribonucléico
4. IL – Interleucina
5. INF- γ – Interferon gama
6. IL-12 A – Subunidade A da Interleucina 12
7. IL-12 B – Subunidade B da Interleucina 12
8. IL-12 R – Receptor de Interleucina 12
9. Th – T helper – T auxiliar
10. NK – Natural Killer
11. CD – Cluster Differentiation – Grupamento de diferenciação
12. SNP – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo
13. A – Adenina
14. C – Citosina
15. T – Timina
16. IMIP - Hospital Materno Infantil Prof. Fernando Figueira
18. LACEN- Laboratório Central
19. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
20. PCR-RFLP-*Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction*
21. LCR – Longa Região de Controle
22. pb – pares de bases
23. ATP – Adenosina tri-fosfato
24. PV – Papilomavírus
25. HSPGs - Glicoproteína Heparan-Sulfato
26. CCI – Câncer Cervical Invasivo
27. HSIL – Lesão Intraepitelial de Alto Grau
28. LSIL – Lesão Intraepitelial de Baixo Grau
29. NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical
30. JEC – Junção Escamo-Colunar
31. TGF – Fator de Crescimento Transformador

- 32 . UTR – Untranslated Region – Região Não Traduzida
33. IFNGR – Receptor de interferon gama
34. kD – Kilodaltons
35. MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
36. SSP - *Sequence-Specific Primers* – Primers de Sequência Específica
37. Tm – Temperatura de *melting*
38. UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco
39. OR - Odds Ratio

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 O Papilomavírus Humano	17
3.1.1 Estrutura e Organização do Genoma	17
3.1.2 Classificação	19
3.1.3 Infecção pelo HPV	21
3.1.4 Epidemiologia das Infecções por HPV	23
3.2 HPV, Câncer Cervical e suas Lesões Precursoras	26
3.2.1 Cofatores	28
3.3 Resposta Imune ao HPV	29
3.3.1 Interleucina 12 (IL-12)	33
3.3.2 Interferon-gama (INF- γ)	35
3.4 Métodos de detecção de SNPs	37
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5. ARTIGO CIENTÍFICO	46
6. CONCLUSÕES	64
7. ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	65
8. NORMAS PARA SUBMISSÃO À REVISTA	66

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é a causa de doença viral sexualmente transmissível (DST) mais frequente na população mundial (DE SANJOSE et al., 2007; NAKAGAWA et al., 2010). O vírus infecta a pele ou a mucosa e está associado com o surgimento de lesões benignas e malignas (GARCIA-ESPINOSA et al., 2009).

A partir da década de 70 foi verificado que alterações pré-malignas no colo uterino, as verrugas e os condilomas, implicavam na presença de um agente infeccioso, o HPV. Alguns anos mais tarde, o vírus foi associado ao desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras. DNA do HPV tem sido detectado em 95-99% dos casos de câncer cervical e em cerca de 5-20% na população saudável (VON LINSINGEN et al., 2009).

No entanto, a simples presença do vírus no epitélio não implica necessariamente o desenvolvimento de câncer cervical, pois a maioria das infecções causadas pelo HPV regride espontaneamente e não acarreta manifestação clínica. Por isso, este tipo de câncer é considerado uma doença multifatorial. Fatores relacionados ao hospedeiro contribuem significativamente na patogênese da doença, sendo o sistema imune objeto de diversos estudos que fazem associação entre a resposta imune do indivíduo e a persistência da infecção pelo HPV (FARZANEH et al., 2006; GANGWAR et al., 2009).

Durante uma infecção viral, há liberação de diversas citocinas que podem atuar na defesa contra o agente infeccioso. A resposta imune ao vírus pode ser influenciada por variantes polimórficas que podem modificar a expressão gênica e alterar o nível do produto final, o que tende a favorecer a progressão da doença (VON LINSINGEN, 2008).

Existem duas citocinas que têm participação central na resposta imune contra vírus: a interleucina 12 (IL-12) e o interferon gama (INF- γ). Ambas são citocinas extremamente importantes na resposta imune mediada por células, a qual é indispensável na eliminação de microrganismos intracelulares como o HPV (ABBAS et al., 2008).

A primeira é um heterodímero composto de dois componentes distintos: p35 (IL-12A) e p40 (IL-12B) que, juntos, constituem a forma biologicamente ativa, a p70. Esta se liga ao seu receptor (IL-12R) o qual é expresso em células T e NK (*Natural-Killer*) ativadas para exercer suas funções biológicas. É a principal citocina mediadora da

resposta imune Th1, estimulando para isso a produção de IFN- γ pelas células T e NK. Atua ainda na indução da imunidade mediada por células, ligando a resposta imune inata à adaptativa, além de ter atividade antitumoral (ABBAS et al., 2008; HAN et al., 2008).

A segunda citocina, INF- γ , participa da resposta imune celular e é um fator ativador de macrófago secretado por células CD4+, CD8+ e células NK ativadas. É uma proteína com propriedades antivirais, imunomoduladoras e antitumorais. Está também envolvido no controle de proliferação, diferenciação e resposta das células B e T (SCHRODER et al., 2004).

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) na região 3'UTR +1188 A/C tem sido relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças de acordo com as alterações quantitativas que pode causar na secreção desta citocina (CERHAN et al., 2007; HAN et al., 2008; LAN et al., 2006; PURDUE et al., 2007). Em trabalho desenvolvido recentemente, Chen et al. (2009) demonstraram que este polimorfismo contribui com o risco aumentado ao desenvolvimento de câncer cervical. A relevância no estudo desta citocina se deve ao fato que, em relação à predisposição ao câncer cervical em associação ao HPV, apenas dois trabalhos foram publicados e nenhum deles envolvendo a população brasileira.

Pravica et al. (2000) descreveram o polimorfismo localizado no primeiro intron do gene *INF- γ* (+874 T/A), o qual faz parte de alguns estudos sobre o seu papel na predisposição ao câncer cervical em pacientes da Coreia (SONG et al., 2008), Índia (GANGWAR et al., 2009) e África (GOVAN et al., 2003). No Brasil, apenas um estudo com pacientes de Curitiba – PR foi realizado. Os dados que correlacionam a presença desse polimorfismo ao risco de desenvolvimento de lesões cervicais são discordantes de acordo com a população estudada.

Uma vez que a presença de polimorfismos gênicos e sua associação com doenças variam entre as populações, este estudo visou investigar a presença de polimorfismos existentes nos genes das interleucinas IL12B e INF- γ em amostras de DNA de pacientes com ou sem lesão intraepitelial cervical atendidas no Hospital Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP e no Laboratório Central (LACEN) do estado de Pernambuco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se existe correlação entre a presença de polimorfismos nos genes das interleucinas INF- γ e IL12B e a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesão intraepitelial cervical ou câncer, causados pela infecção pelo HPV.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o polimorfismo dos genes IL-12B e INF- γ pelas técnicas da PCR-RFLP e PCR em Tempo Real, respectivamente em amostras de DNA provenientes de mulheres com infecção por HPV em diferentes estágios de lesões, assim como em pacientes saudáveis;
- Determinar a frequência dos polimorfismos no gene *IL-12B* e *INF- γ* e correlacionar com a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e/ou câncer cervical.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Papilomavírus Humano

3.1.1 Estrutura e Organização do Genoma

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus pertencente à família *papillomaviridae* que infecta células basais nos epitélios cutâneos e mucoso, formando lesões conhecidas como papilomas. Trata-se de um vírus que apresenta capsídeo icosaédrico, com 72 capsômeros e cerca de 55 nm de diâmetro. Como não possui um envelope, o vírus é relativamente estável e resistente à dessecação, e pode se manter viável no meio extracelular por até uma semana (DOORBAR, 2005; DUFFY et al., 2003; KANODIA et al., 2007) (Figura 1).

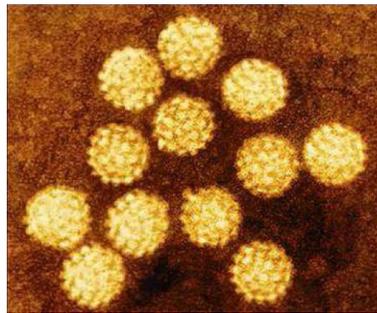


Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas de papilomavírus (STANNARD, 1995).

O genoma do HPV é constituído por uma dupla fita de DNA circular com 8 genes e cerca de 8000 pares de bases associadas a histonas celulares H2a, H2b, H3 e H4, formando um complexo semelhante à cromatina (BERNARD, 2002; BERNARD et al., 2010; DOORBAR, 2005; KANODIA et al., 2007; ZUR HAUSEN, 1996). Possui organização simples, que pode ser dividida em 2 regiões codificantes: região precoce “E” (do inglês *Early*) e região tardia “L” (do inglês *Later*) – referindo-se ao momento em que são expressas durante a infecção - e uma região não-codificante denominada de Longa Região de Controle “LCR” (do inglês *Long Control Region*) (KANODIA et al., 2007; SCHEURER et al., 2005; STOLER, 2003; SZOSTEK et al., 2006) (Figura 2).

A região precoce contém de 7 a 8 genes (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8) e a região tardia 2 genes (L1 e L2). A primeira contém o DNA para a replicação viral (E1,

E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). Os genes E3 e E8 não têm ação conhecida, e estão ausentes na maioria dos HPVs. Em relação aos genes de expressão tardia, L1 e L2, estes codificam as duas proteínas que formam o capsídeo. A região regulatória que separa estes conjuntos de genes é constituída por 1.000 pb e contém elementos reguladores da expressão e replicação gênicas e do empacotamento de partículas virais (SANCLEMENTE; GILL, 2002) (Tabela 1).

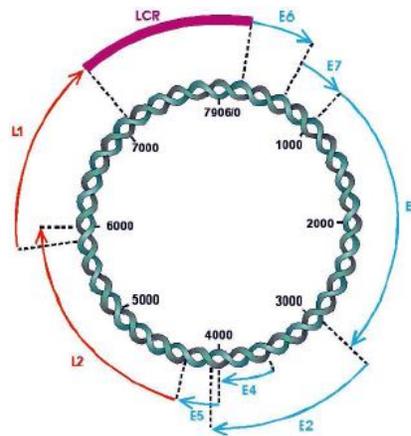


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Observam-se, em azul, a região precoce “E”, em vermelho, a região tardia “L” e, em lilás, a região reguladora “LCR”. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. Na parte interna estão indicadas as posições dos genes no genoma viral (BURK, 1999).

Tabela 1: Descrição das funções dos genes do papilomavírus humano.

Gene	Função
E1	Atividade de DNA helicase; ligação de ATP DNA dependente; atividade de ATPase;
E2	Papel na replicação e na repressão da replicação; regulador da transcrição e replicação viral; controle da região de expressão precoce (E); necessária para a replicação viral eficiente junto com E1;
E3	Sem função conhecida, presente em uma minoria de vírus;
E4	Expresso primariamente em epitélios em diferenciação; associado ao citoesqueleto de queratina de células epiteliais em cultura; papel na liberação do vírus;
E5	Atividade de transformação do HPV 16 <i>in vitro</i> ; possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> ; pode ter papel na iniciação da carcinogênese;
E6	Papel no processo de transformação junto com E7; propriedades de ativação transcripcional; nos HPV's de alto risco, inativa p53 pela degradação rápida através da via ubiquitina; junto com E7 propicia o ambiente celular para a replicação viral;
E7	Induz síntese de DNA em células em repouso; se liga à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma, resultando em sua inativação funcional, permitindo a progressão para a fase S do ciclo celular; nos HPVs de baixo risco, liga-se menos eficientemente que a proteína E7 nos tipos de alto risco;
E8	Sem função conhecida, presente em uma minoria de vírus;
L1	Proteína principal do capsídeo;
L2	Proteína menor do capsídeo.

(SANCLEMENTE; GILL, 2002).

3.1.2 Classificação

Os *papilomavirus* (PV) pertencem à família *Papillomaviridae* a qual contém 29 gêneros formados por tipos isolados de humanos (120 tipos), mamíferos não-humanos (64 tipos), pássaros (3 tipos) e répteis (2 tipos) (BERNARD et al., 2010).

Os HPV são classificados em tipos, subtipos e variantes com base na homologia de seu DNA. Um novo genótipo é definido se possuir menos de 90% de similaridade com a sequência nucleotídica de L1, após o sequenciamento completo do genoma. Os subtipos são definidos quando apresentam entre 2 a 10% de divergência com a sequência nucleotídica de L1, enquanto as variantes apresentam menos de 2% de divergência (ESMAEILI et al., 2008) (Figura 3).

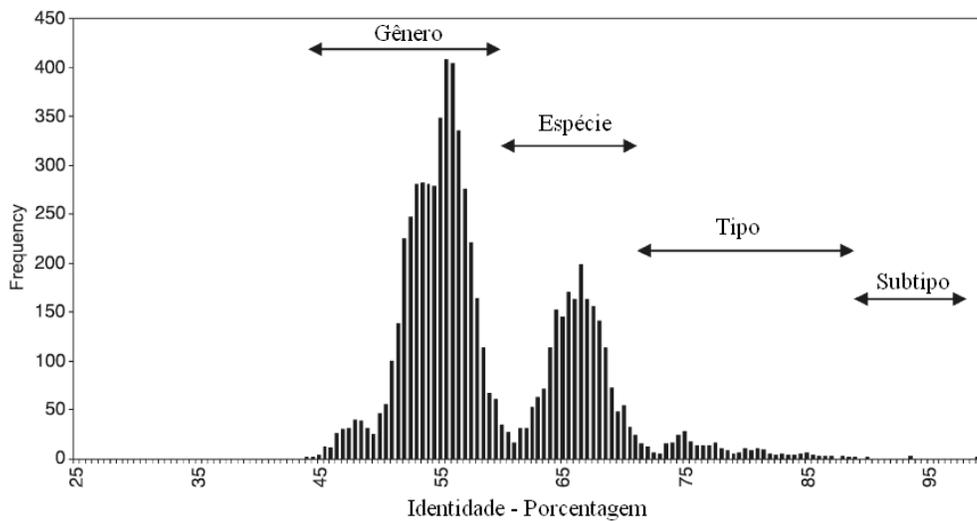


Figura 3. Classificação do HPV com base na homologia da sequência do DNA da região L1. (DE VILLIERS et al., 2004).

O HPV é constituído por 5 gêneros a saber: Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gamma-papillomavirus, Mu-papillomavirus e Nu-papillomavirus, sendo os 3 primeiros os mais comuns e clinicamente importantes. De Villiers et al. (2004) descreveram a taxonomia dos HPV tipos 1 ao 96 (excluindo os tipos 46, 55, 64 e 79). Desde aquele ano, novos tipos de HPV foram descritos por diversos autores, sendo publicada em 2010 pelo grupo deste mesmo autor, uma nova árvore filogenética englobando todos os PV descobertos até então (BERNARD et al., 2010) (Figura 4).

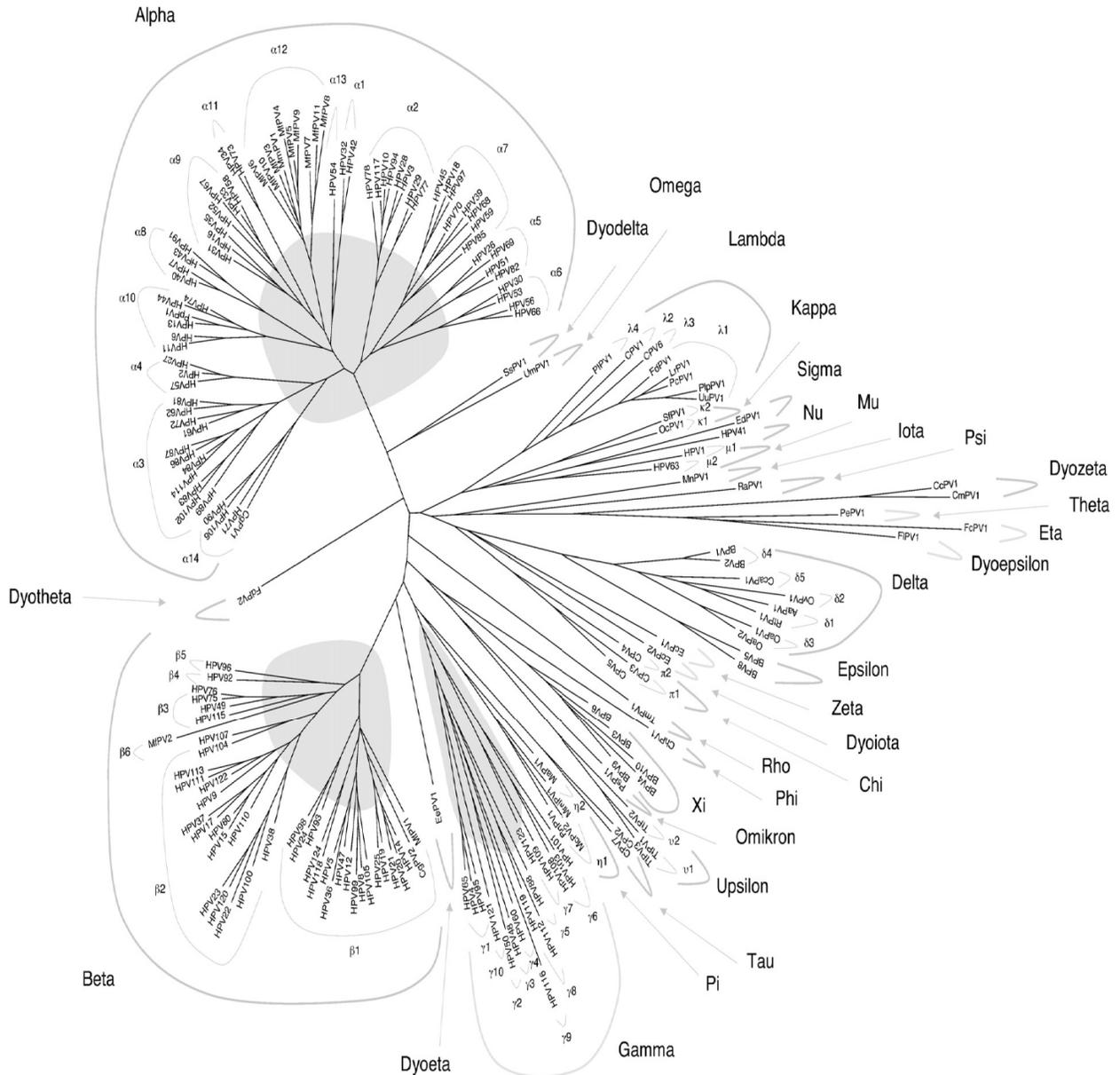


Figura 4. Árvore filogenética mostrando os tipos de PV identificados até 2010 (BERNARD et al., 2010).

Os tipos de HPVs podem ser classificados ainda de acordo com o tropismo celular em cutâneos e mucosotrópicos. Os tipos cutâneos são epidermotrópicos e infectam a pele das mãos e dos pés e os mucosotrópicos são os que infectam as mucosas urogenitais, anais e ororrespiratórias. Estes podem ainda ser divididos de acordo com o potencial de causar lesões benignas ou malignas: HPV de baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e *candHPV89/Cp6108*), causadores de verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino; HPV de alto risco (16, 18,

31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), encontrados em lesões de alto grau e carcinoma invasor; HPV provavelmente carcinogênico (26, 53 e 66) e HPV de risco indeterminado (13, 32, 34, 40, 55, 57, 62, 64, 67, 69, 83, MM4, MM7, MM8, MM9, LVX100, IS39, CP141, CP8304, CP4173, CP8061), (FUESSEL HAWS et al., 2004; MCMURRAY et al., 2001; MUNOZ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; SCHEURER et al., 2005; STOLER, 2003).

Em torno de 50% a 75% das infecções pelo HPV são causadas pelos tipos oncogênicos (CLIFFORD et al., 2005; MUNOZ et al., 2003). Os 13 tipos de HPV considerados de alto risco pertencem ao gênero Alphapapillomavirus e são representados principalmente pelos tipos 16 e 18 (DE VILLIERS et al., 2004).

3.1.3 Infecção pelo HPV

Existem duas formas principais de transmissão do vírus através do epitélio traumatizado: a via sexual, que representa a maioria dos casos; e a via não-sexual através de fômites (toalhas, roupas íntimas, instrumentos ginecológicos contaminados) e transmissão materno-fetal (QUEIROZ et al., 2007).

O ciclo de replicação viral é de fundamental importância para a compreensão da patogênese e da imunobiologia desse vírus (STANLEY, 2001). O ciclo de vida do HPV acontece concomitante à diferenciação das células epiteliais, processo que dura aproximadamente 3 semanas (VON LINSINGEN, 2008). Acredita-se que o vírus inicia sua infecção nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico que, à medida que se dividem, migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas (DOORBAR, 2005).

Após atingir a região das células basais e parabasais, as partículas virais precisam ligar-se aos receptores celulares ou fatores de ligação para penetração na célula (MARSH; HELENIUS, 2006). Para ocorrer a ligação entre o vírus e a membrana celular, muitos HPV necessitam do ligante glicoproteína heparan-sulfato (HSPGs), outros podem interagir com componentes da matriz extracelular, a laminina-5, porém, Patterson et al. (2005) demonstraram que a infecção de queratinócitos pelo HPV-31 não é dependente de HSPGs, sugerindo haver diferenças de receptores celulares na ligação e internalização dos diferentes tipos de HPV.

Após se aderir à membrana celular, o vírus é internalizado por endocitose em um período de horas. Em seguida, o DNA viral é transferido para o núcleo da célula,

processo que parece ser facilitado pela proteína do capsídeo viral L2 (DAY et al., 2007). Inicialmente, o genoma permanece nas células da camada basal como um epissomo estável, sem integração ao genoma da célula hospedeira (CARMO; FIORINI, 2007; DOORBAR, 2005; KANODIA et al., 2007). O DNA viral é replicado durante a fase S do ciclo celular normal de uma célula hospedeira. Os genomas são então divididos uniformemente entre as células-filhas durante a divisão celular (YOU et al., 2004).

O genoma do HPV pode replicar-se de duas maneiras diferentes dentro da célula hospedeira. Uma delas é como um epissomo extra-cromossomal ou plasmídeo em lesões benignas associadas aos HPVs de baixo risco, e em displasias leves e moderadas associadas aos HPVs de alto risco. Já em lesões de alto grau e no carcinoma *in situ*, o DNA viral está frequentemente integrado ao genoma da célula hospedeira (GARLAND, 2002), embora não seja condição indispensável para o desenvolvimento do câncer (GROSS; BARRASSO, 1999).

Admite-se que as proteínas E1 e E2 sejam expressas para manter o DNA epissomal e colabora com a correta segregação do genoma viral durante o ciclo celular. (DOORBAR, 2005; MCMURRAY et al., 2001; SCHEURER et al., 2005; WILSON et al., 2005). E4 e E5 também contribuem para o processo de amplificação do genoma do HPV: E4 se acumula na célula no momento da amplificação do genoma viral e, em quantidades reduzidas, prejudica o processo de replicação. E5 reduz a acidificação dos endossomos, mantendo um ambiente favorável para a multiplicação do vírus (DISBROW et al., 2005; GENTHER et al., 2003; STRAIGHT et al., 1993; WILSON et al., 2005).

Quando ocorre o processo de integração, há perda do gene E1 e inativação de E2, tendo como resultado a expressão descontrolada dos oncogenes virais E6 e E7 os quais estão fortemente associados ao processo de transformação e imortalização celular (GARLAND, 2002; KANODIA et al., 2007). Essas proteínas são capazes de formar complexos com as proteínas celulares p53 e pRB, respectivamente, inativando suas funções de controle do ciclo celular. A célula, então entra diretamente na fase S da mitose sem haver o correto processo de reparo do DNA, causando instabilidade genética, acúmulo de mutações e o possível desenvolvimento de neoplasias (CARMO; FIORINI, 2007; KIM et al., 2001; SCHEURER et al., 2005; STOLER, 2003; SZOSTEK et al., 2006).

Outra proteína produzida pela região codificadora E do genoma do HPV também é considerada tumorigênica, a proteína E5, pois ela aumenta a eficiência da imortalização de queratinócitos por E6 e E7, prejudica significativamente a comunicação célula-célula, além de inibir a expressão do gene supressor de tumor p21 (TSAO et al., 1996). Kabsch e Alonso (2002) sugerem ainda que E5 pode interferir com a habilidade de o sistema imune eliminar as células infectadas por prejudicar a sinalização celular.

Após replicação do DNA viral nas camadas basais e parabasais, há montagem do capsídeo nas camadas mais superiores do epitélio, havendo expressão das proteínas estruturais L1 e L2. Este fenômeno tem sua eficiência aumentada pela proteína E2. (ZHAO et al., 2000). Assim, são formadas as partículas virais que são liberadas quando as células infectadas chegam até a superfície do epitélio (DOORBAR, 2005) (Figura 5).

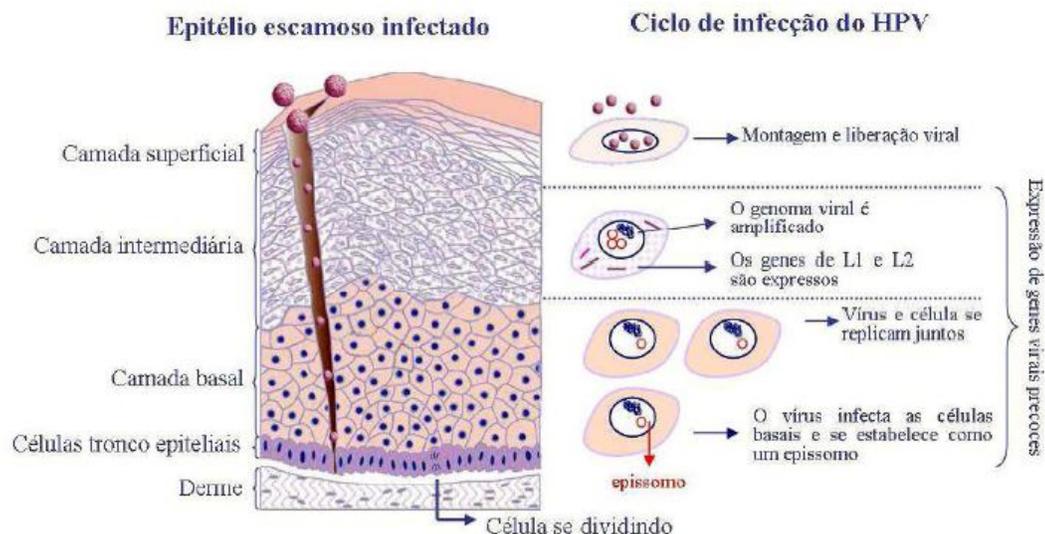


Figura 5. Traumas no epitélio deixam as células basais susceptíveis à infecção pelo HPV. Após entrada no núcleo da célula, o DNA viral permanece como um episômo e se divide simultaneamente, mas de forma independente do genoma da célula hospedeira. Após a divisão, as células migram da camada basal até a superficial. Durante a migração, as células infectadas continuam se multiplicando e o genoma viral é amplificado. Na camada intermediária, as proteínas L1 e L2 são expressas. Há montagem e empacotamento dos vírus na camada superficial e as partículas infecciosas liberadas com a esfoliação da pele (ALENCAR, 2009; DOORBAR, 2005).

3.1.4 Epidemiologia das Infecções por HPV

A prevalência do HPV depende da região geográfica, porém os tipos 16 e 18 contribuem com mais de 50% das infecções detectadas em lesões de alto grau, 70% das

infecções em câncer invasivo e 81,5% das infecções em adenocarcinomas, sendo esses dois tipos contribuintes para a persistência e progressão da lesão cervical quando comparados com outros tipos de alto risco (THOMISON et al., 2008).

Smith et al. (2007) realizaram um estudo de meta-análise através de dados publicados no Medline, compreendendo 14.595 casos de câncer cervical invasivo (CCI) e 7.094 casos de lesão intraepitelial de alto grau espalhados pelo mundo. Os dados comprovaram que, em casos de CCI em todos os continentes, o HPV 16 é o tipo mais comumente encontrado nas lesões, seguido pelo 18. Os outros tipos mais comuns foram os 33, 45, 31, 58, 52 e 35, com variações entre os continentes quanto a esta ordem. Também nos casos de HSIL o HPV 16 foi o tipo mais frequente. Os outros tipos encontrados foram similares aos obtidos em CCI, exceto pela ausência do 45. A ordem de prevalência foi diferente, sendo os tipos 31, 33, 58, 18, 52, 35 e 51 subsequente ao 16. Na América Central/Sul, nota-se a importância epidemiológica do HPV 58, que ocupou o segundo lugar em ordem de prevalência neste continente e só em seguida aparecendo o tipo 18 (Figura 6).

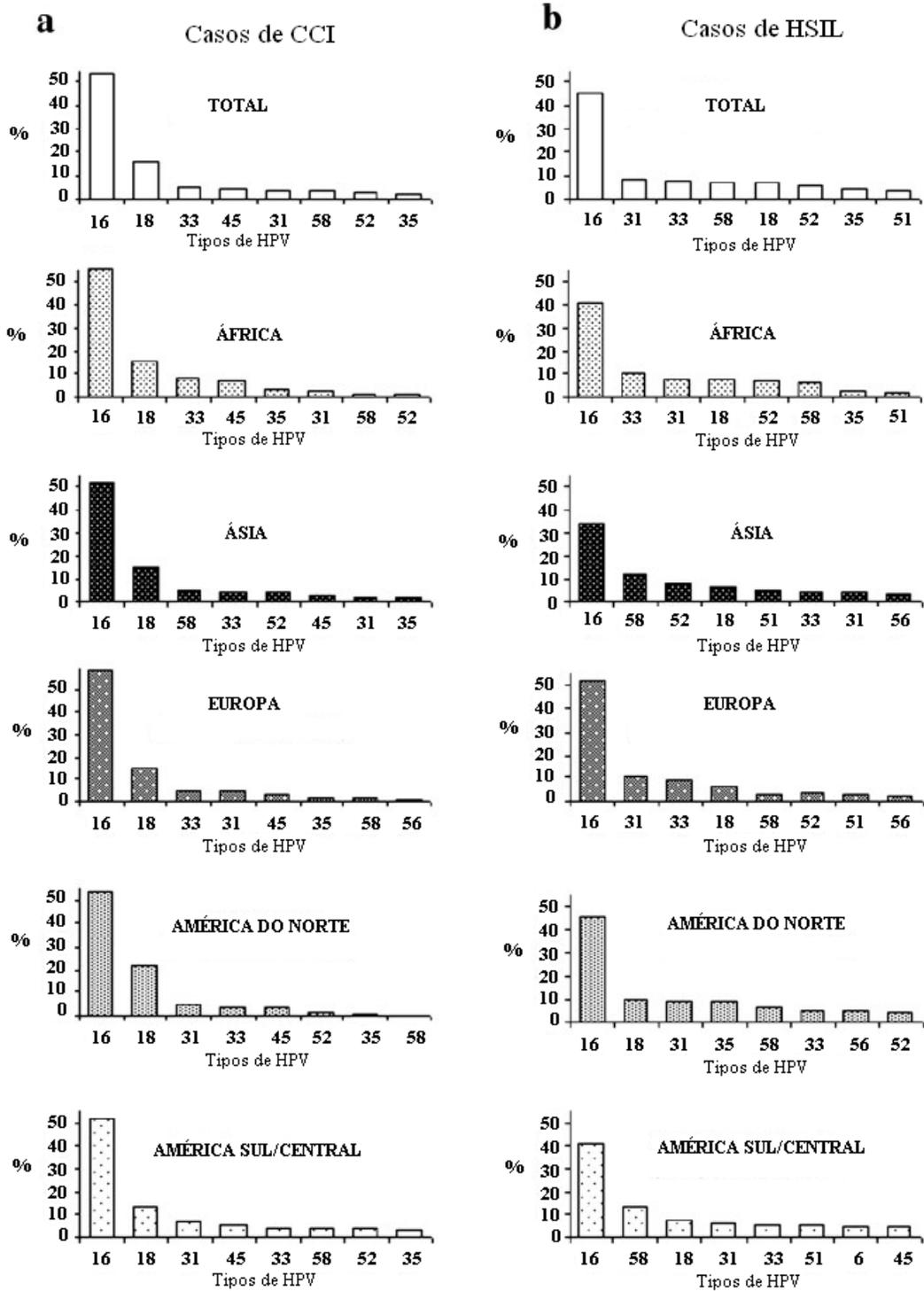


Figura 6. Prevalência da infecção por HPV. Em (a) câncer cervical invasivo (CCI) e (b) lesão de alto grau (HSIL) por continente (SMITH et al., 2007).

No Brasil, os dados sobre a prevalência dos tipos de HPV são bastante limitados, mas os estudos apontam diferenças na distribuição dos diferentes tipos. Pereira et al. (2007) verificaram que no Rio de Janeiro, em amostras de pacientes com HSIL, o tipo mais prevalente é o HPV 16, em seguida aparecem os tipos 18, 35 e 58. Em Brasília, um estudo realizado por Câmara et al. (2003) mostraram a seguinte ordem na distribuição do HPV: 16, 58, 31, 18 e 33. Já em Recife, os tipos mais frequentemente encontrados são os tipos 16, 31, 33, 58 e só então o tipo 18 (LORENZATO et al., 2000).

Com a utilização de testes de diagnósticos cada vez mais sensíveis para detecção do HPV, foi observada a infecção concomitante por múltiplos tipos desse vírus, dificultando a identificação de qual tipo está especificamente contribuindo para o desenvolvimento da lesão (SASAGAWA et al., 2001).

3.2 HPV, Câncer Cervical e suas Lesões Precursoras

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, com aproximadamente 500 mil novos casos anuais no mundo. É responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos. No Brasil, foi detectado em 2010 um número de 18.430 casos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. No estado de Pernambuco, ocorreram 1020 casos neste mesmo ano (BRASIL, 2010).

É fato bem documentado que o vírus HPV é o principal fator etiológico da neoplasia de colo de útero e as primeiras observações que faziam associação entre lesões verrucosas cutâneas ou mucosas a um agente infeccioso tiveram início já na década de 20. Shope e Hurst (1933) identificaram Papilomavírus nas lesões verrucosas de coelhos e confirmaram a etiologia infecciosa dessas lesões (NAKAGAWA et al., 2010).

Segundo Nadal e Manzione (2006), a infecção pelo HPV apresenta dois picos de prevalência: um mais elevado após os primeiros anos de atividade sexual, entre os 18-28 anos de idade, e outro entre a quarta e quinta décadas de vida. A maioria delas é transitória, ou seja, não resulta em anormalidades epiteliais, com resolução espontânea em mais de 80% dos casos dentro de 1 a 2 anos, principalmente entre adolescentes e adultos jovens. Em alguns casos, entretanto, a infecção persistente pode ser o início do

desenvolvimento de lesões no colo uterino, um pré-requisito para a transformação maligna (NAKAGAWA et al., 2010; STANLEY, 2001).

As lesões precursoras do câncer cervical são lesões proliferativas em que as células se desenvolvem de forma anormal, com atipias de graus variáveis substituindo parte ou toda a espessura do epitélio escamoso cervical. Essas lesões tiveram sua nomenclatura discutida e modificada ao longo dos anos. Desde 1988, as lesões histológicas podem ser classificadas, de acordo com as atipias das células epiteliais em: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau – *Low-Grade* SIL (LSIL), compreendendo efeito citopático pelo HPV e Neoplasia Intraepitelial Cervical grau I (NIC I); Lesão intraepitelial de alto grau – *high-grade* SIL (HSIL), compreendendo Neoplasias Intraepiteliais Cervicais graus II (NIC II) e III (NIC III) (PEGHINI, 2009) (Figura 6).

A NIC I apresenta células com diferenciação alterada no terço inferior do epitélio. A NIC II é diagnosticada quando as células apresentam anormalidades nucleares e mitoses numerosas nos 2/3 inferiores do estrato epitelial, enquanto na NIC III, as células indiferenciadas comprometem mais de 2/3 ou toda a espessura do epitélio (DE PALO, 1996).

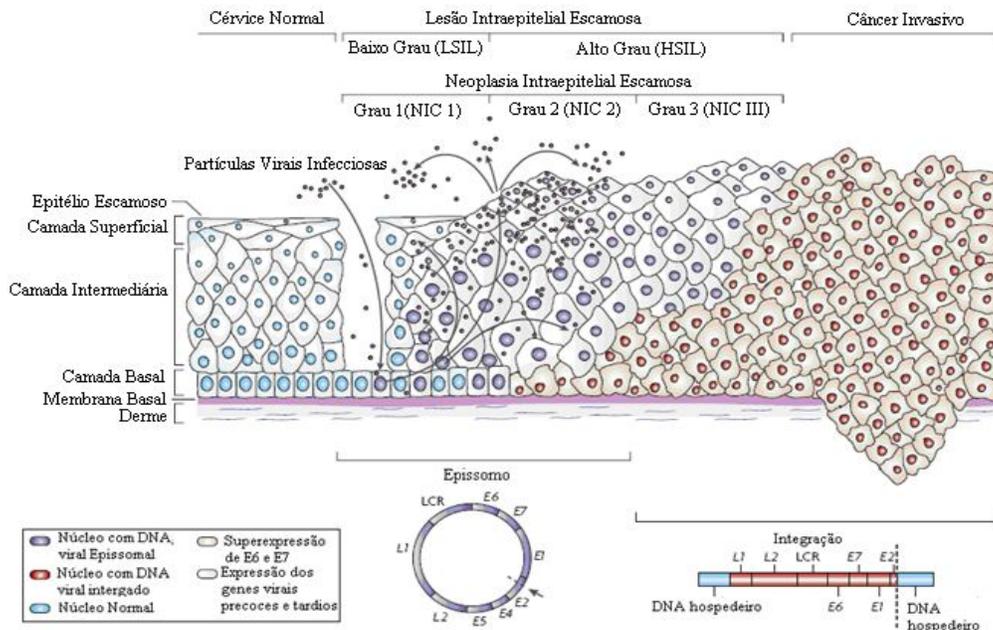


Figura 7. Através de microlesões no epitélio cervical, os HPV atingem as células basais. O vírus se replica como DNA episossomal (núcleos roxos), com expressão das proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Nas camadas imediatamente superiores, o genoma é replicado e os genes L1 e L2 são expressos, promovendo a encapsidação dos genomas e novas infecções. Lesões não tratadas podem evoluir ao câncer invasivo, com integração do DNA ao genoma do hospedeiro (núcleo vermelho), com a perda ou rompimento de E2 e superexpressão de E6 e E7 (WOODMAN et al., 2007).

As alterações histológicas cervicais ocorrem, em 90% dos casos, na Junção Escamo-Colunar (JEC), uma zona de transformação localizada entre o epitélio epidérmico (escamoso) que reveste, em condições normais, a área do colo visível no fundo da vagina e o epitélio glandular, que reveste o canal cervical (SILVEIRA; PESSINI, 1994).

Estudos demonstram que o aparecimento de câncer cervical pode se dar depois de 10 a 15 anos de uma infecção por HPV não tratada. Até a década de 60, acreditava-se que existia uma progressão contínua da LSIL, desde a lesão de baixo grau até o carcinoma invasor. Todavia, estudos longitudinais tratam da detecção de NIC III sem a prévia existência de NIC I ou II, concluindo que lesões cervicais de baixo e alto graus são processos distintos de infecção por HPV (AIDE et al., 2010; SCOTT et al., 2006).

A LSIL parece ser uma manifestação transitória da infecção por HPV, em que o epitélio apresenta pequenas anormalidades celulares, mas as células conseguem se diferenciar e maturar. Enquanto a HSIL ocorre quando a infecção pelo HPV impede a diferenciação das células, havendo replicação contínua e acúmulo de anormalidades genéticas que levam ao aparecimento de células cancerosas (SCOTT et al., 2006).

3.2.1 Cofatores para o desenvolvimento de câncer cervical

Embora várias mulheres estejam infectadas com tipos de HPV de alto risco, apenas uma parcela delas desenvolve o câncer cervical, sugerindo que outros fatores contribuem com o desenvolvimento da doença, sendo ela, portanto uma doença multifatorial (FARZANEH et al., 2006).

De acordo com Munoz (2006), existem três grupos de cofatores que contribuem potencialmente para o desenvolvimento do câncer cervical, além da presença do HPV: 1. cofatores exógenos ou ambientais, tais como fumo, dieta, uso de contraceptivos orais, múltiplos parceiros sexuais; 2. cofatores virais, como coinfeção por outros tipos de HPV ou variantes, carga viral, integração viral; 3. cofatores do hospedeiro, incluindo hormônios endógenos e o próprio sistema imune do indivíduo. Esse último é objeto de estudo de trabalhos que fazem associação entre a resposta imune do hospedeiro e a persistência da infecção pelo HPV (FARZANEH et al., 2006; GANGWAR et al., 2009).

3.3 Resposta Imune ao HPV

Os HPV, como qualquer outro tipo de vírus, são microrganismos intracelulares obrigatórios que usam os ácidos nucléicos e a maquinaria de síntese de proteínas do organismo infectado para se manter (ABBAS et al., 2008).

A resposta imune do hospedeiro é citada como um dos principais fatores que influenciam a história natural da infecção pelo HPV (LEE et al., 2004). Quando o sistema imune falha em eliminar ou controlar a infecção, ela persiste com altos níveis de replicação do DNA viral. Os indivíduos com infecção persistente têm uma probabilidade maior de progressão da lesão para HSIL e carcinoma invasivo (VON LINSINGEN, 2008).

O sistema imune do trato genital inferior é composto pela imunidade inata (natural) e pela adaptativa (adquirida), as quais apresentam aspectos diferentes quanto ao sistema de reconhecimento, células envolvidas e mecanismo de ação. Participante dos dois tipos de imunidade, as citocinas são proteínas secretadas durante as fases de ativação e efectoras da imunidade inata e também da adquirida. São produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos, mediando e regulando reações imunes e inflamatórias. As citocinas também podem ser denominadas interleucinas, já que muitas são secretadas por leucócitos e agem sobre outros leucócitos. Possuem vida média curta e iniciam suas ações através da sua ligação a receptores de membrana na célula-alvo (ABBAS et al., 2008).

A atividade das citocinas foi primeiramente reconhecida nos anos 60, quando foi observado que sobrenadantes derivados de cultura de linfócitos tinham fatores que regulavam a proliferação, diferenciação e maturação de células do sistema imune (VON LINSINGEN, 2008). Suas propriedades gerais são as seguintes: são moléculas pleiotrópicas, pois agem em diversos tipos celulares, possuem efeitos redundantes (várias citocinas podem atuar da mesma forma) e podem influenciar a ação e síntese de outras citocinas de forma sinérgica ou antagônica atuando geralmente em um sistema de indução em cascata. (ABBAS et al., 2008; HAUSER et al., 1985; VON LINSINGEN, 2008).

As citocinas podem apresentar efeitos estimulantes (pró-inflamatório) ou inibidores (antiinflamatório) dependendo do tipo de linfócito T ativado. Suas ações individuais na imunidade são complexas, uma vez que elas agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estádios de ativação (ABBAS et al., 2008).

A imunidade inata e a adquirida trabalham juntas para combater a infecção pelo HPV. A inata, apesar de não específica, representa a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos e envolve barreiras epiteliais, células efetoras circulantes (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK), proteínas (defensinas, óxido nítrico, componentes do complemento e citocinas). Especificamente contra infecções virais, a imunidade natural tenta inibir a infecção através de citocinas do tipo Interferon e Fator de Necrose Tumoral, além da morte dos queratinócitos infectados mediadas pelas células NK (ABBAS et al., 2008).

A resposta adquirida é específica frente a determinado patógeno (bactérias, vírus e fungos), processo esse que inclui ativação de linfócitos, citotoxicidade, síntese de anticorpos e produção de citocinas (WIRA et al., 2005). Nesse tipo de imunidade, a secreção de anticorpos bloqueia a ligação do vírus e a entrada nas células do hospedeiro. Os linfócitos T indiferenciados reconhecem os antígenos do vírus que estão expostos na superfície das células dendríticas e as células TCD8⁺ eliminam a infecção pela destruição das células infectadas, na presença de células TCD4⁺, ou Th (ABBAS et al., 2008).

A ativação do linfócito TCD4⁺ resulta na secreção de uma variedade de citocinas que, durante a resposta imune, celular e humoral, são responsáveis pela regressão, persistência ou progressão de lesões associadas ao HPV (GONCALVES; DONADI, 2004). O estudo desses polipeptídeos de forma qualitativa ou quantitativa muitas vezes é utilizado para caracterizar a resposta imune durante a infecção pelo HPV (CHEN et al., 2009), pois a secreção e o padrão de expressão das diferentes citocinas definem quatro tipos diferentes de resposta, de acordo com a diferenciação celular: Th1, Th2, Th3 (iTreg) e Th17, sendo os dois primeiros subconjuntos os mais bem definidos (PEGHINI, 2009; VON LINSINGEN, 2008; ZHU; PAUL, 2008) (Figura 8).

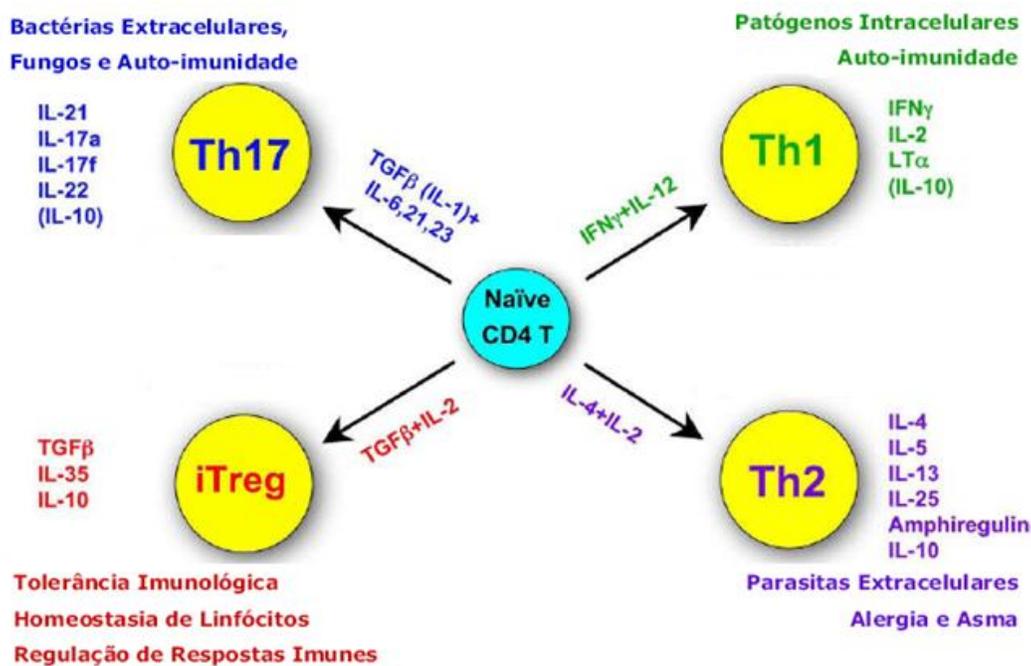


Figura 8. Perfis de resposta imune derivados da diferenciação de células T CD4+ *naíve*, com as respectivas citocinas que induzem a diferenciação, as citocinas produzidas características de cada perfil e os fatores de transcrição críticos para a determinação do perfil imunológico (ZHU; PAUL, 2008).

As células Treg constituem 5-10% do total populacional de células T CD4+ em camundongos e em seres humanos e estão principalmente envolvidas na repressão de doenças auto-imunes, além de inibir a proliferação e produção de células Th1 e de células T CD8+. São estimulados pelos TGFβ e IL-2 e capazes de produzir IL-10, TGFβ e IL-35 (PEGHINI, 2009).

Os linfócitos Th17, identificados inicialmente em camundongos, assim chamados por secretarem principalmente a IL-17 (IL-17a e IL-17f), mediam respostas imunes contra bactérias e fungos extracelulares. Participam da indução de doenças auto-imunes, reações inflamatórias ricas em neutrófilos, podendo ser importantes mediadores de dano tecidual em doenças inflamatórias imunomediadas. A diferenciação de células T CD4+ *naíves* em Th17 ocorre por estímulo do antígeno na presença de TGF-β juntamente com IL-1, IL-6, IL-21 e IL-23 (PEGHINI, 2009).

Quando ativadas por células apresentadoras de antígeno, as células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ que promovem a imunidade celular e são necessárias para efetuar respostas inflamatórias mediadas por fagócitos contra microorganismos intracelulares (entre eles os vírus) e contra células tumorais. Já as

células Th2 produzem várias citocinas, sendo as IL-4 e IL-5 as principais, e favorecem a resposta humoral anti-inflamatória contra patógenos extracelulares, incluindo helmintos, e respostas alérgicas (BENDTZEN et al., 1995; GONCALVES; DONADI, 2004).

Em mulheres infectadas por HPV de alto risco, Lee et al. (2004) evidenciaram uma diminuição na produção de citocinas secretadas pelas células Th1, Além disso, Clerice et al. (1997) afirmam que a mudança do perfil Th1 para o Th2 está relacionado com o pior prognóstico para pacientes com infecção pelo HPV, sendo o primeiro perfil, portanto, o principal responsável pelo combate e a eliminação do vírus.

Em lesões epiteliais provocadas pela infecção pelo HPV, o exame histológico mostra diferentes populações celulares. Nas verrugas genitais em regressão observa-se um infiltrado de LT CD4+, LT CD8+, macrófagos e células NK no estroma e epitélio, enquanto que em lesões persistentes há ausência de células imunológicas no sítio da infecção, poucos LT CD8+ intraepiteliais e células mononucleares no estroma (PEGHINI, 2009; STANLEY, 2001).

O período entre a infecção e o aparecimento das lesões é altamente variável, de semanas a meses, sugerindo que o vírus pode desenvolver mecanismos efetivos de evasão do sistema imune (VON LINSINGEN, 2008). Felizmente, na maioria dos casos uma resposta imune eficiente é estabelecida. Porém existem vários mecanismos usados pelo HPV para conseguir escapar do sistema imune do hospedeiro (KANODIA et al., 2007).

Na verdade, o próprio ciclo de infecção pelo HPV é, por si só, um mecanismo de escape, já que desenvolve um ciclo não-lítico na maioria dos casos. Assim sendo, há pouca ou nenhuma liberação de citocinas pró-inflamatórias importantes para a ativação das células dendríticas e os sinais essenciais para a resposta imune no epitélio escamoso estão ausentes. Além disso, a proteína E é expressa em baixos níveis, fazendo com que o vírus fique invisível ao sistema imune (KANODIA et al., 2007; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004).

Outra forma de evasão do sistema imune é através das oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 que atuam nas vias de sinalização do interferon, inibindo-as (BARNARD; MCMILLAN, 1999; RONCO et al., 1998). Foi demonstrado também que E7 tem grande similaridade com algumas proteínas próprias humanas, propiciando ao HPV evadir-se eficientemente da resposta imune humana (VON LINSINGEN, 2008).

3.3.1 Interleucina 12 (IL-12)

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória heterodimérica constituída por duas unidades ligadas por ponte dissulfeto: uma cadeia leve de 35 quilodaltons (kD), conhecida como p35 ou IL-12A e localizada no cromossomo 3p12-q13.2; e uma cadeia pesada de 40 kD, conhecida como p40 ou IL-12B localizada no cromossomo 5q31-33 (CHEN, 2009). Várias células parecem sintetizar a subunidade p35, mas apenas células fagocíticas e células dendríticas produzem a subunidade p40 (ABBAS et al., 2008). O receptor de IL-12 é composto por duas cadeias, a IL-12R β 1 e a IL-12R β 2, as quais são expressas principalmente por células T ativadas e células NK, explicando a habilidade com que estas células respondem ao estímulo da IL-12 (TRINCHIERI, 2003) (Figura 9).

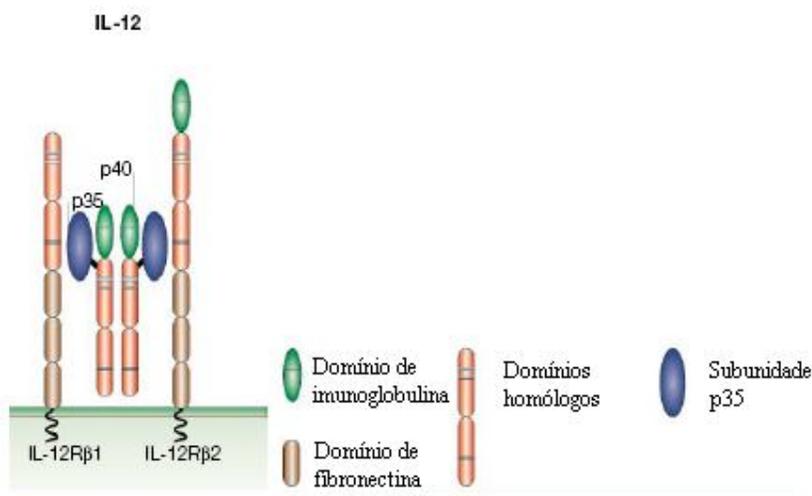


Figura 9. Estrutura morfológica da IL-12 e de seu receptor (TRINCHIERI, 2003).

A indução para a célula produzir esta citocina é feita por estímulos microbianos, infecções por bactérias intracelulares, infecções por vírus e por indução de células T auxiliares já estimuladas por estes antígenos (ABBAS et al., 2008; PEGHINI, 2009). Além disso, citocinas como IL-4 e INF- γ aumentam a habilidade de as células produzirem IL-12 (TRINCHIERI, 2003).

Várias são as funções biológicas desenvolvidas pela IL-12 frente aos microrganismos (Figura 7). Produto de células inflamatórias, esta interleucina é uma importante citocina envolvida na iniciação de uma sequência de respostas celulares que resultam na eliminação de organismos intracelulares, sendo a principal citocina

mediadora da resposta imune inata a esses tipos de patógenos, incluindo o HPV. Durante a imunidade natural, a IL-12, estimulada principalmente por macrófagos e células dendríticas, produz $\text{INF-}\gamma$ para ativação dos próprios macrófagos e destruição do patógeno. Além disso, IL-12 juntamente com $\text{INF-}\gamma$ estimula a diferenciação de linfócitos T CD4^+ auxiliares em células Th1, direcionando à imunidade celular, e acentuando as funções citotóxicas de células NK ativadas e linfócitos T citotóxicos (ABBAS et al., 2008).

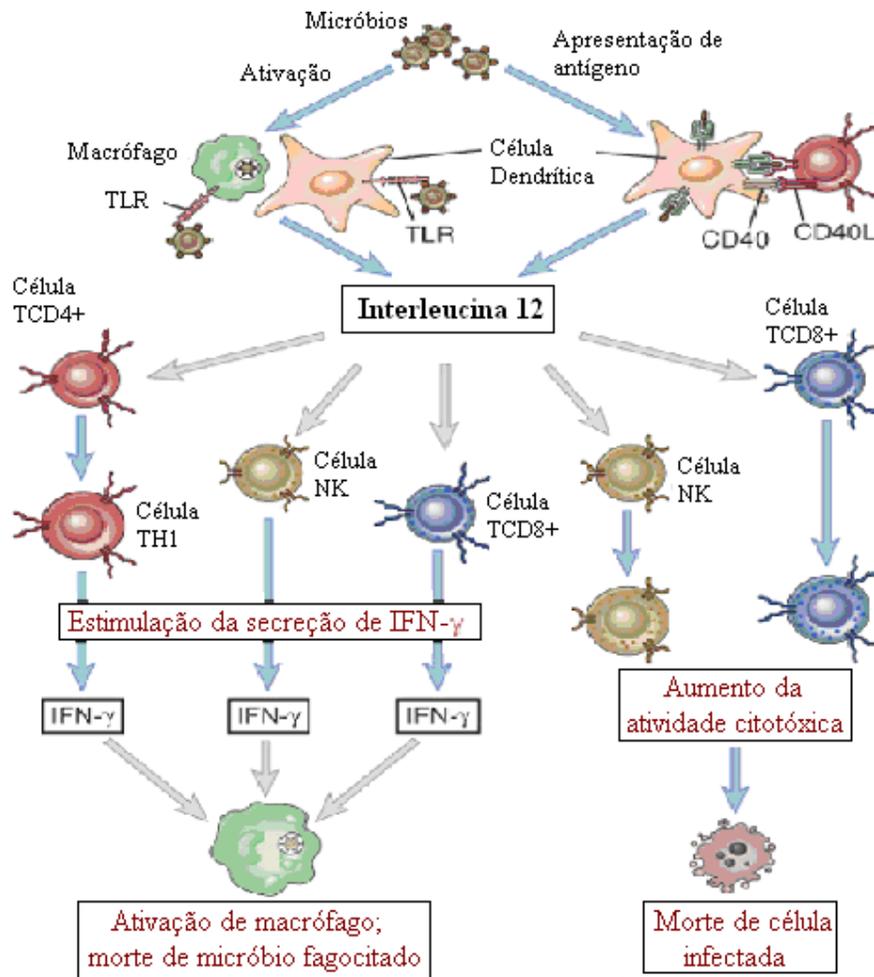


Figura 10. Ações biológicas da IL-12 (ABBAS et al., 2008)

Além de sua atividade antimicrobiana, a IL-12 é também importante no mecanismo de resistência a tumores. Vários estudos têm demonstrado que, durante o desenvolvimento de carcinogênese cervical, há troca no padrão de resposta celular de Th1 para Th2. A predominância de Th2 e diminuição de Th1 está demonstrado em

outros tipos de tumor, como tumores ovarianos e de pulmão, evidenciando que a diminuição de IL-12 está associada também ao desenvolvimento de câncer (HAN et al., 2008).

Em função da importância imunológica desempenhada por esta citocina, estudos moleculares têm sido feitos para investigar a associação de polimorfismos no gene IL-12 e o risco de desenvolvimento de câncer. Foram descritos três polimorfismos na subunidade p40 do gene da IL-12 (IL-12B): na região promotora, no íntron e na região não-traduzida 3'(3'UTR), sendo o polimorfismo funcional de um único nucleotídeo na região 3'UTR +1188 A/C sugerido como associado ao desenvolvimento de linfoma (CERHAN et al., 2007; LAN et al., 2006; PURDUE et al., 2007), carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite B (NIETERS et al., 2005), câncer de estômago (NAVAGLIA et al., 2005) e, associado a outros polimorfismos, ao desenvolvimento de câncer cervical (CHEN et al., 2009; HAN et al., 2008).

3.3.2 Interferon-gama (INF- γ)

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória e imunoreguladora reconhecidos há mais de 40 anos como agente que interfere na replicação viral. É classificado em dois tipos (tipo I e tipo II de acordo com a especificidade ao receptor e com a homologia na sequência de DNA) (SCHRODER et al., 2004). Os genes que codificam o INF tipo I estão localizados no cromossomo 9 e incluem os INF- α , INF- β , INF- ϵ , INF- κ e INF- ω (ABBAS et al., 2008).

O INF- γ é o único representante dos INFs tipo II. A estrutura do seu gene é altamente conservada e está localizado no cromossomo 12q24.1, em cópia única, com 5400 pb, quatro éxons e três introns (SCHREIBER; FARRAR, 1993). Seu receptor é composto por dois polipeptídeos associados de estrutura homóloga: o IFNGR1 e o IFNGR2 (SCHRODER et al., 2004).

A proteína humana INF- γ é constituída por 166 aminoácidos e é secretada pelas células TCD4+, TCD8+, Th0 e células NK ativadas. Apresenta habilidade em regular as funções de células do sistema imune inato e adquirido contra microrganismos intracelulares como os vírus (RINDERKNECHT et al., 1984). Durante a resposta imune natural, as células NK liberam INF- γ em resposta a ligantes na superfície de células infectadas ou em resposta à IL-12, a qual é requerida para otimização da produção *in*

vivo do interferon. Além disso, esta citocina é considerada a principal ativadora de macrófago, acentuando a função deste através da estimulação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio que vão destruir os microrganismos fagocitados (ORISS et al., 1997).

Já na imunidade adquirida, promove diferenciação de células TCD4+ para o subgrupo Th1 (ORISS et al., 1997) e suprime o crescimento de células Th2, o que é importante na defesa contra infecções virais e tumores, aumenta a expressão de moléculas MHC associadas ao processamento antigênico e estimula as células B a secretarem anticorpos que participam da eliminação de microrganismos mediada por macrófagos (ABBAS et al., 2008) (Figura 11).

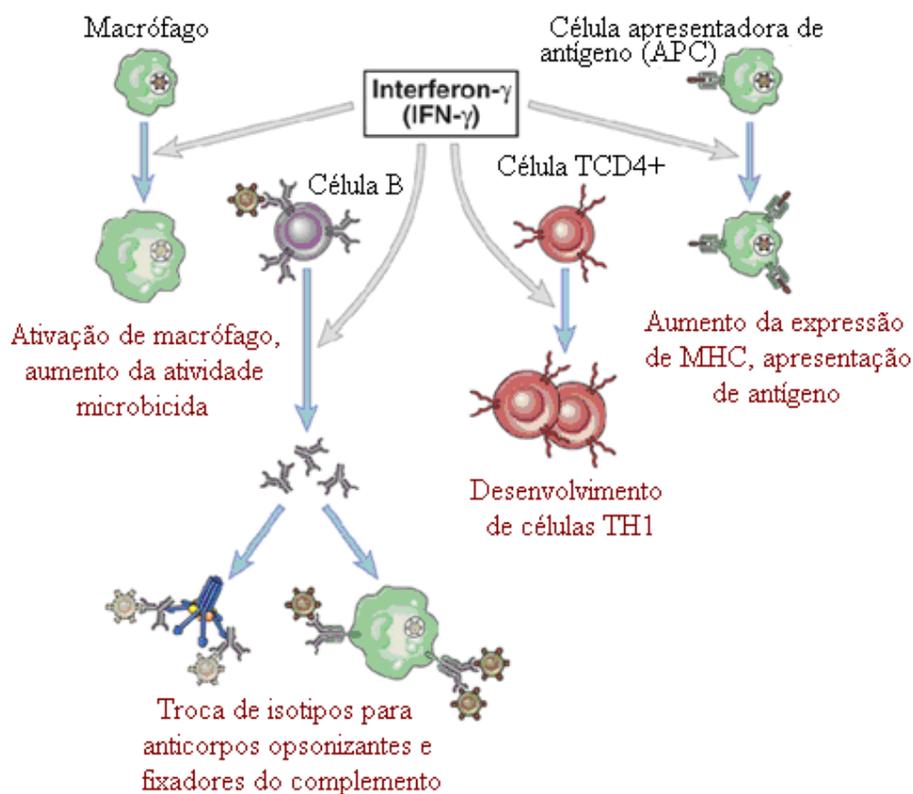


Figura 11. Ações biológicas do IFN- γ (ABBAS et al., 2008).

O polimorfismo localizado no primeiro intron do gene do IFN- γ (+874 T/A) (PRAVICA et al., 2000) tem sido descrito em associação ao desenvolvimento de uma série de doenças, dentre elas a tuberculose (VALLINOTO et al., 2010), doença de

Chagas (TORRES et al., 2010), leucemia linfocítica crônica (URBANOWICZ et al., 2010) e Hepatite B (YU et al., 2006).

Vários estudos têm sido feitos para avaliar a associação entre o polimorfismo no gene do interferon e a predisposição ao desenvolvimento de lesões cervicais causadas por HPV. Linsingen et al. (2009), em um estudo com pacientes brasileiras, sugeriram que o polimorfismo +874 no gene do interferon pode influenciar a progressão desse tipo de lesão em pacientes com HPV.

A importância da resposta imune frente ao desenvolvimento de lesão cervical ou ao prognóstico da doença, está ligada a uma rede de citocinas que são produzidas durante o curso da infecção por HPV. Por isso, conhecer os mecanismos moleculares que antecedem a produção destas citocinas e de outros mediadores inflamatórios representa um poderoso campo a ser explorado para investimentos em pesquisa de novas vacinas e tratamento medicamentoso.

3.4 Métodos de detecção de SNPs

Os SNPs representam a maior fonte de variações genéticas entre os indivíduos, podendo consistir em inserções, deleções ou substituições nucleotídicas. São muito abundantes, com uma frequência de cerca de 1%, existindo cerca de um milhão ou mais por indivíduo. Podem ser utilizadas para identificar as contribuições poligênicas em algumas doenças, podendo funcionar como marcadores genéticos para o diagnóstico e prognóstico e, possivelmente, para novos alvos terapêuticos (AITKEN et al., 2004; FRANCESCHI, 2009).

Estudos de genes de citocinas mostraram que diversos polimorfismos em regiões reguladoras destes genes podem ser responsáveis por alterações na produção dessas moléculas. A maioria dos polimorfismos acontece em um único nucleotídeo em regiões promotoras ou no próprio éxon, além de microssatélites em regiões intrônicas (TAYLOR et al., 2004).

Vários métodos baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram desenvolvidos e utilizados para detecção de SNPs. A PCR, a propósito, é uma metodologia que possibilita a produção de milhares de cópias de um determinado fragmento de DNA de interesse. Dois métodos de baixo custo e frequentemente utilizados para a detecção de polimorfismos, utilizando a técnica de PCR, são a

metodologia RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), e a técnica de SSP (*Sequence-Specific Primers*) (FRANCESCHI, 2009).

A RFLP é uma técnica em que os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. O polimorfismo de ponto em um fragmento de nucleotídeos acarreta na criação de sítios de reconhecimento para enzimas de restrição específicas. Assim, após clivagem (digestão) do DNA, serão gerados fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com a ação da enzima (OTTO, 1998).

Na PCR-SSP são utilizados primers totalmente complementares à sequência alvo que contém o alelo polimórfico. Dessa forma, será amplificado apenas o fragmento com o qual o par de primer possui pareamento perfeito, e pares de iniciadores sem correspondência não se traduzem em amplificação (TERASAKII, 1980).

Essa técnica pode ser executada através da metodologia da PCR em Tempo Real, processo utilizado para quantificação e genotipagem de ácidos nucleicos. Na reação de amplificação pode ser utilizada a coloração com o Syber Green, substância fluorescente de baixo custo e fácil manuseio, que tem a emissão de luz aumentada em 20 vezes quando ligada ao DNA dupla fita, ou seja, durante o processo de amplificação, o aumento do material genético específico amplificado faz aumentar a fluorescência emitida que é lida e transformada em sinal gráfico. É formada, então, a curva de *melting*, em que as sequências podem ser caracterizadas através da sua temperatura de *melting* aparente (T_m), baseada no comprimento do produto e da composição de bases (SOUZA, 2006).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. *et al.* Imunologia celular e molecular. 6ª edição. ed. São Paulo: Elsevier, 2008. (Elsevier).

AIDE, S. *et al.* Epstein-Barr virus and human papillomavirus infection in vulvar lichen sclerosus. J Low Genit Tract Dis, v. 14, n. 4, p. 319-322, 2010.

AITKEN, N. *et al.* Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. Mol Ecol, v. 13, n. 6, p. 1423-1431, 2004.

ALENCAR, T. R. Análise da Variabilidade Genética, Filogenia e Expressão Gênica de HPV de alto risco no Distrito Federal. 2009. (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

BARNARD, P.MCMILLAN, N. A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. Virology, v. 259, n. 2, p. 305-313, 1999.

BENDTZEN, K. *et al.* Cytokines and autoantibodies to cytokines. Stem Cells, v. 13, n. 3, p. 206-222, 1995.

BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. Antivir Ther, v. 7, n. 4, p. 219-237, 2002.

BERNARD, H. U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao>. Acesso em: 25.01.2011.

BURK, R. D. Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. Hosp Pract (Minneapolis), v. 34, n. 12, p. 103-111; quiz 112, 1999.

CAMARA, G. N. *et al.* Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 98, n. 7, p. 879-883, 2003.

CARMO, E. F. S.FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavirus humano. Sabios-Revista de Saúde e Biologia, v. 2, p. 29-31, 2007.

CERHAN, J. R. *et al.* Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. Blood, v. 109, n. 12, p. 5439-5446, 2007.

CHEN, X. *et al.* Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. Clin Cancer Res, v. 15, n. 1, p. 400-405, 2009.

- CLERICI, M. *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. J Natl Cancer Inst, v. 89, n. 3, p. 245-250, 1997.
- CLIFFORD, G. M. *et al.* Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. Lancet, v. 366, n. 9490, p. 991-998, 2005.
- DAY, P. M. *et al.* Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. J Virol, v. 81, n. 16, p. 8784-8792, 2007.
- DE PALO, G. Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora, 1996.
- DE SANJOSE, S. *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis, v. 7, n. 7, p. 453-459, 2007.
- DE VILLIERS, E. M. *et al.* Classification of papillomaviruses. Virology, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.
- DISBROW, G. L.; HANOVER, J. A.; SCHLEGEL, R. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. J Virol, v. 79, n. 9, p. 5839-5846, 2005.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. J Clin Virol, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, 2005.
- DUFFY, C. L.; PHILLIPS, S. L.; KLINGELHUTZ, A. J. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. Virology, v. 314, n. 1, p. 196-205, 2003.
- ESMAEILI, M. *et al.* HPV typing in women with cervical precancerous and cancerous lesions in northwestern Iran. Gynecol Obstet Invest, v. 66, n. 1, p. 68-72, 2008.
- FARZANEH, F. *et al.* The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. BJOG, v. 113, n. 8, p. 961-964, 2006.
- FRANCESCHI. Optimization of the PCR-SSP methodology in the identification of TNF and IL2 genetic polymorphisms. Rev. Bras de Hemat e Hemoter, n. 31(4):241-246, 2009.
- 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. J Virol Methods, v. 122, n. 1, p. 87-93, 2004.
- GANGWAR, R.; PANDEY, S.; MITTAL, R. D. Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population. BJOG, v. 116, n. 12, p. 1671-1677, 2009.

GARCIA-ESPINOSA, B. *et al.* Genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. Diagn Pathol, v. 4, p. 31, 2009.

GARLAND, S. M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. Pathology, v. 34, n. 3, p. 213-224, 2002.

GENTHER, S. M. *et al.* Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. J Virol, v. 77, n. 5, p. 2832-2842, 2003.

GONCALVES, M. A. DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: current concepts. Braz J Infect Dis, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2004.

GOVAN, V. A. *et al.* Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. J Carcinog, v. 2, n. 1, p. 3, 2003.

GROSS, G. E. BARRASSO, R. Infecção por papilomavirus humano: Atlas clínico de HPV. ARTMED, p.432, 1999.

HAN, S. S. *et al.* Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v. 140, n. 1, p. 71-75, 2008.

HAUSER, B. *et al.* HPV-16-related Bowenoid papulosis. Lancet, v. 2, n. 8446, p. 106, 1985.

KABSCH, K. ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. J Virol, v. 76, n. 23, p. 12162-12172, 2002.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr Cancer Drug Targets, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.

KIM, H. J.; SONG, E. S.; HWANG, T. S. Higher incidence of p53 mutation in cervical carcinomas with intermediate-risk HPV infection. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v. 98, n. 2, p. 213-218, 2001.

KUPPER, T. S. FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nat Rev Immunol, v. 4, n. 3, p. 211-222, 2004.

LAN, Q. *et al.* Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. Blood, v. 107, n. 10, p. 4101-4108, 2006.

LEE, B. N. *et al.* Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. Clin Diagn Lab Immunol, v. 11, n. 2, p. 239-244, 2004.

- LORENZATO, F. *et al.* The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). Int J Gynecol Cancer, v. 10, n. 2, p. 143-150, 2000.
- MARSH, M. HELENIUS, A. Virus entry: open sesame. Cell, v. 124, n. 4, p. 729-740, 2006.
- MCMURRAY, H. R. *et al.* Biology of human papillomaviruses. Int J Exp Pathol, v. 82, n. 1, p. 15-33, 2001.
- MUNOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.
- MUNOZ, N. *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, 2006.
- NADAL, S. R. MANZIONE, C. R. Vacinas contra o papilomavirus humano. Revista Brasileira de Coloproctologia, v. 26, p. 337-340, 2006.
- NAKAGAWA, J. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. [Human Papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer]. Rev Bras Enferm, v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.
- NAVAGLIA, F. *et al.* Interleukin 12 gene polymorphisms enhance gastric cancer risk in H pylori infected individuals. J Med Genet, v. 42, n. 6, p. 503-510, 2005.
- NIETERS, A. *et al.* Effect of cytokine genotypes on the hepatitis B virus-hepatocellular carcinoma association. Cancer, v. 103, n. 4, p. 740-748, 2005.
- OLIVEIRA, L. H.; ROSA, M. L.; CAVALCANTI, S. M. Patterns of genotype distribution in multiple human papillomavirus infections. Clin Microbiol Infect, v. 14, n. 1, p. 60-65, 2008.
- ORISS, T. B. *et al.* Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. J Immunol, v. 158, n. 8, p. 3666-3672, 1997.
- OTTO, P. G. Genética humana e clínica.: Rocca, 1998.
- PATTERSON, N. A.; SMITH, J. L.; OZBUN, M. A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. J Virol, v. 79, n. 11, p. 6838-6847, 2005.
- PEGHINI, B. C. Perfil da resposta imune local em pacientes com lesão intraepitelial cervical de baixo grau, alto grau e neoplasia invasiva. 2009. (Doutorado) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2009.
- PEREIRA, C. R. *et al.* Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. Int J Gynecol Cancer, v. 17, n. 3, p. 651-660, 2007.

PRAVICA, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Hum Immunol, v. 61, n. 9, p. 863-866, 2000.

PURDUE, M. P. *et al.* Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: findings from the New South Wales non-Hodgkin Lymphoma Study. Carcinogenesis, v. 28, n. 3, p. 704-712, 2007.

QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T.; ZAIA, J. E. O papilomavírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas - MG. Revista Brasileira Análises Clínicas, n. 39(2): 151-157., 2007.

RINDERKNECHT, E.; O'CONNOR, B. H.; RODRIGUEZ, H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. J Biol Chem, v. 259, n. 11, p. 6790-6797, 1984.

RONCO, L. V. *et al.* Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. Genes Dev, v. 12, n. 13, p. 2061-2072, 1998.

SANCLEMENTE, G.GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. J Eur Acad Dermatol Venereol, v. 16, n. 3, p. 231-240, 2002.

SASAGAWA, T. *et al.* High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2001.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. Int J Gynecol Cancer, v. 15, n. 5, p. 727-746, 2005.

SCHREIBER, R. D.FARRAR, M. A. The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. Gastroenterol Jpn, v. 28 Suppl 4, p. 88-94; discussion 95-86, 1993.

SCHRODER, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

SCOTT, M. E. *et al.* Covariates of cervical cytokine mRNA expression by real-time PCR in adolescents and young women: effects of Chlamydia trachomatis infection, hormonal contraception, and smoking. J Clin Immunol, v. 26, n. 3, p. 222-232, 2006.

SHOPE, R. E.HURST, E. W. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. J Exp Med, v. 58, n. 5, p. 607-624, 1933.

SILVEIRA, G. P. G.PESSINI, S. A. Câncer do colo uterino : lesões precursoras. In: HALBE, H. W. (Ed.). Tratado de ginecologia. São Paulo: Roca, 1994. p. 1800.

- SMITH, J. S. *et al.* Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. Int J Cancer, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.
- SONG, S. H. *et al.* Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). Gynecol Oncol, v. 108, n. 3, p. 543-548, 2008.
- SOUZA, P. R. E. Estudo de dois genes da imunidade inata (MBL-2 e o receptor CCR5) na transmissão materno-infantil do HIV-1. 2006. (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. J Reprod Immunol, v. 52, n. 1-2, p. 45-59, 2001.
- Eletron Micrografy Imagens. 1995. Disponível em: <
<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>>. Acesso em: 25.01.
- STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. Arch Pathol Lab Med, v. 127, n. 8, p. 935-939, 2003.
- STRAIGHT, S. W. *et al.* The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. J Virol, v. 67, n. 8, p. 4521-4532, 1993.
- SZOSTEK, S. *et al.* Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. Acta Biochim Pol, v. 53, n. 3, p. 603-607, 2006.
- TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M.; DONALDSON, P. T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. Periodontol 2000, v. 35, p. 158-182, 2004.
- TERASAKII, P. I. Histocompatibility Testing. UCLA Tissue Typing Laboratory, 1980.
- THOMISON, J., 3RD; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Hum Pathol, v. 39, n. 2, p. 154-166, 2008.
- TORRES, O. A. *et al.* Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. Infect Genet Evol, v. 10, n. 5, p. 682-685, 2010.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.
- TSAO, Y. P. *et al.* Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. J Virol, v. 70, n. 11, p. 7535-7539, 1996.

- URBANOWICZ, I. *et al.* IFN gamma gene polymorphism may contribute to the susceptibility to CLL. Pathol Oncol Res, v. 16, n. 2, p. 213-216, 2010.
- VALLINOTO, A. C. *et al.* IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. Hum Immunol, v. 71, n. 7, p. 692-696, 2010.
- VON LINSINGEN, R. Polimorfismos de genes de citocinas e do gene mica em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical. 2008. (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- VON LINSINGEN, R. *et al.* IFNG (+874 T/A) polymorphism and cervical intraepithelial neoplasia in Brazilian women. J Interferon Cytokine Res, v. 29, n. 5, p. 285-288, 2009.
- WILSON, R.; FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. J Virol, v. 79, n. 11, p. 6732-6740, 2005.
- WIRA, C. R. *et al.* Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev, v. 206, p. 306-335, 2005.
- WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.
- YOU, J. *et al.* Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. Cell, v. 117, n. 3, p. 349-360, 2004.
- YU, H. *et al.* Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. World J Gastroenterol, v. 12, n. 18, p. 2928-2931, 2006.
- 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.
- ZHU, J. PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood, v. 112, n. 5, p. 1557-1569, 2008.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta, v. 1288, n. 2, p. F55-78, 1996.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

O presente artigo será submetido à revista Molecular Biology Reports, cujo fator de impacto atualmente é 2,038.



Molecular Biology Reports

An International Journal on Molecular and Cellular Biology

Editor-in-Chief: Gary S. Stein; André J. van Wijnen

ISSN: 0301-4851 (print version)

ISSN: 1573-4978 (electronic version)

Journal no. 11033

**POLIMORFISMOS DE *INF- γ* E *IL-12B* EM MULHERES COM
NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS CAUSADAS
PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Viviane do Carmo Vasconcelos de Carvalho, Jamilly Lopes de Macêdo, Camilla
Albertina Dantas de Lima, Maria da Conceição Gomes de Lima, Sandra de Andrade
Heráclio, Melânia Amorim Maria de Mascena Diniz Maia, Ana Lúcia Figueiredo Porto,
Paulo Roberto Eleutério de Souza

Viviane C. V. Carvalho - Jamilly L. Macedo – Camilla A. D. Lima – Maria da C. G.
Lima – Maria M. D. Maia – Ana L. F. Porto - Paulo R. E. Souza
Departamento de Biologia, Laboratório Genoma, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 -
Recife/PE

Ana L. F. Porto
Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos -LABTECBIO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 -
Recife/PE

Sandra A. Heráclito - Melânia Amorim
Instituto Materno Infantil de Pernambuco, Rua dos Coelhos, 300 - Boa Vista – CEP:
50070-550 - Recife, PE

Viviane C. V. Carvalho
e-mail: vivicarvalho@gmail.com

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um microrganismo sexualmente transmissível que pode causar Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) e câncer cervical, a segunda maior causa de malignidade em mulheres no mundo. A presença do vírus, no entanto, não é suficiente para causar lesões no colo uterino. Vários estudos sugerem que alguns sítios polimórficos modificam os níveis de citocinas e podem influenciar o desenvolvimento de câncer em pacientes infectadas por HPV. No presente estudo, avaliou-se a presença dos polimorfismos funcionais nas posições +874 (T/A) do gene *INF- γ* e +1188 (A/C) do gene *IL-12B* em amostras de secreção cervical de 76 mulheres saudáveis e 162 mulheres, HPV positivas, com lesão cervical, NIC I (45), NIC II (55), NIC III (53) e câncer cervical (9), em uma população brasileira. Quando analisado o polimorfismo no gene *INF- γ* , não foi observada diferença significativa nas distribuições genotípicas ($p = 0,4192$) nem alélicas ($p = 0,370$) entre os dois grupos. Por outro lado, para o gene *IL-12B*, houve diferença significativa nas distribuições genotípicas e alélicas entre os grupos analisados ($p = 0,01113$ e $p = 0,0196$, respectivamente). Quando as amostras foram estratificadas de acordo com grau de lesão cervical, o genótipo AA e o alelo A estavam mais frequentes no grupo com lesão cervical de alto grau do que no grupo com lesão cervical de baixo grau ($p = 0,0036$ e $p = 0,0010$, respectivamente), sugerindo que o alelo mutante C é um indicador da proteção contra o surgimento de lesões intraepiteliais e sua progressão.

Palavras-chave: HPV, NIC, polimorfismo, *INF- γ* , *IL-12B*.

INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus pertencente à família *papillomaviridae* o qual infecta células basais nos epitélios cutâneos e mucoso, formando lesões conhecidas como papilomas [1-3].

São conhecidos mais de 120 tipos de HPV de acordo com a sequência do DNA viral [4], sendo 15 deles considerados oncogênicos ou de alto risco, por estarem associados a Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) de alto grau e câncer cervical [5-6]. Em 90% dos casos, o câncer cervical evolui a partir de uma NIC pré-existente [7] e está associado à presença de HPV de alto risco em 99% dos casos [8]. No Brasil, em 2008, ocorreram 4.182 óbitos por câncer cervical e em 2010, ocorreram 18.430 novos casos da doença [7].

Além da presença do HPV, outros fatores contribuem com o desenvolvimento do câncer cervical, tais como fumo, dieta, uso de contraceptivos orais, múltiplos parceiros sexuais e o próprio sistema imune do indivíduo [9]. Há evidências de que a resposta imune mediada por células seja a principal forma de combate ao HPV. Algumas citocinas agem na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células do tipo Th1, o que direciona o sistema imune à ativação da resposta mediada por células. A Interleucina-12 (IL-12) e o Interferon-gama (INF- γ) são duas citocinas envolvidas nesse processo e ainda acentuam as funções citotóxicas de células NK ativadas e linfócitos T citotóxicos [10-11].

A IL-12 é um heterodímero composto de dois componentes distintos, a p35 (IL-12A) e p40 (IL-12B) que, juntos, constituem a forma biologicamente ativa, a p70. É a principal citocina mediadora da resposta imune Th1, estimulando para isso a produção de IFN- γ pelas células T e células *Natural Killer* (NK). Atua ainda ligando a resposta imune inata à adaptativa, além de ter atividade antitumoral [10-11].

O INF- γ é uma proteína ácido-lábil secretada por células TCD4⁺, TCD8⁺, Th0 e células NK com propriedades imunorregulatórias, antitumorais e antivirais. Altos níveis de INF- γ estão associados com a proteção de hospedeiros contra infecções virais, tais como o HPV [12].

O polimorfismo de uma única base (SNP) na região 3'UTR +1188 A/C do gene IL-12B tem sido relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças como linfoma [13-15], carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite B [16], câncer de estômago [17], e câncer cervical [18,10].

Pravica [19] demonstrou que existe um SNP na posição +874 (T/A) no primeiro intron do gene *INF- γ* , o qual tem sido descrito em associação a uma diversidade de doenças, dentre elas, a tuberculose [20], doença de Chagas [21]; leucemia linfocítica crônica [22], hepatite B [23] e lesões causadas por HPV [9].

O presente estudo visou avaliar se existe correlação entre os polimorfismos existentes nas regiões +874 (T/A) do gene *INF- γ* e na região 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL-12B* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de NICs causadas pelo HPV de alto risco oncogênico e a progressão para o câncer cervical em amostras de DNA de secreção vaginal de mulheres atendidas no Laboratório Central (LACEN) e Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP- Pernambuco).

MATERIAIS E MÉTODOS

População de Estudo

As amostras de DNA foram selecionadas a partir do banco de amostras clínicas de DNA de raspado da região cervical de mulheres com diagnóstico de NIC e câncer cervical, confirmado por biópsia, atendidas no LACEN do Estado de Pernambuco e no IMIP, no período de janeiro de 2008 a abril de 2010. As pacientes tinham de 16 a 75 anos de idade, sendo que a maioria (64,8%) estava entre 20 e 36 anos. O critério de exclusão foi pacientes em tratamento com radioterapia ou quimioterapia para neoplasia invasiva cervical e aquelas que se recusaram a fazer parte do estudo.

Todas as amostras foram previamente avaliadas quanto à presença de HPV de alto risco (HPV 16 e/ou 18) no Laboratório Genoma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram selecionadas 162 amostras (N = 45, NIC I - baixo grau; N = 55, NIC II - alto grau; N = 53, NIC III – alto grau; N = 9, câncer cervical) de mulheres HPV positivas e 76 amostras de mulheres sem anormalidades citológicas, HPV negativas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE e faz parte de um projeto maior (ANEXO 1).

Genotipagem da região +874 (T/A) do gene *INF- γ*

A reação de amplificação da região +874 (T/A) do gene *INF- γ* ocorreu através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase alelo específica (*Polymerase Chain*

Reaction – Sequence-Specific Primers – PCR-SSP) [24] usando o equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), localizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas – Fiocruz-PE. Nessa técnica são realizadas duas reações de amplificação, cada uma contendo um par de primer capaz de identificar o alelo específico [25]. Esta reação foi realizada num volume final de 10µl contendo aproximadamente 200ng de DNA de cada amostra, 1X Syber Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 0,5 mM de cada par de primer (genérico 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'; primer T-específico 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' e primer A-específico 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3') [19] e H₂O milli-Q q.s.p. As condições da amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 1 min, seguida de 15 ciclos de 95°C por 15 s, 62°C por 50 s, 72°C por 40 s e 25 ciclos de 95°C por 20 s, 56°C por 50 s e 72°C por 50 s.

Após amplificação, os resultados foram analisados através da curva de *melting* gerada, em que as sequências podem ser caracterizadas através da sua temperatura de *melting* aparente (T_m) que é função do comprimento do produto e da composição de bases [26]. A curva de *melting* foi gerada pelo 7500 Software v2.0.3 (Applied Biosystems). Para confirmação do produto obtido, 10% dos amplicons corados com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia) foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1,5%.

Genotipagem da região 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL12B*

A amplificação do gene *IL12B* foi realizada através da metodologia da PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction*), através da qual o polimorfismo pode ser visualizado em gel de agarose após corte por enzima de restrição do DNA fita dupla amplificado [26]. A reação foi realizada em um volume final de 25µL utilizando aproximadamente 200ng de DNA, 1x SYBR[®]GREEN Master Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2,5mM de cada primer (senso 5'-GATATCTTTGCTGTATTTGTATAGTT-3' e anti-senso 5'-AATATTTAAATAGCATGAAGGC-3') [18] e água milli-Q q.s.p.. As amostras foram submetidas às seguinte condições de ciclagem: aquecimento inicial de 95°C por 5min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 45s, 53°C por 45s e 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os amplicons foram corados com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e

visualizados em luz UV. Em seguida os fragmentos foram digeridos com a enzima *TaqI* (Fermentas Life Sciences), conforme orientações do fabricante e visualizado em gel de agarose 3%.

Análise estatística

A análise dos dados foi feita através do programa BioEstat 5.0. O estudo foi composto por amostras independentes constando de dados nominais (genótipo). A influência de cada polimorfismo sobre o risco para o desenvolvimento de NICs foi estimada pelo teste de Odds Ratio (OR) utilizando um intervalo de confiança de 95% para os parâmetros. A verificação das frequências dos alelos foi realizada através do método de contagem gênica. As frequências genotípicas foram realizadas através do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e foi determinada a existência de aderência entre os valores observados e aqueles esperados, com base na determinação de frequência gênica. A prevalência dos diferentes genótipos nos pacientes foi analisada pelo teste do χ^2 em tabelas de contingência.

RESULTADOS

Relação entre o polimorfismo da região +874 (T/A) do gene *INF- γ* e a susceptibilidade a lesão e/ou desenvolvimento de câncer cervical.

A figura 1 representa os três genótipos possíveis (TT, TA e AA) para o polimorfismo existente na região +874 (T/A) do gene *INF- γ* obtidos a partir da técnica de PCR em tempo real. Cada alelo foi caracterizado através da sua temperatura de *melting* aparente (T_m). Determinou-se assim, uma temperatura de $76,0^\circ \pm 0,3^\circ\text{C}$ para o alelo selvagem (T) e $76,8^\circ \pm 0,3^\circ\text{C}$ para o mutante (A). Para cada reação foram utilizadas amostras-controle negativas (sem DNA).

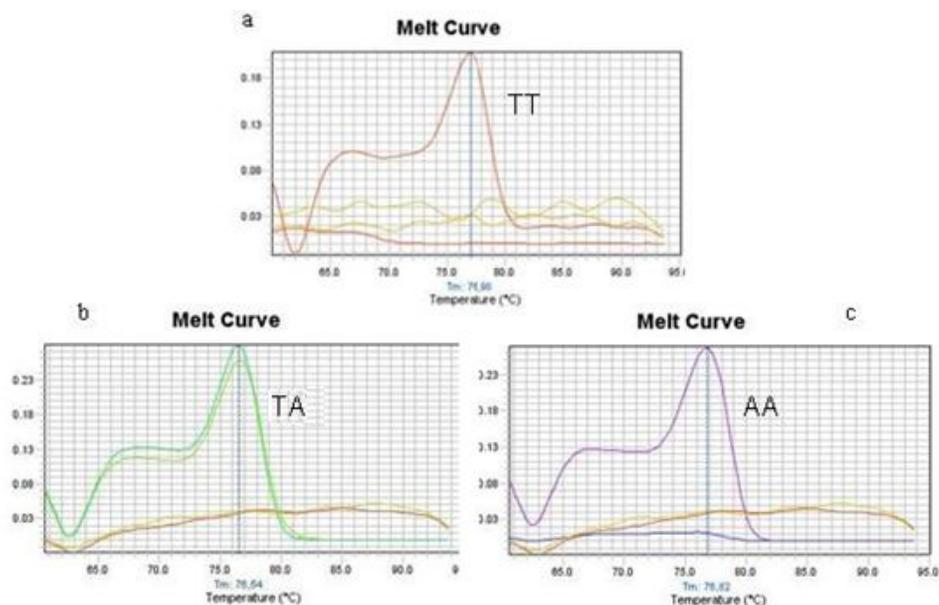


Figura 1. Curva de *melting* gerada na genotipagem das amostras para o *INF-γ*. Em a – homocigoto selvagem T/T (1 pico). Em b – heterocigoto T/A (2 picos). Em c – homocigoto mutante A/A (1 pico).

Os três genótipos possíveis foram confirmados através da separação eletroforética em que foram obtidos fragmentos de 264 pb (Figura 2). Nesta figura, a amostra 1 (poços 2 e 3), que amplificou apenas o alelo A, correspondeu ao genótipo AA. A amostra 2 (poços 4 e 5), que amplificou apenas o alelo T, correspondeu ao genótipo TT e a amostra 3 (poços 6 e 7) que amplificou ambos os alelos, correspondeu ao genótipo AT.

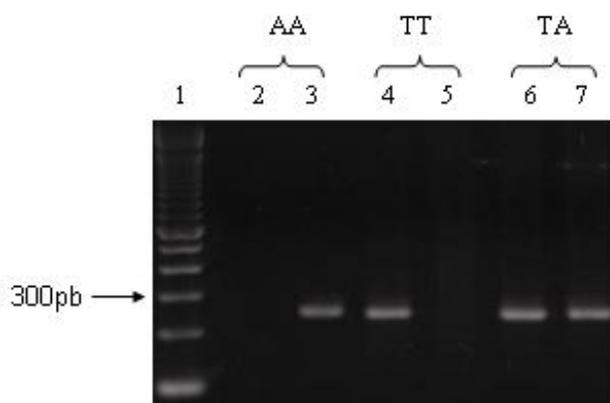


Figura 2. Detecção dos genótipos possíveis para o polimorfismo +874 T/A do gene *INF-γ*. Coluna 1: Ladder 100pb; colunas 2 e 3: amostra 1, apresentando amplificação apenas no alelo A (genótipo AA); colunas 4 e 5: amostra 2, apresentando amplificação apenas com o alelo T (genótipo TT); e colunas 6 e 7: amostra 3, apresentando amplificação com os dois alelos, (genótipo AT).

Baseado no pico de *melting* de cada alelo foi possível determinar os polimorfismos de todas as amostras nos dois grupos analisados, casos e controle, e determinar as distribuições alélicas e genóticas entre os diferentes grupos (Tabela 1). O valor de qui-quadrado ($\chi^2 = 2,764$) mostrou que a população em estudo encontrava-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quando analisada a susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical foram comparadas 162 amostras do grupo dos casos (NIC I + NIC II/III + Câncer) com 76 amostras controle (sem infecção). No grupo dos casos, 27 (16,6%) apresentaram o genótipo TT, 84 (51,9%) TA e 51 (31,5%) AA. No grupo controle, 13 (17,11%) apresentaram o genótipo TT, 46 (60,53%) TA e 17 (22,36%) AA não sendo observada diferença estatística tanto nas frequências genóticas ($p = 0,4192$) quanto nas frequências alélicas ($p = 0,37$). Porém, o genótipo mais frequentemente encontrado, em ambos os grupos foi o TA (média produção de INF- γ), seguido pelo AA (baixa produção de INF- γ) e por último o TT (alta produção de INF- γ). O alelo A foi o mais frequente nas duas populações.

Quando as amostras pertencentes ao grupo com lesão foram estratificadas de acordo com o grau da neoplasia intraepitelial cervical em NIC I, NIC II/NIC III e câncer cervical, verificou-se que das 45 amostras de NIC I, 8 (17,7%) apresentaram genótipo TT, 22 (48,9%) TA e 15 (33,4%) AA. E dos 108 casos de NIC II/III, 17 (15,7%) apresentaram genótipo TT, 59 (54,6%) TA e 32 (29,7%) AA, não sendo verificada diferença significativa entre esses dois grupos, tanto na distribuição genotípica ($p = 0,8099$) quanto na alélica ($p = 1,00$).

Finalmente, nos 9 casos de câncer, 2 (22,2%) apresentaram genótipo TT, 3 (33,3%) TA e 4 (44,5%) AA. Quando comparada a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer cervical através da análise das frequências genóticas entre o grupo controle e o grupo com câncer ($p = 0,2574$) não se observou diferença significativa.

Tabela 1: Frequências genótípicas e alélicas do gene *INF-γ* (+874 T/A) entre o grupo controle, os casos de NIC e os de câncer cervical.

Genótipos	Controle n = 76 (%)	NIC I n = 45 (%)	NIC II/III n = 108 (%)	Câncer n = 9 (%)	P value	χ^2
TT	13 (17,11)	8 (17,7)	17 (15,7)	2 (22,2)	$p1 = 0,4192$	2,764
TA	46 (60,53)	22 (48,9)	59 (54,6)	3 (33,3)	$p2 = 0,2574$	
AA	17 (22,36)	15 (33,4)	32 (29,7)	4 (44,5)	$p3 = 0,8099$	
Alelos						
T	72 (47,4%)	38 (42,2%)	93 (43,0%)	7 (38,9%)	$p1 = 0,370 / OR = 1,20$	
A	80 (52,6%)	52 (57,8%)	123 (57,0%)	11(61,1%)	$p2 = 0,6194 / OR = 1,41$	
					$P3 = 1,00 / OR = 0,966$	

$p1$ = controle x NIC I + NIC II/ III; $p2$ = controle x Câncer; $p3$ = NIC I x NIC II/III

Relação entre o polimorfismo do gene *IL-12B* (+1188 A/C) e a susceptibilidade à lesão e/ou desenvolvimento de câncer cervical.

Após reação de amplificação da região +1188 do gene *IL-12B*, foi obtido um produto de 118pb. Em seguida, as amostras foram digeridas com a enzima de restrição *Taq I* e analisadas em gel de agarose a 3%. A figura 3 mostra o resultado dos três genótipos possíveis para o polimorfismo. Na ausência do sítio de digestão para a enzima *Taq I* foi gerado apenas um único fragmento de 118pb e a amostra foi genotipada como AA (genótipo selvagem). A presença de dois fragmentos (92pb e 26pb) após digestão configura amostra CC (genótipo mutante homozigoto). E finalmente a presença de três fragmentos (118pb, 92pb e 26pb) configura amostra AC (genótipo mutante heterozigoto).

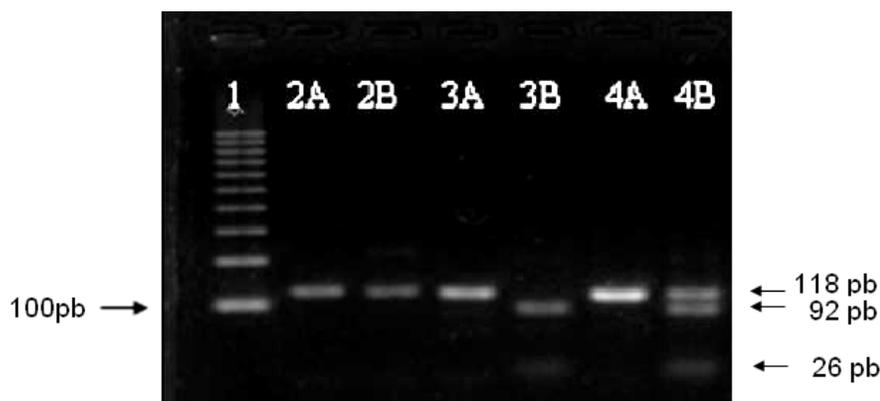


Figura 3. Gel de agarose a 3% corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia), demonstrando a presença dos três genótipos possíveis para o polimorfismo +1188 A/C do gene *IL-12B*. 1: Ladder 100pb; 2A: amostra 1 não-digerida; 2B: amostra 1 digerida (selvagem AA); 3A: amostra 2 não-digerida; 3B: amostra 2 digerida (mutante homozigota CC), 4A: amostra 3 não-digerida; 4B: amostra 3 digerida (mutante heterozigota AC).

A distribuição das frequências genótípicas e alélicas do gene *IL-12B* entre os grupos investigados estão apresentados na tabela 2. Para o grupo dos casos, 100 indivíduos (61,7 %) apresentaram o genótipo AA, 49 (30,2%) o AC e 13 (8,1%) o CC. Dos 76 indivíduos controles, 31 (40,8 %) apresentaram genótipo AA, 37 (48,7%) AC e 8 (10,5%) CC. Analisando a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesão cervical, pode-se verificar que há uma diferença significativa entre as distribuições genótípicas ($p = 0,009$) e alélicas ($p = 0,0038$) do grupo de casos e do grupo controle, sendo o alelo A mais frequente nos casos de lesões. Verificou-se também que as populações estavam no equilíbrio de Hardy–Weinberg ($\chi^2 = 1,561$).

Após estratificação do grupo de pacientes com lesão cervical, as amostras apresentaram os seguintes genótipos: das 45 amostras NIC I, 20 (44,4%) apresentaram genótipo AA, 17 (37,8%) AC e 8 (17,8%) CC. Para as 108 amostras NIC II/III, 73 (67,6%) tinham genótipo AA, 31 (28,7%) AC e 4 (3,7%) CC. Dos 9 casos de câncer, 7 (77,8%) apresentaram genótipo AA, 1 (11,1%) AC e 1 (11,1%) CC (Tabela 2).

Tabela 2: Frequências genótípicas e alélicas do gene *IL-12B* (+1188 A/C) entre o grupo controle, os casos de NIC e os de câncer cervical.

Genótipos	Controle n = 76 (%)	NIC I n = 45 (%)	NIC II/III n = 108 (%)	Câncer n = 9 (%)	<i>P value</i>	χ^2
AA	31 (40,8%)	20 (44,4)	73 (67,6)	7 (77,8)	$p1 = 0,009$	1,561
AC	37 (48,7%)	17 (37,8)	31 (28,7)	1 (11,1)	$p2 = 0,068$	
CC	8 (10,5%)	8 (17,8)	4 (3,7)	1 (11,1)	$p3 = 0,0036$	
Alelos						
A	99 (65,1%)	57 (63,3%)	177 (81,9%)	16 (88,8%)	$p1 = 0,0038 / OR= 0,5344$	
C	53 (34,9%)	33 (36,7%)	39 (18,1%)	4 (22,2%)	$p2 = 0,2159 / OR= 0,468$	
					$p3 = 0,0010 / OR= 0,3819$	

$p1=$ Controle x NIC I + NICII/III; $p2 =$ Controle x Câncer; $p3=$ NIC I x NIC II/III

Além disso, quando analisada a progressão das lesões, ao serem comparados os casos de NIC I com os de NIC II/NIC III, nota-se participação mais expressiva do genótipo AA nos casos de NIC II/III ($p = 0,0036$). Quanto à frequência alélica, houve diferença significativa ($p = 0,0010$) ao se compararem os dois grupos, com maior frequência do alelo C nas amostras de lesão de baixo grau (36,7%) e menor nas de lesão de alto grau (18,1%). Contudo, quando as frequências alélicas foram analisadas em relação à susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer cervical, este fato não foi observado ($p = 0,2159$).

DISCUSSÃO

A literatura atual oferece grande variedade de evidências de que polimorfismos em genes de citocinas importantes no sistema imune podem funcionar como fator predisponente ao desenvolvimento de doenças de acordo com os níveis de expressão da interleucina gerados pelo polimorfismo [27-28]. No presente estudo, avaliou-se a distribuição dos polimorfismos funcionais nas posições +874 do primeiro intron do gene *INF- γ* e +1188 da região 3'-UTR do gene *IL-12* por serem regiões bastante estudadas e haver divergências nos resultados de acordo com a população de estudo [29-30].

Em relação ao polimorfismo no gene *INF- γ* , notou-se que a maioria das populações estudadas possui o alelo mutante A. Neste sentido, nossos resultados corroboram com os de outras populações envolvendo também pacientes com e sem NIC, como a população de Curitiba [9], a do norte da Índia [29] e a Italiana Caucasiana [28], nos quais os genótipos mais encontrados são o AT, seguido pelo AA e só em seguida o TT. Na população sul-africana, no entanto, o genótipo AA foi o mais frequente, tanto nas pacientes (56,0%) quanto no grupo controle (64,0%) [30].

Em nossos resultados, verificamos que não houve participação do polimorfismo na predisposição à lesão cervical, nem à progressão da lesão e desenvolvimento de câncer. Estes resultados corroboram com os obtidos por Govan et al. [30] que não encontraram associação entre o polimorfismo +874 T/A e a susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento do câncer em uma população sul-africana.

Dentre outros estudos que avaliaram este polimorfismo com a susceptibilidade à outras doenças podemos destacar os realizados por Matos et al. [31] que relacionaram este polimorfismo à susceptibilidade a Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio de Janeiro, e que também não observaram diferenças na distribuição genotípica entre os grupos caso e o controle, assim como, o estudo realizado por Tangwattanachuleeporn et al. [32] que não encontraram associação deste polimorfismo com o risco do desenvolvimento de Lupus Eritematoso Sistêmico em pacientes da Tailândia.

O polimorfismo na região *INF- γ* +874 tem sido associado à susceptibilidade e/ou progressão a uma diversidade de doenças uma vez que o genótipo AA (mutante homocigoto) é o responsável pelos baixos níveis de expressão desta citocina, pois a sequência de DNA contendo o alelo T é o sítio específico de ligação para o fator de transcrição NF-kB, o qual transcreve o gene para produção da interleucina [19].

Von Linsingen et al. [9], apesar de não encontrarem diferença genotípica significativa do polimorfismo em questão entre os pacientes com NIC e o grupo controle, mostraram que o genótipo AA foi mais encontrado em pacientes com NIC II do que nos controles e sugeriram que este SNP pode favorecer a progressão da doença. Ainda neste mesmo raciocínio, Gangwar et al. [29] notaram que o genótipo AA e o alelo A estavam significativamente mais presentes no grupo de pacientes com NIC do que nos pacientes saudáveis. O mesmo foi observado por Yo et al. [23] estudando o risco à susceptibilidade à infecção intrauterina pelo vírus da hepatite B na China. Torres et al. [21], analisando pacientes com doença de Chagas na Colômbia, verificaram que o polimorfismo em questão pode estar envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, mas não em sua progressão. Amin et al. [33] observaram uma significativa associação entre o alelo A mutante e a ocorrência de tuberculose em uma população do Rio de Janeiro e de Goiás.

Em relação à *IL-12B*, em nossa população estudada, o genótipo AA (selvagem) estava mais presente no grupo de pacientes (61,7%) com lesão cervical que no grupo controle (40,8%). Neste, o genótipo mais frequente foi o AC (48,7%). Através dos dados obtidos, sugerimos que o alelo mutante C confere proteção ao desenvolvimento de lesões cervicais e suas evoluções, já que este alelo, associado ao genótipo AC, esteve significativamente mais presente nos caso controle que nos casos de NIC ($p = 0,0038$). Além disso, o alelo selvagem A estava associado à progressão da lesão, pois estava mais presente nos casos de lesão cervical de alto grau ($p = 0,0010$).

O polimorfismo no gene *IL-12B* está associado ao desenvolvimento de doenças em função da alteração dos níveis de produção da citocina causada pelo alelo mutante. Entretanto, o consenso sobre o aumento ou diminuição desta citocina quando da mutação é ainda controverso. Apenas dois outros estudos associando o polimorfismo da região 3'UTR+1188A/C com o risco de desenvolvimento do câncer cervical foram realizados. Porém, em ambos, não foi encontrada correlação entre este polimorfismo e o aumento do risco e características clínico - patológicas do câncer cervical em mulheres coreanas e chinesas. Nesses trabalhos, o gene *IL-12B* teve relação com a probabilidade de desenvolvimento de câncer quando associados a outros polimorfismos nesse mesmo gene [10,18].

Porém, outros autores encontraram associação deste polimorfismo em questão com o desenvolvimento de outras doenças. Hoffmann et al. [34] verificaram que o alelo mutante C estava associado à ocorrência de infecção por Citomegalovírus em pacientes

caucasianos. Este mesmo alelo também estava influenciando o desenvolvimento de cardiopatia Chagásica em pacientes da Colômbia [35], assim como associado à mortalidade cerebral nos casos de Malária em pacientes da Tanzânia [36]. Phawong et al. [37] verificaram que o polimorfismo na *IL12-B* diminui a susceptibilidade ao desenvolvimento de malária severa. Muller-Steinhardt [38] encontrou que, na população alemã estudada, portadores do alelo mutante C responderam mais eficientemente ao tratamento antiviral contra o vírus da hepatite C.

Selvaraj et al. [39], através da técnica de ELISA, dosaram os níveis de IL-12p40 em pacientes com tuberculose pulmonar e verificaram que eles estavam mais altos em amostras com o genótipo CC, comparado com outros genótipos. Outros pesquisadores, também encontraram associação do alelo +1188C 3'-UTR com o aumento da produção de IL12 não somente em carreadores da infecção crônica pelo vírus da hepatite C [38], mas também em doadores de sangue saudáveis [40]. O presente estudo pode estar de acordo com esses dados, já que o alelo C mutante parece conferir proteção ao desenvolvimento de lesão cervical pelo HPV, pois este alelo esteve significativamente mais presente em amostras do grupo controle.

Entretanto, em estudos realizados por Marcos [27], em pacientes com hepatite alcoólica, o genótipo CC estaria associado à redução da expressão da IL-12. Esta diminuição nos níveis da citocina seria responsável por uma redução na resposta Th1 e um aumento do padrão Th2 da resposta imune, favorecendo assim o desenvolvimento das NICs [41-43], além da perda da atividade anti-tumoral da IL-12 [44].

Em vista de todas as contrariedades envolvendo polimorfismos de citocinas e o desenvolvimento de doenças, nota-se que as populações precisam ser avaliadas separadamente. Particularmente no caso de câncer cervical envolvendo o HPV, existe um grande número de variáveis para que a doença se desenvolva, dentre elas fatores étnicos, sócio-econômicos, biológicos e estilo de vida [30]. Dessa forma, quanto mais variáveis forem estudadas em uma mesma população, mais fácil se torna entender a influência dos fatores predisponentes para o desenvolvimento de câncer cervical e suas lesões precursoras. No presente estudo, verificamos que o polimorfismo +874 T/A no gene *INF-γ* não estava envolvido na predisposição ao desenvolvimento de lesões cervicais, enquanto o alelo mutante C, da região +1188 A/C do gene da IL-12, possivelmente confere proteção contra o desenvolvimento e progressão das lesões.

Bibliografia

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324 (1):17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033 S004268220400220X [pii]
2. Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S7-15. doi:S1386-6532(04)00367-1 [pii] 10.1016/j.jcv.2004.12.006
3. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM (2007) Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 7 (1):79-89
4. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401 (1):70-79. doi:S0042-6822(10)00100-5 [pii] 10.1016/j.virol.2010.02.002
5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348 (6):518-527. doi:10.1056/NEJMoa021641 348/6/518 [pii]
6. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, Konig R, Tyring SK (2004) Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 122 (1):87-93. doi:S0166-0934(04)00238-1 [pii] 10.1016/j.jviromet.2004.08.007
7. Brasil (2010) Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uteri/definicao Accessed 25.01.2011 2011
8. Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR (2011) Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunol Rev* 239 (1):85-98. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00966.x
9. von Linsingen R, Bompeixe EP, Maestri CA, Carvalho NS, da Graca Bicalho M (2009) IFNG (+874 T/A) polymorphism and cervical intraepithelial neoplasia in Brazilian women. *J Interferon Cytokine Res* 29 (5):285-288. doi:10.1089/jir.2008.0081
10. Han SS, Cho EY, Lee TS, Kim JW, Park NH, Song YS, Kim JG, Lee HP, Kang SB (2008) Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 140 (1):71-75. doi:S0301-2115(08)00065-1 [pii] 10.1016/j.ejogrb.2008.02.007
11. Abbas AK, Lichtman AH, Andrew H, Pillai S (2008) *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, 6ª edição edn. Elsevier, São Paulo
12. Farzaneh F, Roberts S, Mandal D, Ollier B, Winters U, Kitchener HC, Brabin L (2006) The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *BJOG* 113 (8):961-964. doi:BJO956 [pii] 10.1111/j.1471-0528.2006.00956.x
13. Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang SS, Shen M, Berndt SI, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Yeager M, Welch R, Boyle P, Zhang B, Zou K, Zhu Y, Chanock S (2006) Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107 (10):4101-4108. doi:2005-10-4160 [pii] 10.1182/blood-2005-10-4160
14. Purdue MP, Lan Q, Krickler A, Grulich AE, Vajdic CM, Turner J, Whitby D, Chanock S, Rothman N, Armstrong BK (2007) Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: findings from the New South Wales

- non-Hodgkin Lymphoma Study. *Carcinogenesis* 28 (3):704-712. doi:bgl200 [pii] 10.1093/carcin/bgl200
15. Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W, Morton LM, Davis S, Severson RK, Rothman N, Lynch CF, Wacholder S, Chanock SJ, Habermann TM, Hartge P (2007) Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood* 109 (12):5439-5446. doi:blood-2006-11-058040 [pii] 10.1182/blood-2006-11-058040
 16. Nieters A, Yuan JM, Sun CL, Zhang ZQ, Stoecklacher J, Govindarajan S, Yu MC (2005) Effect of cytokine genotypes on the hepatitis B virus-hepatocellular carcinoma association. *Cancer* 103 (4):740-748. doi:10.1002/cncr.20842
 17. Navaglia F, Basso D, Zambon CF, Ponzano E, Caenazzo L, Gallo N, Falda A, Belluco C, Fogar P, Greco E, Di Mario F, Rugge M, Plebani M (2005) Interleukin 12 gene polymorphisms enhance gastric cancer risk in *H pylori* infected individuals. *J Med Genet* 42 (6):503-510. doi:42/6/503 [pii] 10.1136/jmg.2004.022723
 18. Chen X, Han S, Wang S, Zhou X, Zhang M, Dong J, Shi X, Qian N, Wang X, Wei Q, Shen H, Hu Z (2009) Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. *Clin Cancer Res* 15 (1):400-405. doi:15/1/400 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-08-1829
 19. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV (2000) A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61 (9):863-866. doi:S0198-8859(00)00167-1 [pii]
 20. Vallinoto AC, Graca ES, Araujo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LF, Ishak MO, Ishak R (2010) IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol* 71 (7):692-696. doi:S0198-8859(10)00080-7 [pii] 10.1016/j.humimm.2010.03.008
 21. Torres OA, Calzada JE, Beraun Y, Morillo CA, Gonzalez A, Gonzalez CI, Martin J (2010) Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol* 10 (5):682-685. doi:S1567-1348(10)00070-5 [pii] 10.1016/j.meegid.2010.03.009
 22. Urbanowicz I, Mazur G, Stacherzak-Pawlik J, Bogunia-Kubik K, Wrobel T, Wozniak M, Kuliczowski K (2010) IFN gamma gene polymorphism may contribute to the susceptibility to CLL. *Pathol Oncol Res* 16 (2):213-216. doi:10.1007/s12253-009-9209-2
 23. Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE (2006) Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 12 (18):2928-2931
 24. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV (1999) ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol* 7 (2):127-128. doi:S0966-3274(99)80030-6 [pii]
 25. Reynard MP, Turner D, Navarrete CV (2000) Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. *Eur J Immunogenet* 27 (4):241-249. doi:ej227 [pii]
 26. Sousa CS (2003) Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16s RRNA em populações de *Melipona Rufiventris*. *Biosci J Uberlândia* 19:67-50
 27. Marcos M, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ (2009) Common polymorphisms in interleukin genes (IL4, IL6, IL8 and IL12) are not associated with

- alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men. *Cytokine* 45 (3):158-161. doi:S1043-4666(08)00791-6 [pii] 10.1016/j.cyto.2008.11.003
28. Poli F, Nocco A, Berra S, Scalamogna M, Taioli E, Longhi E, Sirchia G (2002) Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. *Eur J Immunogenet* 29 (3):237-240. doi:303 [pii]
 29. Gangwar R, Pandey S, Mittal RD (2009) Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population. *BJOG* 116 (12):1671-1677. doi:BJO2307 [pii] 10.1111/j.1471-0528.2009.02307.x
 30. Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL (2003) Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog* 2 (1):3. doi:10.1186/1477-3163-2-3
 31. Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S, Pirmez C, Sampaio EP, Moraes MO, Da-Cruz AM (2007) IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7:33. doi:1471-2334-7-33 [pii] 10.1186/1471-2334-7-33
 32. Tangwattanachuleeporn M, Sodsai P, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J, Wongchinsri J, Hirankarn N (2007) Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. *Clin Rheumatol* 26 (11):1921-1924. doi:10.1007/s10067-007-0699-6
 33. Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa e Silva JR, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR (2008) Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* 35 (4):563-566. doi:10.1007/s11033-007-9123-1
 34. Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Al-Najjar A, Marliere JF, Lebranchu Y, Baron C (2009) Impact of a polymorphism in the IL-12p40 gene on the outcome of kidney transplantation. *Transplant Proc* 41 (2):654-656. doi:S0041-1345(08)01644-8 [pii] 10.1016/j.transproceed.2008.12.002
 35. Zafra G, Morillo C, Martin J, Gonzalez A, Gonzalez CI (2007) Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* 9 (9):1049-1052. doi:S1286-4579(07)00175-X [pii] 10.1016/j.micinf.2007.04.010
 36. Morahan G, Boutlis CS, Huang D, Pain A, Saunders JR, Hobbs MR, Granger DL, Weinberg JB, Peshu N, Mwaikambo ED, Marsh K, Roberts DJ, Anstey NM (2002) A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes Immun* 3 (7):414-418. doi:10.1038/sj.gene.6363909
 37. Phawong C, Ouma C, Tangteerawatana P, Thongshoob J, Were T, Mahakunkijcharoen Y, Wattanasirichaigoon D, Perkins DJ, Khusmith S (2010) Haplotypes of IL12B promoter polymorphisms condition susceptibility to severe malaria and functional changes in cytokine levels in Thai adults. *Immunogenetics* 62 (6):345-356. doi:10.1007/s00251-010-0439-y
 38. Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H, Hartel C (2004) Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 4 (3):402-406
 39. Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyanani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR (2008) Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in

- pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 43 (1):26-33. doi:S1043-4666(08)00121-X [pii] 10.1016/j.cyto.2008.04.011
40. Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G (2002) A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes Immun* 3 (7):419-423. doi:10.1038/sj.gene.6363919
 41. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E (1997) Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 89 (3):245-250
 42. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D (2001) Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol* 195 (2):179-185. doi:10.1002/path.929 [pii] 10.1002/path.929
 43. Peghini BC (2009) Perfil da resposta imune local em pacientes com lesão intraepitelial cervical de baixo grau, alto grau e neoplasia invasiva. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba
 44. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A (2007) Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 13 (16):4677-4685. doi:13/16/4677 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-07-0776

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos na genotipagem das regiões +874 T/A do gene *INF- γ* e +1188 A/C do gene da *IL-12* em amostras de pacientes com e sem lesões intraepiteliais cervicais em diferentes graus, podemos concluir que o polimorfismo do *INF- γ* não estava envolvido na predisposição ao desenvolvimento de lesões cervicais, enquanto o alelo mutante C, do gene *IL-12*, possivelmente confere proteção contra o desenvolvimento e progressão das lesões.

Já que o câncer cervical é considerado uma doença multifatorial e várias são as causas que contribuem para a progressão das lesões, além de existirem muitas divergências em relação à associação de uma citocina particular com a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças, sugerimos que as populações sejam avaliadas de forma particular e que em cada uma, um perfil maior de citocinas seja estudado para um melhor entendimento da resposta imune no paciente.

7. ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 105/2009-CEP/CCS

Recife, 29 de abril de 2009.

Registro do SISNEP FR – 226696

CAAE – 0347.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 355/08

Título: "ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE ALGUNS GENES RELACIONADOS COM A IMUNIDADE HUMANA E A INFECÇÃO POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS EM PACIENTES COM E SEM LESÕES INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS".

Pesquisador Responsável: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 28 de abril de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – LIKA/UFPE

8. NORMAS PARA SUBMISSÃO À REVISTA

Molecular Biology Reports - Instructions for Authors

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.

- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- Word template

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability

in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body