



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

ALEX PAULINO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DOS GENES *IL-10* E *TNF- α* COM A SUSCEPTIBILIDADE ÀS
DOENÇAS CERVICAIS**

Recife
2015

ALEX PAULINO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DOS GENES *IL-10* E *TNF- α* COM A
SUSCEPTIBILIDADE ÀS DOENÇAS CERVICAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza.

Recife

2015

S586a Silva, Alex Paulino da
Associação dos Genes *IL-10* e *TNF-A* com a
susceptibilidade às doenças cervicais / Alex Paulino da Silva.
-- Recife, 2015.
65 f.: il.

Orientador (a): Paulo Roberto Eleutério de Souza.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Departamento de Veterinária, Recife, 2015.
Referências.

1. Câncer de colo uterino 2. Fator de Necrose Tumoral
3. Interleucina-10 4. Polimorfismo I. Souza, Paulo Roberto
Eleutério de, orientador II. Título

CDD 636.089

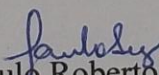
ALEX PAULINO DA SILVA

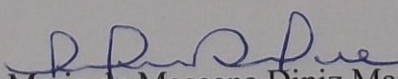
**ASSOCIAÇÃO DOS GENES *IL-10* E *TNF- α* COM A
SUSCEPTIBILIDADE ÀS DOENÇAS CERVICAIS**


“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.”

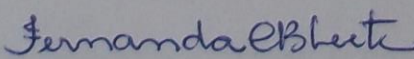
Aprovada em: 12 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal de Pernambuco


Prof. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco


Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho
Universidade Federal Rural de Pernambuco


Prof. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho a muitas que perderam a batalha e a tantas outras que travam uma luta diária contra esta doença.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, centro de sabedoria e força invisível, que se faz presente nos momentos de tribulações;

À minha família: rocha firme, porto seguro, base do meu ser, alicerce da minha vida e todos os sinônimos que essa palavra possa transmitir;

Aos sempre presentes, porém muitas vezes distantes, Hugo, Diogo, Rodrigo, Julinho e Alan, que sempre puderam me fazer rir, quando a vontade era de chorar;

Aos amigos da Licenciatura, Sandrinha, Fran, Aline, Marília, Vanessa e Fábio, que estiveram presentes no meu crescimento e sempre foram fontes de motivação e inspiração;

A Jeffrey Aislan, o chato mais querido e mais inteligente que a vida me deu o prazer de conhecer;

A todos que fazem a EREM Poeta Mauro Mota, o caminho tinha mais pedras que a princípio imaginei e vocês nunca me deixaram desanimar;

Ao Professor Paulo Roberto, orientador incomparável, pessoa admirável e profissional digno de todo respeito;

À Professora Maria Mascena, que foi mais que uma simples orientadora, foi uma palavra de esperança quando o único sentimento era o desespero;

A todos que fazem / fizeram o LGBS-Tânia Falcão: Tamiris, Ericka, Bruno, Joaquim, Luciana, Mayara, Jamilly, Jean, Camila, Sérgio, Géssica, Isaura, Carlito, Neto, Erinaldo, Samantha, Maysa, Renata, Lidiane, Tereza, Denise, Hildson e Elaine. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível, obrigado pelas risadas, pelas dúvidas, pelos ensinamentos, pelas trocas de experiências, pela ajuda e por me fazer ser o que sou hoje.

Peço desculpas, se esqueci de alguém,

A todos, muito obrigado por estarem presente em mais uma etapa da minha vida.

*“...Que essa minha vontade de ir embora;
Se transforme na paz e na calma que mereço;
E que essa tensão que me corrói por dentro;
Seja um dia recompensada;
Porque metade de mim é o que penso;
Mas a outra metade é um vulcão...”*

Oswaldo Montenegro

RESUMO

O câncer cervical (CC) é uma doença que acomete aproximadamente 1,5 milhões de mulheres no mundo e possui como agente etiológico o *Papilomavirus humano* (HPV). Proteínas ligadas à resposta imune são essenciais para a eliminação viral. Entretanto, as variações em seus genes, tais como *IL-10* [(A-1082G) (rs1800896)] e *TNF- α* [(G-308A) (rs1800629)] podem predispor os indivíduos ao surgimento de várias doenças como lúpus, artrite reumatoide, AIDS, assim como algum tipo de câncer. No presente estudo, objetivamos investigar a possível associação dos polimorfismos de base única (SNP) nas regiões rs1800896 e rs1800629 com a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões escamosas cervicais e adenocarcinoma uterino. Além disso, associá-los com dados clínicos das pacientes. Foram utilizadas 240 amostras de DNA de mulheres infectadas por HPV (168 de secreção vaginal, oriundas de lesão cervical escamosa, e 72 de material parafinado, proveniente de adenocarcinoma uterino) e 169 amostras de DNA de controle saudável (HPV e lesões negativas). A análise do polimorfismo foi realizada pela técnica ARMS-PCR. Nossos resultados mostraram associação do polimorfismo rs1800896 do gene *IL-10* com a susceptibilidade às doenças cervicais ($p < 0,05$). Resultado não encontrado para o polimorfismo rs1800629 do gene *TNF- α* ($p > 0,05$). Por outro lado, em relação a este último, encontramos associação dos genótipos GA/GG somados com as características: idade > 35 anos, idade precoce da coitarca, uso de contraceptivos orais, fumo, derivação africana e co-infecção por *Chlamydia trachomatis* ($p < 0,05$) e a susceptibilidade às lesões escamosas cervicais. O nosso estudo mostrou que os genes *IL-10* e *TNF- α* são fortes candidatos a serem utilizados como biomarcadores molecular no rastreamento preventivo de pacientes susceptíveis às doenças cervicais na população de estudo.

Palavras chaves: Câncer de Colo uterino. Fator de Necrose Tumoral. Interleucina-10. Polimorfismo.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is a disease that affects approximately 1.5 million women in the world and has as a causing agent the human papillomavirus (HPV). Proteins associated with the immune response are essential for viral elimination. However, variations in their genes, such as *IL-10* [(A-1082G) (rs1800896)] and *TNF- α* [(G-308A) (rs1800629)] may predispose individuals to various diseases such as lupus, rheumatoid arthritis, AIDS, as well as some forms of cancer. In the present study, we aimed to investigate the possible association of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regions rs1800896 and rs1800629 with the predisposition to develop cervical squamous intraepithelial lesions and cervical adenocarcinoma. In addition, we wanted to match them with sociodemographic profiles and different habits of the patients. We used DNA samples from 240 women with HPV infection (168 vaginal secretion samples and 72 paraffin-embedded samples) and 169 healthy control DNA samples (HPV negative). Analysis of each polymorphism was performed by ARMS-PCR. Our results showed a positive association of the polymorphism rs1800896 of the *IL-10* gene with susceptibility to develop cervical disease ($p < 0.05$). However, there was no association in relation to the polymorphism rs1800629 on the *TNF- α* gene ($p > 0.05$). On the other hand, for the latter SNP, a positive correlation was found for the following characteristics: age > 35 years, early age of first sexual intercourse, use of oral contraceptive, smoking, African ancestry and co-infection by *Chlamydia trachomatis* ($p < 0.05$). Our study showed that the *IL-10* and *TNF- α* genes are strong candidates to be used as molecular biomarkers in the preventive screening of patients susceptible to cervical disease in the study population.

Key words: Cervical Cancer. Tumor Necrosis Factor. Interleukin-10. Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estatística mundial para incidência e mortalidade por câncer cervical escamoso.	15
Figura 2 Perspectiva mundial de óbitos ocasionados por CC	16
Figura 3 Perspectiva mundial do câncer cervical ao longo dos anos	17
Figura 4 Divisão anatômica do colo uterino e representação espacial da Junção Escamo-Colunar (JEC)	20
Figura 5 Epidemiologia global do adenocarcinoma uterino	21
Figura 6 Representação do genoma do HPV com suas regiões codificadoras, precoce (E1-E7) e tardia (L1-L2), e não codificadora (LCR, longa região de controle)	24
Figura 7 Epidemiologia molecular do HPV no Brasil	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Incidência do câncer cervical entre as regiões brasileiras	18
Tabela 2 Classificação do adenocarcinoma entre os cânceres que acometem mulheres por região	22
Tabela 3 Estimativas de novos casos de adenocarcinoma uterino para o Biênio 2014-2015 por estados	23
Tabela 4 Sintomatologia e Tipos Virais de HPV	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARMS-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase baseada no Sistema de Mutação Resistente a Amplifica�o
G0	Estágio de repouso celular
G-CSF	Fator Estimulador de Col�nias de Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador de Col�nias de Granulócitos e Monócitos
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HPV	<i>Papilomavirus humano</i>
HR-HPV	<i>Papilomavirus humano</i> de alto risco oncogênico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Jun�o Escamo-Colunar
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
LPS	Lipopolissacarídeo
LR-HPV	<i>Papilomavirus humano</i> de baixo risco oncogênico
KDa	KiloDalton
MAPK	Proteínas Kinases Ativadoras de Mitógeno
M-CSF	Fator estimulador de Col�nias de Monócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Natural Killer
PAF	Fator Antiplaquet�rio
PGE	Prostaglandina
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
TFA	Fator de Atividade Tissular
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – α
TNFR	Receptor de Fator de Necrose Tumoral
WHO	Organiza�o Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CÂNCER CERVICAL ESCAMOSO – EPIDEMIOLOGIA	15
2.2	ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL	19
2.2.1	Epidemiologia	21
2.3	PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)	24
2.3.1	Ciclo de vida	26
2.3.2	Infecções causadas por HPV	26
2.3.3	Patologia do HPV	27
2.4	SISTEMA IMUNE NO COMBATE AO HPV	29
2.5	FATOR DE NECROSE TUMORAL- ALFA	31
2.6	INTERLEUCINA – 10	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
	REFERÊNCIAS	37
	ARTIGO	47

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino é uma dos tipos de câncer mais frequentes entre mulheres no mundo, tornando-se um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento onde existe uma maior dificuldade em programas de rastreamento populacional. Epidemiologicamente, esta doença tem atingido aproximadamente 530.000 casos e 265.000 óbitos por ano (INCA, 2014). No Brasil, estima-se para o ano de 2014, 15.590 novos casos de Câncer cervical, com um risco estimado de 15,33 para cada 100.000 habitantes. Este tipo de tumor é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, ultrapassado apenas pelo câncer de mama. Em Pernambuco, por sua vez, estima-se o surgimento de aproximadamente 970 novos casos/ ano com uma taxa bruta de 20,47/ 100.000 habitantes (INCA, 2014).

O *Papilomavirus humano* (HPV) é considerado o principal agente etiológico para o surgimento e progressão de neoplasias cervicais e do câncer do útero (BOSCH et al., 1995; CASTELLSAGUÉ et al., 2006). Existem mais de 200 tipos de HPV e aproximadamente 40 infectam a região genital feminina, porém nem todos os tipos possuem alto potencial oncogênico (MUÑOZ et al., 2006). O grupo classificado como baixo risco oncogênico (LR-HPV) é representado pelos tipos virais, 6, 11, 70, 73, entre outros, que podem provocar o surgimento de lesões benignas como verrugas simples e condilomas (VANAI et al., 2009). Os subtipos considerados de alto risco oncogênico (HR-HPV) representado pelos tipos virais 16, 18, 31, 33, 45, 56, entre outros, são frequentemente detectados em lesões intraepiteliais de alto grau e câncer do colo uterino (MUÑOZ et al., 2006).

Estudos recentes têm demonstrado que a presença da infecção pelo HPV por si só não é suficiente para o desencadeamento do câncer cervical, uma vez que, apenas um pequeno percentual das mulheres infectadas pelo vírus (5 a 10%) progridem para o câncer uterino. Assim, a presença de cofatores como uso de álcool, idade precoce de atividade sexual, multiplicidade de parceiros sexuais, etnia, tabagismo, uso prolongado de contraceptivos orais e coinfeções por outros microrganismos, como a infecção por *Chlamidia trachomatis* [CT], herpesvirus, HIV e por outros patógenos, atuam como potencializadores na progressão das neoplasias cervicais (SMITH et al., 2000). Além disso, podemos destacar a presença de polimorfismos genéticos do hospedeiro na progressão do câncer, principalmente os que estão

intimamente relacionados com o sistema imunológico (CANIZZARO; DURTS; MENDEZ, 1988).

O gene *IL-10*, produz uma proteína de mesmo nome que atua como uma das mais importantes citocinas do sistema imunológico humano e possui ação anti-inflamatória. Um estudo realizado por Giannini et al. (2002) sugere que níveis de IL-10 aumentados promovem uma imunossupressão local favorecendo a infecção e persistência do HPV e, conseqüentemente, surgimento de lesões cervicais. Moore et al. (2001), avaliaram o polimorfismo na região promotora do gene *IL-10* -1082 (G>A, rs1800896) e verificou uma elevação nos níveis proteicos da IL-10 em pacientes com câncer uterino. Contudo, este mesmo polimorfismo apresenta controversos de acordo com a população estudada com relação à susceptibilidade a doença. Um estudo realizado Zidi et al. (2014) em mulheres da Tunísia não observou diferenças significativas entre o polimorfismo (A-1082G) do gene *IL-10* e o desenvolvimento de câncer cervical.

Outro gene de grande interesse clínico é o *TNF- α* , que produz uma proteína de mesmo nome. Esta proteína atua diretamente no controle da infecção por HPV, induzindo apoptose em células infectadas pelo vírus, aumentando dessa forma a resposta inflamatória através do aumento de moléculas de adesão e de citocinas e ao contrário do IL-10, possui ação pró-inflamatória. Indivíduos que apresentam o genótipo -308 A/A para o polimorfismo rs1800629 apresentam uma maior probabilidade em desenvolver o câncer cervical (DUARTE, 2005). Porém, resultados da literatura são bastante controversos (BARBISAN et al., 2012). Nessa pesquisa realizada com 122 mulheres argentinas não foi observada associação entre o polimorfismo (G-308A) e câncer uterino.

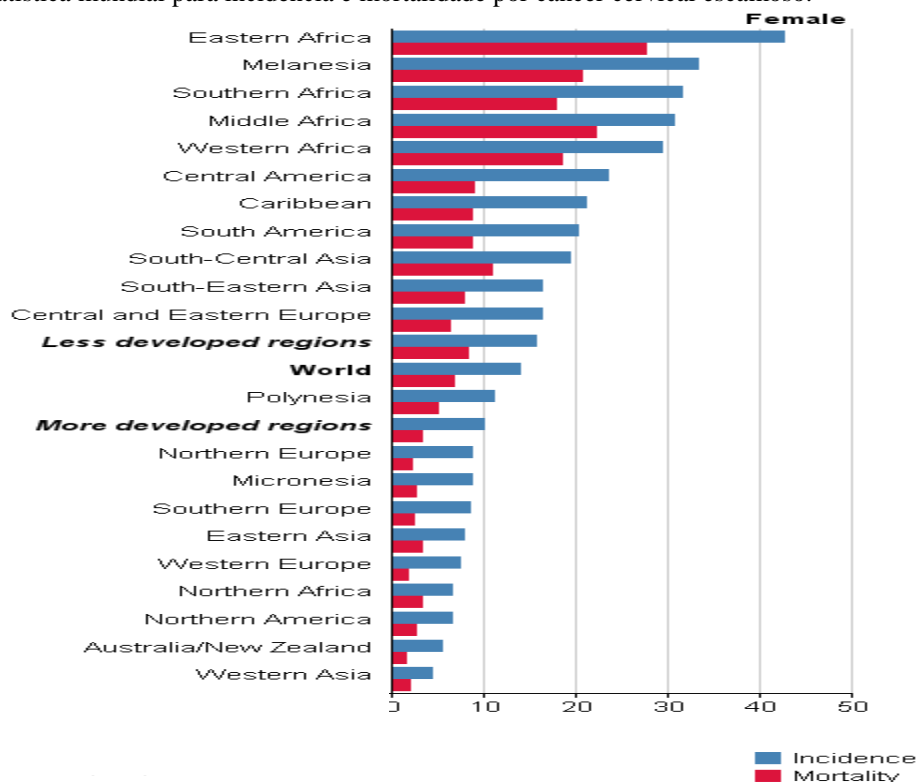
Desta forma, nosso estudo pretende avaliar a relação genética dos polimorfismos rs1800896 e rs1800629 com o desenvolvimento de doenças cervicais, haja vista que estas citocinas são de extrema importância na resposta imune e podem estar associadas com a eliminação / persistência viral, ou mesmo com a regressão / progressão das lesões cervicais escamosas e adenocarcinoma uterino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER CERVICAL ESCAMOSO – EPIDEMIOLOGIA

Dados da Organização Mundial de Saúde mostraram que o câncer cervical escamoso é o quarto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres e o sétimo entre todos os tipos de câncer no mundo, com 528.000 mulheres diagnosticadas anualmente e 276.000 mortes relacionadas (WHO, 2012). A grande maioria da carga global ocorre em regiões menos desenvolvidas (85%), sendo responsável por quase 12% de todos os cânceres femininos (Figura 1). As regiões com taxas acima de 30 casos para cada 100.000 habitantes são classificadas como Regiões de Alto Risco, ou ASRs. Os maiores índices são vistos em países da África Oriental (42,7 casos / 100.000 habitantes), Melanésia (33,3), Sul (31,5) e África Central (30,6) e os menores índices são registrados na Austrália / Nova Zelândia (5,5) e na Ásia Ocidental (4,4) (WHO, 2012). Abscissa representada por regiões mundiais e Ordenada representada por valores de incidência e mortalidade para cada grupo de 100 mil hab.

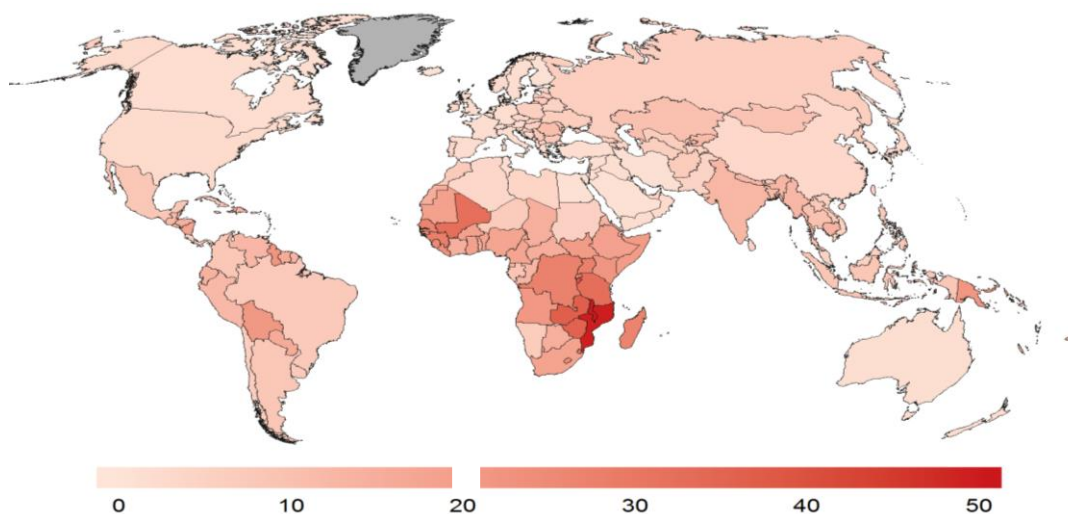
Figura 1 - Estatística mundial para incidência e mortalidade por câncer cervical escamoso.



Fonte: Who (2012). Adaptado

A taxa de mortalidade por Câncer Cervical Escamoso apresenta uma variação de 18 vezes entre as diferentes regiões do mundo, com taxas variando desde menos de dois óbitos para cada 100.000 habitantes como na Ásia Ocidental, Europa Ocidental e Austrália / Nova Zelândia, até mais de 20 óbitos para cada 100.000 habitantes observados na Melanésia (20,6), África Central (22,2) e Oriental (27,6). Além disso, em Moçambique foram registrados níveis assombrosos de óbitos com uma taxa de 49,3 mulheres para 100.000 habitantes (Figura 2).

Figura 2 - Perspectiva mundial de óbitos ocasionados por CC.



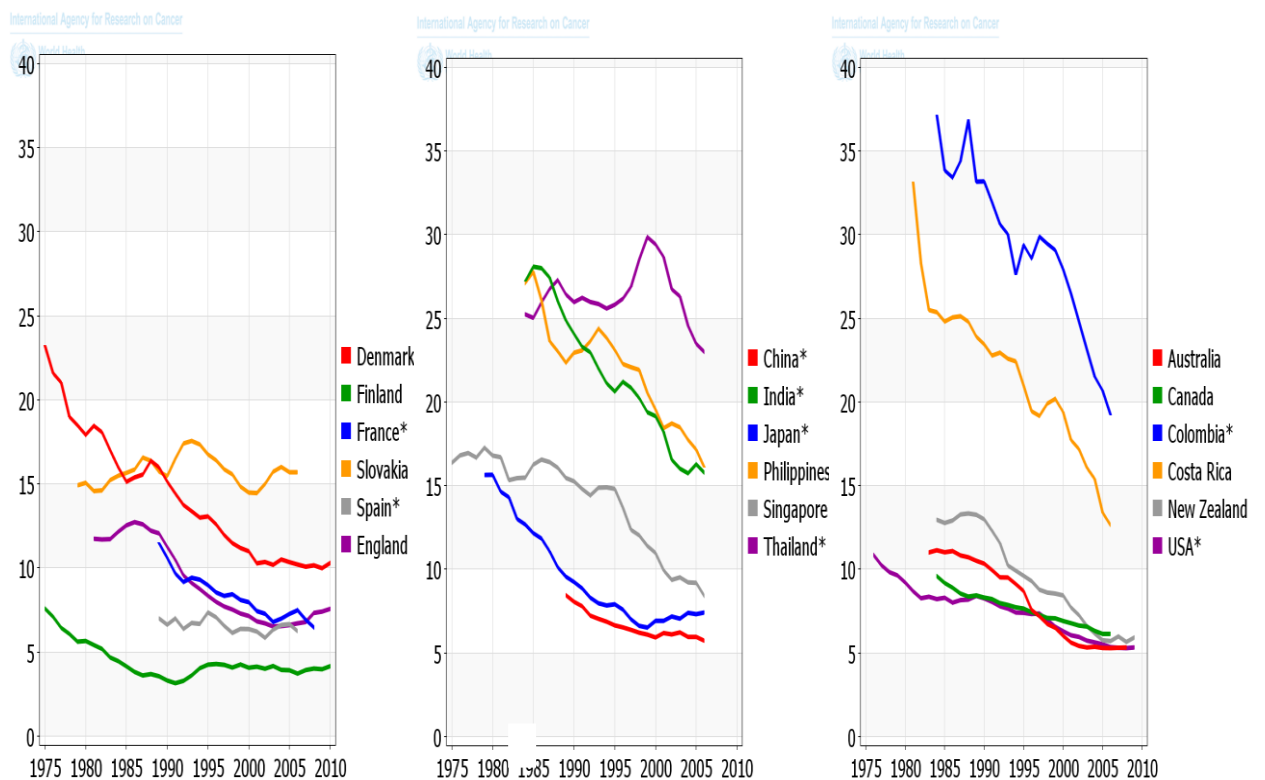
Fonte: Who (2012). Adaptado

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) registrou a morte de 33.000 mulheres com Carcinoma Escamoso na América Latina e Caribe no ano de 2012, e estima-se ainda que a cada ano 86.000 mulheres serão diagnosticadas em todo continente americano, destas 72.000 vivem na América Latina e Caribe, sendo o Brasil contribuinte com cerca de 20% de todos os casos de câncer cervical do continente (IARC, 2014). Esses elevados níveis de mortalidade são atribuídos basicamente às dificuldades nos serviços de tratamento e prevenção da doença, somados à baixa disponibilidade de recursos humanos, visto com maior frequência em cidades com baixo nível socioeconômico, e dificuldade do sistema público em absorver as demandas com alterações diagnosticadas e incapacidade nos níveis de atenção e atendimento ao paciente (BRAZIL, 2010).

Por outro lado, programas de prevenção estão sendo implantados ao longo dos anos em diversos países do mundo e o que era esperado, vem se tornando realidade, uma diminuição em números de casos confirmados para o câncer cervical escamoso (Figura 3).

É possível observar que as maiores diminuições em números de casos confirmados para o câncer cervical uterino são vistas em países da América Latina: Colômbia (variação de 37,4 casos / 100.000 habitantes para 19,8 casos) e Costa Rica (variação de 33,7 casos / 100.000 habitantes para 13,8 casos) (Figura 3). Os países destacados com (*) apresentam as maiores diminuições de acordo com o continente.

Figura 3 - Perspectiva mundial do câncer cervical ao longo dos anos.



Fonte: Who (2012). Adaptado

Contudo, as perspectivas mundiais não são agradáveis. Estudos desenvolvidos pela Organização Mundial de Saúde através da IARC mostram uma perspectiva assombrosa para os próximos cinco anos (IARC, 2014). A erradicação desse tipo tumoral está bem distante de ser alcançada. Estimativas divulgadas pela Organização Mundial de Saúde (2014) mostram

uma elevação de cerca 300% na frequência de mulheres atingidas pelo câncer cervical para os próximos cinco anos, ou seja, isso representará um aumento de 528.000 por ano para 1.547.000 novos casos. Grande parte das pacientes será oriunda de países africanos, estes representarão 81,3% dos casos previstos (1.258.000 pacientes) (WHO, 2014).

No Brasil são estimados, de acordo com dados do INCA, cerca de 15.590 novos casos de câncer escamoso para o biênio 2014-2015. Esse tipo de câncer é o terceiro tipo de tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama e colorretal, e a quarta causa de morte em mulheres por câncer. Contudo, essa classificação apresenta variações conforme as regiões brasileiras: Na Região Norte este é o câncer mais frequente entre as mulheres, nas Regiões Centro-Oeste e Nordeste é o 2º tipo mais frequente entre a população feminina, na Região Sudeste é o quarto tipo mais incidente e na Região Sul é o quinto (Tabela 1).

Tabela 1 - Incidência do Câncer cervical entre as regiões brasileiras.

Ordenação	Região	Incidência/ 100.000 hab
1ª	Norte	23,5
2ª	Centro-Oeste	22,1
2ª	Nordeste	18,7
4ª	Sudeste	15,8
5ª	Sul	10,1

Fonte: INCA (2014).

A região Nordeste, com 5.370 casos previstos, representará 1/3 dos casos estimados de câncer cervical do Brasil. Pernambuco, com a 2º maior incidência de casos previstos dentre todos estados nordestinos, terá 970 mulheres com este tipo de tumor e Recife 180 pacientes (INCA, 2014).

2.2 ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL

As lesões que acometem as células glandulares ou colunares (adenocarcinoma) são também conhecidas como Atipia Glandular Endocervical (AGE), Hiperplasia Glandular Atípica (HGA), Neoplasia Intraepitelial Glandular Cervical, Câncer do Corpo do Útero e Displasia Glandular Endocervical (DGE). Este último termo é o mais empregado pela Organização Mundial de Saúde (WHO), (ZAINO, 2000; MCCLUGAGGE, 2003; CARVALHO; CAMPANER, 2005; EL-GHOBASHY et al., 2005).

As primeiras denominações das atipias glandulares foram inseridas no Sistema Bethesda em 1988 quando foi criada a categoria de Células Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado (AGUS). Posteriormente, em 2001, foi modificada para Atipia Glandular Cervical (AGC) (HAMMOUD et al., 2002; VERDIANI et al., 2003; CAMPANER et al., 2007; WESTIN, 2009).

Os adenocarcinomas são originados na mucosa endocervical, a princípio como adenocarcinomas *in situ* e podem progredir para adenocarcinoma invasivo ou adenocarcinoma escamoso (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; CASTELLSAGUÉ et al., 2006; HERZOG; MONK, 2007). Além disso, ao contrário do que vem ocorrendo com o carcinoma escamoso, esse tipo de neoplasia tem aumentado, principalmente entre mulheres jovens e brancas. Os adenocarcinomas ocorrem principalmente em mulheres com faixa etária de 50 anos de idade (TAWFIK et al., 2006).

A confirmação de células escamosas atípicas pela citologia é dez vezes maior que o achado de DGE (CAMPANER et al., 2007). Essa disparidade entre as incidências deve-se principalmente a localização celular, sendo as células escamosas situadas nas camadas mais superficiais do tecido epitelial (epiderme) e as células glandulares em camadas basais (derme).

Porém, a busca por DGEs nos centros de prevenção ginecológica tornou-se um procedimento crescente ao longo da última década (ZHAO et al., 2009; CASTLE et al., 2010). A confirmação dessas atipias glandulares é de extrema importância clínica, pois a associação com doenças endometriais de alto grau e cânceres é maior que os achados de atipias em células escamosas. De fato, 9% a 38% das mulheres com DGE apresentam lesões significativas (NIC 2, NIC 3 e Adenocarcinoma *in situ*) e de 3% a 17% têm carcinomas invasivos (CASTLE et al., 2010).

As principais explicações para os menores índices de achados das atipias glandulares endocervicais em comparação as células atípicas escamosas podem ser:

1- Progressão mais rápida para as formas neoplásicas

Pacientes com lesões glandulares apresentam uma faixa etária de $\pm 38,8$ anos de idade, enquanto que pacientes com lesões escamosas de alto grau, ou como classificado anteriormente NIC 3, apresentam uma faixa etária de $\pm 33,6$ anos de idade. Ao progredir para formas invasoras, adenocarcinoma invasivo e carcinoma escamoso invasivo, essas diferenças ficam quase imperceptíveis, sendo os pacientes de adenocarcinoma invasivo com faixa etária de $\pm 51,7$ anos e $\pm 51,4$ anos para o câncer escamoso (SYRJANEN, 2004). Dessa forma é possível observar um tempo necessário de $\pm 12,9$ anos para a confirmação carcinoma glandular, enquanto que para o carcinoma escamoso esse tempo aumenta para $\pm 17,8$ anos.

2- Sensibilidade dos procedimentos tradicionais

Nesse aspecto destaca-se principalmente uma baixa quantidade de células ou mesmo ausência de células glandulares. Os adenocarcinomas estão localizados abaixo das células estratificadas do tecido epitelial, abaixo da junção escamo-colunar, JEC (Figura 4). Considerando que no exame de Papanicolau o profissional de saúde tem apenas uma visão superficial do tecido, qualquer anormalidade que haja em células glandulares passará de forma despercebida. Para intensificar ainda mais o problema, os adenocarcinomas tendem a se desenvolver nas regiões mais internas das glândulas afetando as amostragens citopatológicas. Essas limitações dificultam o acesso das escovas citológicas e, por sua vez, dificultam o diagnóstico precoce (SMITH et al., 2000; SYRJANEN, 2004; CASTELLSAGUÉ et al., 2006).

Figura 4 - Divisão anatômica do colo uterino e representação espacial da Junção Escamo-Colunar (JEC).

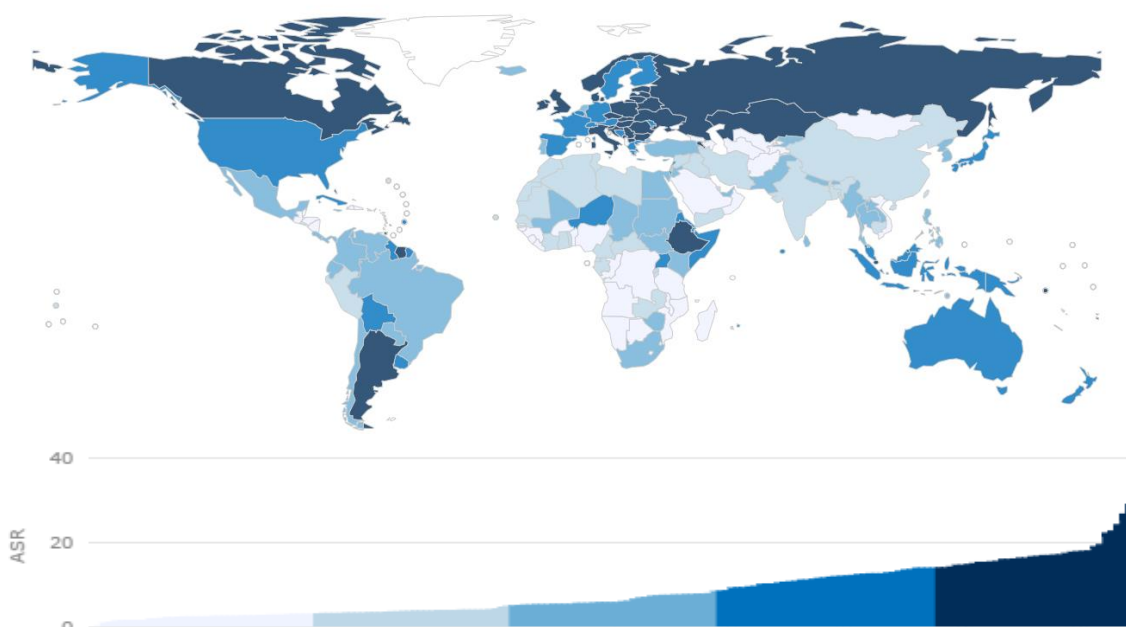


Fonte: Pinheiro (2014)

2.2.1 Epidemiologia

Anualmente são estimados cerca de 319.000 novos casos de adenocarcinoma endocervical no mundo, tendo os maiores índices em Barbados (34,1), Armênia (26,7), Estados Unidos da América (19,5), Canadá (16,3) e Rússia (16,1), (Figura 5). A média global para o adenocarcinoma uterino é de 8,3 pacientes para cada grupo de 100.000 habitantes. Regiões acima de 20 casos / 100.000 são consideradas de alto risco (INCA, 2014).

Figura 5 - Epidemiologia global do adenocarcinoma uterino.



Fonte: GLOBOCAN (2015)

No Continente Americano os maiores índices são vistos em Barbados (34,1), Guiana (22,7), Estados Unidos da América (19,5), Guatemala (17,4) e Guiana Francesa (17). Dentre os 35 países da América, o Brasil ocupa o 21º lugar em incidência de adenocarcinoma uterino (IARC, 2014). A figura acima nos revela baixos índices de lesão glandular endocervical no continente africano, resultado contrário ao carcinoma escamoso, provavelmente esses valores se devam à falta de programas de rastreamento e mesmo dados epidemiológicos acerca do adenocarcinoma uterino.

Anualmente, entre os casos confirmados, aproximadamente 24% chegam a óbito, totalizando 76.000 mortes causadas pelo adenocarcinoma uterino anualmente no mundo e, assim como visto no câncer escamoso, as previsões mostram uma tendência em elevação. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam a confirmação de 1.216.000 casos de adenocarcinoma para o ano de 2020. (GLOBOCAN, 2015).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, estima-se o surgimento de 5.900 novos casos, com um risco estimado de 5,79 casos a cada 100 mil mulheres, para o Brasil (INCA, 2014). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, podemos ordenar o adenocarcinoma do colo uterino entre os tumores que acometem o sexo feminino da seguinte forma entre as diversas regiões do Brasil. Na Região Sudeste é o sexto de tumor mais frequente entre as mulheres, nas Regiões Centro-Oeste e Nordeste, o sétimo mais incidente, respectivamente, e nas Regiões Norte e Sul, o 9º mais frequente. (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação do adenocarcinoma entre os cânceres que acometem mulheres por região.

Ordenação	Região	Incidência/ 100.000 hab
6ª	Sudeste	7,58
7ª	Centro-Oeste	5,22
8ª	Nordeste	4,0
9ª	Norte	6,3
9ª	Sul	2,16

Fonte: INCA (2014)

Os maiores índices são vistos em São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (1.900; 420 e 410 / 100 mil habitantes, na devida ordem). Esses valores podem ser explicados pela densidade populacional desses estados, o que gera um maior número de casos registrados. Vale ressaltar que não há dados epidemiológicos desse tipo tumoral para os Estados do Acre, Amapá, Roraima e Tocantins. Para Região Nordeste são estimados 1.140 casos, nas quais,

Pernambuco ocupa a 1ª posição, entre todos estados nordestinos, com 290 casos estimados e Recife com 90 novos casos esperados para 2014/2015, Tabela 3 (INCA, 2014).

Tabela 3 - Estimativas de novos casos de adenocarcinoma uterino para o Biênio 2014-2015 por estados. Adaptado de INCA 2014.

Estados	Adenocarcinoma do colo uterino
Acre	**
Amapá	**
Amazonas	50
Pará	70
Rondônia	20
Roraima	**
Tocantins	**
Alagoas	80
Bahia	270
Ceará	210
Maranhão	70
Paraíba	80
Pernambuco	290
Piauí	50
Rio Grande do Norte	60
Sergipe	30
Distrito Federal	130
Goiás	130
Mato Grosso	50
Mato Grosso do Sul	80
Espírito Santo	80
Minas Gerais	420
Rio de Janeiro	880
São Paulo	1.900
Paraná	330
Rio Grande do Sul	410
Santa Catarina	170

Fonte: INCA (2014)

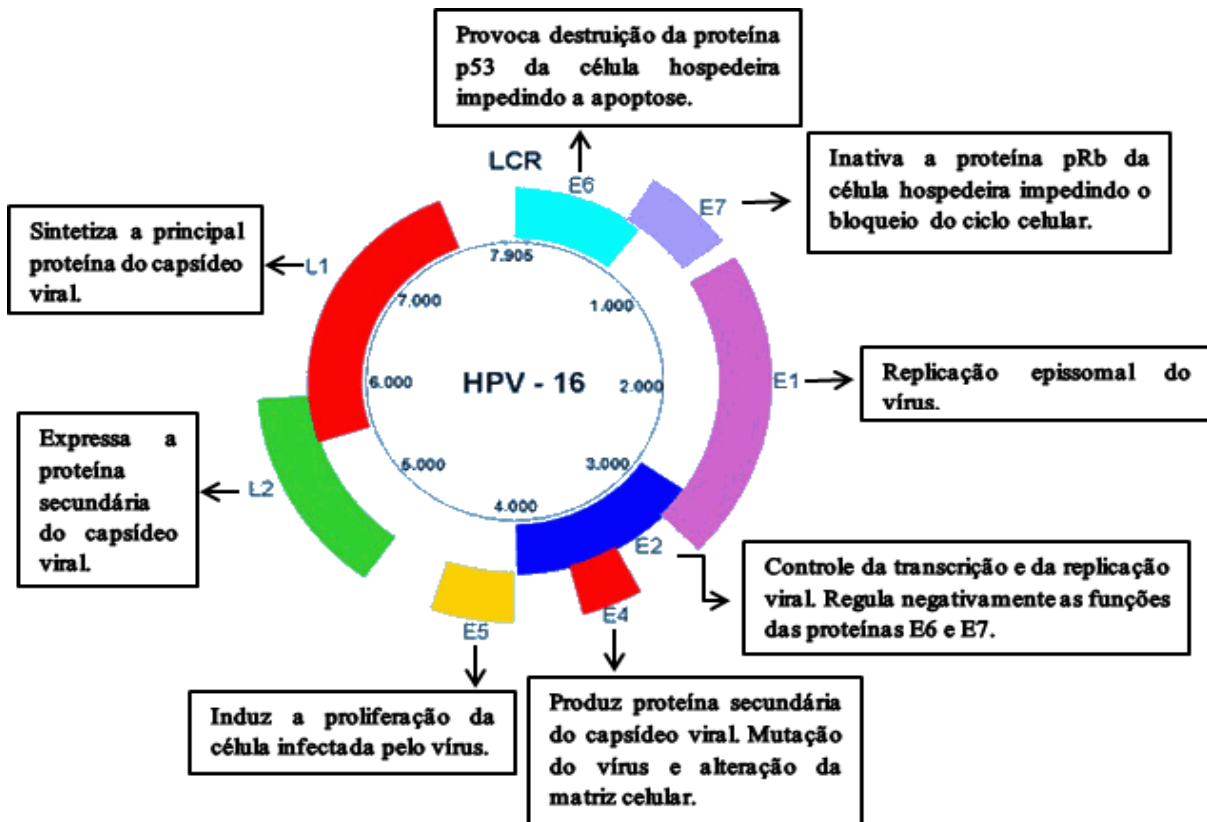
A falta de registros epidemiológicos visto em estados da Região Norte, ou mesmo os altos índices prevalentes na Região Sudeste podem ser explicados pela falta de programas de rastreamento que visem diagnosticar e contabilizar os casos de adenocarcinoma uterino. Essa falta de ação pode mascarar os reais valores atribuídos a este de tipo de tumor.

2.3 PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

O *Papilomavírus humano* pertence à família papillomaviridae, formando partículas virais não envelopadas, icosaédricas com cerca de 55 nm de diâmetro (FELLER, 2009; MARGARET; MCLAUGHLIN-DRUBIN; MUNGER, 2009). Esse vírus tem em sua estrutura um DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8000 pb e 8 genes, tendo seu material genético dividido em duas regiões codificadoras (precoce “E” e tardia “L”) e uma região não-codificadora chamada de Longa Região de Controle (LCR) (PSYRRI; DIMAIO, 2008; GANGULY; PARIHAR, 2009;).

A região E (early) do genoma do HPV, composta por seis genes, é responsável pela expressão de proteínas replicativas do DNA viral (E1 e E2), transcrição do RNA do organismo (E2), reorganização do citoesqueleto (E4) e a transformação da célula hospedeira (E5, E6 e E7). A região L (late), composta por dois genes, expressa proteínas do capsídeo viral (HOSTETLER et al., 2007) (Figura 6).

Figura 6 - Representação do genoma do HPV com suas regiões codificadoras, precoce (E1-E7) e tardia (L1-L2), e não codificadora (LCR, longa região de controle)



Fonte: Ministério da Saúde (2008). Adaptado

Atualmente são reconhecidos mais de 200 tipos de HPVs sendo tipificados por diferenças dos seus DNAs. Dentre estes, cerca de 100 tipos já foram descritos como capazes de infectar o ser humano e cerca de 50 tipos são capazes de infectar a mucosa do aparelho genital (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2005; NAKAGAWA et al., 2010).

Os diversos tipos de HPVs conhecidos podem ser classificados quanto ao tropismo e quanto à capacidade de risco para o desenvolvimento de neoplasias (MUNOZ et al., 2006).

Em relação ao seu tropismo, o *Papilomavírus humano* pode infectar tanto tecidos cutâneos quanto mucosas, se classificando em cutaneotrópicos e mucosotrópicos, respectivamente (CRISH et al., 2000; KISSELJOV, 2000; SILVA et al., 2003). Os vírus cutaneotrópicos são frequentemente encontrados em lesões benignas como condilomas, verrugas simples e papilomas. Já os mucosotrópicos são relacionados à lesões escamosas intraepiteliais e glandulares do colo uterino, vulva, vagina e pênis, e carcinomas cervicais de cabeça e pescoço (BADARACO et al., 2000; SMITH et al., 2000; RIVOIRE et al., 2001; STEVENS, 2002).

Os HPVs podem ainda ser classificados como de baixo (LR-HPV) ou alto risco (HR-HPV) oncogênico, diferindo na capacidade de induzir alterações na apoptose e transformação celular, assim como de interagir com os vários componentes do ciclo celular (SANTANA et al., 2008).

Geralmente, os vírus de baixo risco estão associados às lesões benignas e possuem baixo potencial oncogênico. Dentre eles estão os tipos 6, 11, 42, 43 e 44. Por outro lado, HPVs de alto risco são agentes causadores de câncer cervical e suas lesões precursoras. Os tipos de HPVs particularmente associados a esta doença são o 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 e 68 (SCHIFFMAN; BURK, 1997; NORONHA et al., 1999; BRENNAN; SYRJÄNEN, 2003; DE VILLIERS et al., 2004).

O HPV está presente em 99% de todos os casos de câncer do colo uterino, sendo os de alto risco oncogênico (exemplos, 16, 18, 31, 33, 45) detectados em mais de 97% dos casos em todo o mundo (CLIFFORD et al., 2003). Os tipos virais 16 e 18 aumentam o risco de progressão das lesões, sendo comumente associados com neoplasia intraepitelial de alto grau e atipia glandular, na devida ordem (FERNANDES; NARCH, 2007).

2.3.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do HPV está diretamente ligado ao processo de diferenciação celular. A entrada do patógeno no organismo ocorre através de células basais do tecido estratificado. Essas células, por sua vez, dividem-se e iniciam a especialização celular, produzindo células epiteliais maduras. As células intermediárias dividem-se e direcionam-se às camadas mais externas (SOUTO, 2005). Os possíveis responsáveis pela entrada do HPV nas células são os proteoglicanos (sulfatos de heparina) que, talvez, atuem como receptores do vírus na célula. Esse proteoglicano age na porção carboxi-terminal da proteína L1 do vírus e permitem a adsorção do vírus à célula (BURD, 2003).

Após entrada na célula, o DNA viral se estabiliza e ocorrem as primeiras cópias do material genético. Ao entrarem em divisão celular, as células promovem uma divisão equitativa entre o genoma viral. Uma das células recém-geradas migra para as camadas superficiais e inicia o processo de especialização, enquanto que a outra permanece na camada basal servindo como reservatório. O vírus só estará completamente organizado nas células das camadas mais externas, desse modo, as células basais não sofrerão ruptura pela replicação viral (FEHRMANN; KLUMPP; LAIMINS, 2003).

As células saudáveis “não infectadas” ao saírem da camada basal, pelo processo de divisão celular, interrompem o ciclo celular. Vale ressaltar que nesse momento a célula já está ou inicia o processo de diferenciação, não necessitando divisão. Contudo, a partir do momento que essa célula é considerada infectada, a proteína E7 do vírus reativa o ciclo celular e essas células retornam a Fase S (MICHELLE; LAIMINS, 2004).

No complemento da montagem viral entram as proteínas L1 e L2 que são responsáveis pelo capsídeo viral. Seguindo o processo de montagem, os vírus maduros são liberados pelas camadas mais superficiais do epitélio (FEHRMANN; KLUMPP; LAIMINS, 2003).

2.3.2 Infecções causadas por HPV

As infecções pelo HPV podem ser classificadas de duas diferentes formas:

1- Tolerante

Nesse tipo de infecção o vírus realiza o ciclo celular básico, adsorção, penetração, integração, replicação, transcrição e tradução. A maioria das pacientes que apresentam esse

tipo de infecção consegue eliminar o vírus do organismo através de defesas autoimunes (TYRING, 2000).

2- Persistente

Nesse tipo de infecção o vírus apresenta interrupções em algumas etapas da replicação viral. Esse tipo de infecção é muito estudado em lesões de baixo e alto grau oncogênico. As lesões de baixo grau assemelha-se em muito com as infecções tolerantes. Nestas as células eliminam o patógeno e voltam ao estado anteriormente normal. Nas lesões de alto grau ocorre uma transcrição diferenciada, estando a expressão dos genes precoces elevada e dos genes tardios retardada, nesse caso ocorre um aumento transcricional dos genes E6 e E7 (CANIZZARO et al., 1990). Vale frisar que é muito comum a observação de lesões de baixo grau circundando o tecido oncogênico, isso pode ser visto como desenvolvimento sequencial da infecção viral. Outro fator importante é a confirmação de diferentes tipos HPVs em uma mesma lesão, inferindo-se que um deles predomine na indução à patologia da lesão (TYRING, 2000).

2.3.3 Patologia do HPV

Dentre os vários tipos de HPVs existentes, cerca de 25% deles apresentam um tropismo pelos tecidos escamosos e glandulares do corpo humano, ocasionando uma extensa quantidade de lesões epiteliais benignas, ou mesmo, malignas, descritas na Tabela 4 (HORRY et al., 2008; CARNEIRO et al., 2009; GANGULY; PARIHAR, 2009; GRM; BERGANT; BANKS, 2009; TCHERNEV, 2009).

Tabela 4 - Sintomatologia e Tipos Virais de HPV.

Especificidade	Manifestações Clínicas	Tipagem
Cutâneo-trópico	Verrugas plantares	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 3, 10 e 28
	Verrugas vulgares (planas)	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75 e 76
	Outras lesões cutâneas (ex.: cistos epidérmicos, carcinoma de laringe)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72 e 73
	Epidermodisplasia verruciformis	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37 e 38

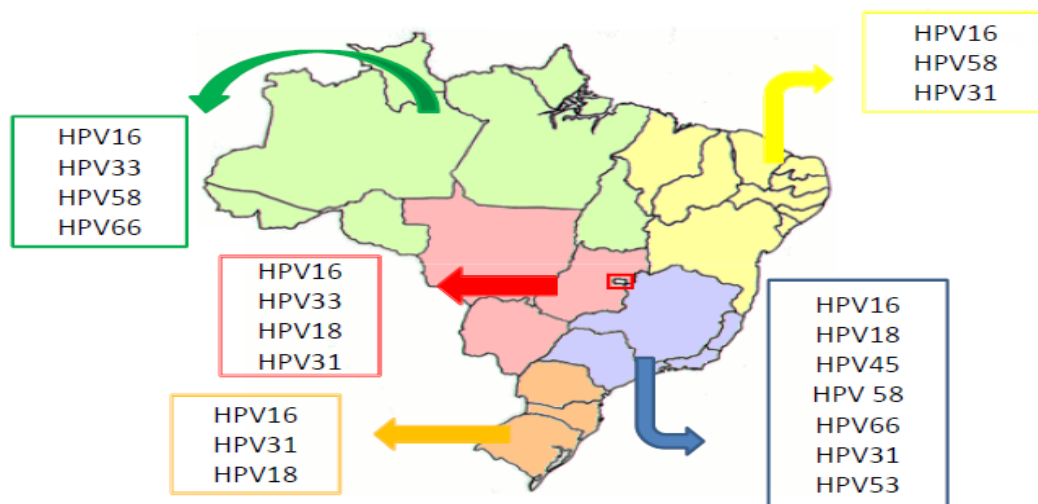
	Papilomatose respiratória recorrente	47, 50, 6 e 11
	Papilomas/Carcinomas conjuntivos	6, 11 e 16
	Condiloma acuminado (verrugas genitais)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55 e 70
Mucosotrópico	Lesão Intraepitelial cervical	
	Baixo grau	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52 e 74
	Alto Grau	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, e 66
	Carcinoma escamoso	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68 e 70
	Adenocarcinoma	18, 16, 31 e 33

Fonte: Borges (2008)

A relação da epidemiologia da infecção do HPV com o câncer escamoso do colo uterino apresenta diferenças conforme as mudanças geográficas. Em cerca de 21 países estudados, o HPV16 apresenta uma posição de destaque, sendo o mais frequente em 19 países. Os outros dois países apresentaram o HPV18 como sendo o mais prevalente (BOSCH et al., 1995; YAMADA et al., 1997).

Os maiores índices de HPVs de alto risco oncogênico são encontrados em países africanos e latino-americanos. Na América Central e América do Sul, os oito tipos de HPV mais prevalentes são os HPVs 16, 18, 31, 45, 33, 58, 52 e 35, na devida ordem, para amostras de carcinonoma cervical invasivo e os Tipos 16, 58, 18, 31, 33, 51, 6 e 45, na ordem apresentada, para amostras de lesões intraepiteliais de alto grau (BOSCH et al., 1995; SMITH et al., 2007). Um estudo realizado por Alves (2013) mostrou que o HPV do tipo 16 é o mais frequente no Brasil, estando presente em todas as regiões, seguido do HPV 31, presente em 4 regiões (Figura 7) .

Figura 7 - Epidemiologia molecular do HPV no Brasil.



Fonte: Alves (2013)

2.4 SISTEMA IMUNE NO COMBATE AO HPV

Uma das melhores formas de tentar explicar os caminhos traçados pelo HPV para infectar organismo se faz através de observações em pacientes imunodeprimidos. Em 1984, Sillman e colaboradores observaram que pacientes deprimidas imunologicamente por diferentes causas apresentaram infecção pelo HPV e, posteriormente, neoplasia genital. Anos mais tarde, Penn (1986) relatou um aumento de cem vezes no risco ao desenvolvimento de câncer de vulva e ânus em pacientes HPV-Positivos e com deficiência renal. Concordando com esses resultados, Marck; DE Vieyst; Steyarert (2003) observaram uma direta associação entre pacientes de transplante renal e a susceptibilidade à infecção pelo HPV.

Um dos procedimentos mais utilizados para confirmar a relação entre a deficiência do sistema imunológico e susceptibilidade à infecção viral pelo HPV é realizada em ensaios com pacientes soropositivos. Nestes é possível verificar uma facilitação na infecção, persistência e até mesmo na coinfeção. Um grande questionamento está relacionado com carga viral de HIV, contagem de linfócitos T CD4⁺ e infecção por HPV. Alguns ensaios relacionam as altas prevalências de HIV e baixos níveis de CD4⁺ com a facilitação à persistência do HPV. Por outro lado, outros estudos estabelecem associação apenas entre o HIV e o HPV independente da contagem de CD4⁺. Uma das possíveis explicações para essas incoerências de resultados deve-se as diferentes características sociocomportamentais das populações estudadas

(MARCK; DE VIEYST; STEYARERT, 2003). Segundo estes mesmos autores, os maiores obstáculos na busca pela associação do sistema imunológico e a infecção pelo HPV deve-se:

1- O ciclo de vida do HPV está diretamente ligado à divisão celular das células epiteliais, e só a pouco tempo foi possível promover uma manutenção desse ciclo *in vitro*.

2- A infecção pelo HPV é restrita as células epiteliais e sem manifestações clínicas generalizadas, ou seja, a visualização da resposta imune no sangue é um desafio enorme (MARCK; DE VIEYST; STEYARERT, 2003).

2.5 FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA

Também conhecida como caquetina, esta citocina próinflamatória, ou seja, estimulante do processo inflamatório, codificada pelo gene de mesmo nome, localizado no braço longo do cromossomo 6 (região 21.3), possui em sua estrutura 157 aminoácidos em forma de homotrímeros, com 26 kDa e secretada por macrófagos, monócitos, células NK e Células T. Sua síntese está diretamente relacionada com a presença de LPS, vírus, bactérias intracelulares e células tumorais e, muitas vezes, com alterações intracelulares (DUARTE et al., 2005).

Agindo de forma conjugada com a IL1, IL2, IFN e IL6, esta citocina é de suma importância na compreensão do processo inflamatório mediada por células (ROITT et al., 2002). Além disso, é estimulado pela bradicinina, imunocomplexos, inibidores da ciclooxigenase e PAF (CLARCK, 2007).

As funções desempenhadas por esta citocina estão relacionadas com o aumento da citólise em diferentes estágios de neoplasia e atividade antitumoral, sendo esta função primordial no controle do desenvolvimento tumoral. Também possui ação hematopoiética, ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, pirógeno endógeno, e acentua a expressão de proteínas da fase aguda da inflamação (FORTE, 2004).

As funções do TNF- α melhores caracterizadas estão ligadas a apoptose e inflamação. Pacientes que apresentam um quadro de sepse e ao mesmo tempo com altas taxas desse citocina em níveis séricos apresentam uma progressão das manifestações clínicas. Esses resultados também foram vistos em testes com animais de laboratórios, que mesmo sem apresentar um quadro de septicemia tiveram choque séptico ao serem manipulados com grandes doses desta proteína. Porém, em concentrações basais essa proteína estimula a angiogênese e induz a proliferação celular (BERNARDINO et al., 2008).

A TNF- α possui uma papel primordial na atuação do sistema imune inato e adaptativo. Em condições normais esta proteína é sintetizada em níveis basais, contudo, mediante ao estímulo de outras proteínas pró-inflamatórias e diante da exposição de patógenos, essa síntese pode se tornar elevada (EGAN, 2004; POPA et al., 2007).

Em células tumorais já foi observado que o início e o desenvolvimento tumoral estão associados com a inibição da expressão de TNF- α (BALKWILL, 2009; YIN et al., 2009).

A TNF- α apresenta dois receptores, o TNFR1, presente em grande parte das células e está relacionado com morte de neurônios, e o TNFR2, este por sua vez, apresenta papel antagônico ao primeiro (BERNARDINO et al., 2008). Ao ocorrer uma interação entre os receptores de TNF e proteínas adaptadoras (p38 e MAPK) é dado início a uma cascata de sinalização. Os receptores dos TNFs induzem a morte celular por (KASSARDJIAN; KREYDIYYEH, 2008).

Alguns estudos sugerem que o TNF- α atue como um protetor endógeno de tumores, tais como, câncer de mama, linfomas, endométrios uterino e câncer gástrico (MOORE et al., 1999; OH et al., 2000; SASAKI et al., 2000; MACHADO et al., 2003). Em células tumorais esta citocina parece desempenhar uma função inibidora ao desenvolvimento do tumor em monócitos humanos (IGANSI, 2009).

No caso da infecção por HPV, esta citocina apresenta duas funções, uma direta e outra indireta. Diretamente o TNF- α promove a morte celular das células infectadas e tumorais, em outras palavras, promove um controle no crescimento tumoral (DESPHANDE et al., 2005). Em relação à função indireta, os níveis séricos da citocina são controlados por mecanismos genéticos, principalmente polimorfismos de bases únicas encontrados na região promotora do gene (DESPHANDE et al., 2005).

O gene *TNF- α* possui vários polimorfismos em sua estrutura localizados na região promotora: -1031 (T/C), -863 (C/A), -857 (C/T), -308 (G/A), -238 (G/A), -1196 (C/T), -1125 (G/C), -572 (A/C), -316 (G/A), -163 (G/A) e -70 (G/A). Contudo, modificações na região promotora (-308) deste gene já foram amplamente associadas com diferentes tumores. Mutações na região -308 (G/A) influenciam diretamente no aumento de expressão da proteína e induzem a uma maior probabilidade de desenvolver a neoplasia cervical (IGANSI, 2009).

Fernandes et al. (2008) constataram que indivíduos homozigóticos G/G (-308), ou que apresentavam a presença do alelo G, possuem uma menor taxa desta proteína no soro, já os genótipos A/G e A/A estão ligados as elevações séricas desta proteína. Foi visto ainda, que pacientes saudáveis e que não apresentavam nenhuma lesão cervical possuíam, em sua grande maioria, o genótipo G/G, conferindo uma possível proteção. As baixas produções desta proteína, mediadas pelo genótipo (G/G) estão associadas às lesões de baixo grau, enquanto que A/G ou A/A associam-se com lesões de alto grau ou câncer invasivo.

Entretanto, um estudo realizado por Govan et al. (2006) com 244 amostras de câncer cervical e 228 pacientes saudáveis, todas provenientes da África do Sul, através da técnica de

ARMS-PCR, não encontrou associação entre o polimorfismo (G-308A) do gene TNF- α e o risco para o desenvolvimento do tumor.

Em outra análise, realizada por Wang et al. (2012), esse resultado controverso foi confirmado. O estudo foi realizado com três grupos de pacientes, sendo o primeiro constituído por 285 mulheres HR-HPV positivas e câncer cervical, o segundo grupo composto por 225 pacientes HR-HPV positivas, porém sem câncer cervical, e o terceiro grupo composto por mulheres saudáveis (HPV e câncer negativos). Os autores concluíram não haver associação entre o polimorfismo (G-308A) do gene TNF- α e a infecção por HPV, nem mesmo com o desenvolvimento do câncer uterino.

2.6 INTERLEUCINA – 10

A IL-10 é uma proteína homodimérica, com gene localizado no cromossomo um, peso molecular de 17 kDa, sem presença de carboidratos, sintetizada principalmente por queratinócitos, células dendríticas, células CD8+, principalmente por Th2, além disso, linfócitos B, Th1 e mastócitos também podem se tornar fontes desta citocina, contudo, com menor intensidade (MILLER; JOHNSTONE, 2001). IL-10 é uma das principais moduladoras negativas na expressão de outras citocinas e na atividade funcional de macrófagos. Somado a isso, esta citocina inibe a expressão de outras proteínas pró-inflamatórias, agindo como uma atenuante do processo inflamatório, e das metaloproteinases da matriz extracelular (MILLER; JOHNSTONE, 2001).

Entre os principais efeitos biológicos da IL-10 destacamos a inibição na síntese de várias citocinas: IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, LIF, PAF, TFA, PGE2 e TNF- α , mediados pelo seu receptor de membrana (IL-10R) (MOORE et al., 2001). O resultado desse efeito supressor é visto na diminuição da secreção de citocinas Th1 e aumento secretor das células Th2, além da capacidade de se autorregular (YAMAOKA et al., 1999). Somados a esses efeitos, a IL-10 possui a capacidade de impedir a formação de Espécies Radicais de Oxigênio (EROs) e inibir a produção de TNFR1 e TNFR2, que podem diminuir os efeitos da TNF- α (GULLESTAD et al., 2002).

Monócitos e macrófagos são os alvos principais da IL-10. Esta molécula inibe a expressão do MCH de Classe II, em contrapartida, estimula expressão dos receptores de IgG em monócitos e macrófagos humanos, dessa forma, aumenta a capacidade fagocítica (SPITLLER et al., 1995).

Quanto às células dendríticas, estas apresentam a capacidade de ativar células T em repouso iniciando um processo inflamatório. O efeito inibidor da IL-10 sobre as células Th1 é realizado de forma indireta. Para isso, a IL-10 inibe a síntese de IL-12, cofator positivo para produção de células Th1 (MOCELLIN et al., 2001).

A IL-10 desempenha um papel exclusivamente anti-inflamatório e modulador no processo inflamatório, principalmente em condições crônicas, mecanismo antagônico ao efeito da TNF- α (BOLGER et al., 2002; DENYS et al., 2002; KAUR et al., 2006).

O principal fator na determinação dos níveis séricos da IL-10 é o perfil genético do indivíduo. Um estudo realizado por Stanckzuk et al. (2001) mostrou que 75% da expressão da

citocina é determinada geneticamente, sendo duas repetições dinucleotídicas de citosina e adenina e três SNPs. Somado ao perfil genético do paciente, acredita-se que a infecção por HPV-16 possa aumentar ainda mais o nível sérico da IL-10. Somado a isso, é sabido que mulheres portadoras de HPV-RH, especialmente o HPV-16, e que possuem IL-10GG (-1082) possuem uma grande chance no desenvolvimento e progressão das lesões cervicais para CC (FERNANDES et al., 2008).

Dentre os três polimorfismos presentes em sua estrutura, todos na região promotora do gene, -1082 (A/G), -819 (C/T) e -592 (C/T) destacamos a região (-1082), onde podemos encontrar a variação de A para G. Esse tipo de mutação influencia diretamente no aumento dos níveis séricos da proteína e pode estar relacionada com a propensão imunogenética ao câncer do colo uterino (CONCEIÇÃO, 2010).

Os polimorfismos da região promotora apresentam uma aplicabilidade na medicina clínica, haja vista que a presença/ausência de um alelo pode determinar baixos, intermediários, e altos níveis da citocina. Essa capacidade de variação em nível de expressão influencia diretamente na proteção/propensão à infecção pelo HPV e na proteção/susceptibilidade às lesões cervicais ou mesmo no desenvolvimento do câncer uterino (BIDWELL et al., 1999; HAUKIM et al., 2002).

Stanckzuk et al. (2001) mostraram que a maior parte das mulheres portadoras de câncer cervical possuíam o alelo G em homozigose tornando-as susceptíveis à neoplasia uterina. Somado a esta informação, foi visto que a menor parte das pacientes portadoras de câncer apresenta o alelo A quando comparado ao grupo controle.

Mulheres com lesões cervicais e ao mesmo tempo HPV-Positivas possuem altos índices de IL-10 quando comparadas às mulheres saudáveis e sem lesão uterina. Esta propensão pode ser explicada por uma imunossupressão local ocasionada pela inibição de antígenos, células T citotóxicas, e uma série de citocinas próinflamatórias. Desse modo, há uma facilitação na instalação do HPV e em toda cascata patológica desencadeada (GIANINI et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a relação entre os polimorfismos -1082 (A/G) do gene *IL-10* e -308 (G/A) do gene *TNF- α* com desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas e adenocarcinoma uterino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as frequências genotípicas e alélicas nos dois polimorfismos nos grupos analisados;
2. Associar os polimorfismos dos genes *IL-10* (rs1800896) e *TNF- α* (rs1800629) com a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças cervicais;
3. Verificar as relações das variáveis estudadas (comportamentais, reprodutivas e sexuais) juntamente com os polimorfismos *IL-10* (rs1800896) e *TNF- α* (rs1800629) na propensão às lesões escamosas e adenocarcinoma uterino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVES, B.L.M. (2013). HPV e câncer cervical. In: V curso de verão: pesquisa em oncologia. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. [online]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/brunna_alves_hpv_cancer.pdf > Acessado em 03 de janeiro de 2015.
- [2] BARBISAN, G.; PÉREZ, L. O.; CONTRERAS, A.; GOLIJOW, C. D. (2012). TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. *Tumor Biol.* 33:1549–1556. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0408-1>
- [3] BADARACCO, G.; VENUTI, A.; MORELLO, R.; MULLER, A.; MARCANTE, M. L. (2000). Human papillomavirus in headand neck carcinomas: prevalence, physical and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Research*, 20 (2B):1301-1305.
- [4] BARKER, J. N. W. N.; GRIFFITHS, C. E. M.; NICKOLOFF, B. J.; MITRA, R. S.; DIXIT, V. M.; NICKOLOFF, B. J. (1991). Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*, 337: 211-214. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92168-2](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(91)92168-2)
- [5] BALKWILL, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 9: 361-371. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nrc2628>
- [6] BERNARD, H. U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of clinical virology*, 32S: S1-S6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>
- [7] BERNARDINO, L.; AGASSE, F.; SILVA, B.; FERREIRA, R.; GRADE, S.; MALVA, J.O. (2008). Tumor necrosis factor- α modulates survival, proliferation, and neural differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. *Stem Cells*, 26: 2361-2371. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2007-0914>
- [8] BIDWELL, J. L.; WOOD, N. A. P.; MORSE, H. R.; OLOMOLAIYE, O. O.; KEEN, L.J.; LAUNDY, G.J. (1999). Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement. *European Journal of Immunogenetics*. 26: 135-223. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2370.1999.00133.x>
- [9] BOLGER, A. P.; SHARMA, R.; Von HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; OLIVER, B.; RAUCHAUS, M.; COATS, A. J.; ADCOCK, I. M.; ANKER, S. D (2002). Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factoralpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*, 90(4):384-389. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02494-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02494-3)
- [10] BORGES, T. M. (2008). Imunologia da infecção pelo HPV. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais.

- [11] BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, M.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, A. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 87: 796-902. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/87.11.796>
- [12] BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. 1. (2010). Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) [Online]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2010/matriz.htm> > Acessado em 27 de dezembro de 2014.
- [13] BRENNAN, S.M.F.; SYRJÄNEN, K.J.(2003). Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Medical Journal*, 121(3):128 -132. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-31802003000300009>
- [14] BURD, M. E. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology*, 16: 1-17. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>
- [15] CAMPANER, A. B.; GALVÃO, M. A. L.; SANTOS, R. E.; AOKI, T. (2007). Células glandulares atípicas em esfregaços cervicovaginais: significância e aspectos atuais. *J Bras Patol Med Lab*, 43:37-43. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442007000100008>
- [16] CANNIZZARO, L. A.; DURST, M.; MENDEZ, M. J.; HECHT, B. K.; HECHT, F. (1988). Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. *Cancer Genet. Cytogenet*, 33: 93-98.
- [17] CARNEIRO, T. E.; MARINHO, S. A.; VERLI, F. D.; MESQUITA, A. T.; LIMA, N. L.; MIRANDA, J. L. (2009). Oral squamous papiloma: clinical, histologic and immunohistochemical analysis. *Journal of Oral Science*, 51(3):367-372. <http://dx.doi.org/10.2334/josnusd.51.367>
- [18] CARVALHO, C.R.N.; CAMPANER, A.B. (2005). Conduta frente aos achados anormais da endocérvice, nas lesões glandulares e no adenocarcinoma in situ. In: Martins, N.V.; Ribalta, J.C.L. *Patologia do trato genital inferior*. 1ª ed: 707-713.
- [19] CASTELLSAGUÉ, X.; DIAZ, M.; DE SANJOSÉ, S.; MUÑOZ, N.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S.; et al. (2006). Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*, 98:303-315. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djj067>
- [20] CASTLE, P.E.; FETTERMAN, B.; POITRAS, N.; LOREY, T.; SHABER, R.; KINNEY, W. (2010). Relationship of atypical glandular cell cytology, age, and human papillomavirus detection to cervical and endometrial cancer risks. *Obstet Gynecol*, 115:243-248 <http://dx.doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181c799a3>
- [21] CLARK, I. A. (2007). How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18:335-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.04.002>

- [22] CLIFFORD, G. M. et al. (2003). Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 89(1):101-105. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601024>
- [23] CONCEIÇÃO, E.L. (2010). Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-1 β dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG. Dissertação. Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências.
- [24] CRISH, J.F.; BONE, F.; BALASUBRAMANIAN, S.; ZAIM, T. M.; WAGNER, T.; YUN, J.; RORKE, E. A.; ECHERT, R. L. (2000). Suprabasal of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins. *Carcinogenesis*. 21(5):1031-1037. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/21.5.1031>
- [25] CROOK, T.; MORGENSTERN, J.P.; CRAWFORD, L; BANKS, L. (1989). Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus ES-ras. *The EMBO Journal*. 8(2):513-519.
- [26] DENYS, A. UDALOVA, I. A.; SMITH, C.; WILLIAMS, L. M.; CIESIELSKI, C. J.; CAMPBELL J.; ANDREWS, C.; KWAITKOWSKI, D.; FOXWELL, B. M. (2002). Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF- α production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF- κ B in primary human macrophages. *J Immunol*. 168(10):4837-4845. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.4837>
- [27] DESHPANDE, A.; NOLAN, J. P.; WHITE, P. S.; VALDEZ, Y. E.; HUNT, W. C.; PEYTON, C. L.; WHEELER, C. M. (2005). TNF- α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16-Associated Cervical Cancer. *J Infect Dis*. 191(6):969-976. <http://dx.doi.org/10.1086/427826>
- [28] DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. (2004): Classification of Papilloma viruses. *Virology*. 324 (1):17-27.
- [29] DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R.; PINTO, D.; MATOS, A.; et al. (2005). G-308A TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 334(2):588-592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.137>
- [30] EGAN, L.J.; WILLIAM, J. S. (2004). Advances in the treatment of Crohn's disease. *Enc. of Gast*.534-537. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.062>
- [31] EL-GHOBASHY, A. A.; SHAABAN, A.M.; HEROD, J.; HERRINGTON, C.S. (2005). The pathology and management of endocervical glandular neoplasia. *Int Gynecol Cancer*. 15:583-92.

- [32] FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A. G.; WOOD, N. H.; LEMMER, J. (2009). Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infections Agents Cancer*. 4:16. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-9378-4-16>
- [33] FEHRMANN, F; KLUMPP, D. J; LAIMINS, L. A. (2003). Human Papillomavirus Type 31 E5 Protein supports Cell Cycle Progression and Activates Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation. *Journal of Virology*. 77(5): 2819-2831. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.5.2819-2831.2003>
- [34] FERNANDES, A.P.; GONÇALVES, M.A.; SIMÕES, R.T.; MENDES-JUNIOR, C.T.; DUARTE, G.; DONADI, E.A. (2008). A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 140(2):241-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.04.007>
- [35] FERNANDES, R.A.Q.; NARCHI, N.Z. (2007). *Enfermagem e Saúde da Mulher*. Edição brasileira. Barueri, SP.
- [36] FORTE, W.N. (2004). *Imunologia: básica e aplicada*. Porto Alegre. Artmed.147 p.
- [37] GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. (2009). Human Papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of Biosciences*. Bangalore, India. 34 (1):113-123.
- [38] GIANNINI, S.L.; HUBERT, P.; DOYEN, J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. (2002). Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *International Journal of Cancer*.97(5):654-659. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10084>
- [39] GLOBOCAN. (2015). Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Online. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp> > Acessado em 25 de novembro de 2014.
- [40] GOVAN, V. A.; CONSTANT, D.; HOFFMAN, M.; WILLIAMSON, A. L. (2006). The allelic distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer*. 6: 24.
- [41] GRM, H. S.; BERGANT, M.; BANKS, L. (2009). Human papillomavirus infection cancer & therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 130(3):227-285.
- [42] GULLESTAD, L.; SEMB, A. G.; HOLT, E.; SKÄRDAL, R.; UELAND, T.; YNDESTAD, A.; FRØLAND, S. S.; AUKRUST, P. (2002). Effect of thalidomide in patients with chronic heart failure. *Am Heart J*. 144(5): 847-850.
- [43] HAMMOUD, M.M.; HAEFNER, H.K.; MICHEL, C.W.; ANSBACHER, R. (2002). Atypical glandular cells of undetermined significance. Histologic findings and proposed management. *J Reprod Med*. 47:266-270.

- [44] HAUKIM, N.; BIDWELL, J.L.; SMITH, A.J.; KEEN, L. J.; GALLAGHER, G.; KIMBERLY, R.; et al. (2002). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity*. 3(6):313-330. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6363881>
- [45] HERZOG, T.J.; MONK, B.J. (2007). Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 197(6):566-571. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2007.08.055>
- [46] HORRY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P.; WU, T. C. (2008). Molecular epidemiology of human papillomavirus. *Journal of the Formosan Medical Association*. 107(3):198-217. [http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646\(08\)60138-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646(08)60138-2)
- [47] HOSTETLER, K. Y. et al. (2007). DNA vaccines for cervical cancer from bench to bedside. *Experimental and Molecular medicine*. 39(6):679-689.
- [48] IARC. Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer. (2014). Online. Disponível em: < <http://www-dep.iarc.fr/> > Acessado em 15 de outubro de 2014.
- [49] IGANSI, C. N. (2009). Associação entre polimorfismos de genes do sistema imunológico (IL-10, TNF- α) e infecção por HPV nos diferentes graus de lesões cervicais. Tese. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Epidemiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- [50] INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil. 2014. Ministério da Saúde.
- [51] KASSARDJIAN, A.; KREYDIYYEH, S. I. (2008). JNK modulates the effect of caspases and NF- κ B in the TNF- α -induced down-regulation of Na⁺/K⁺ ATPase in HepG2 cells. *J. Cell. Physiol*. 216: 615-620. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21436>
- [52] KAUR, K.; SHARMA, A.K.; DHINGRA, S.; SINGRA, P.K. (2006). Interplay of TNF- α and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 41(6):1023-1030. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.08.005>
- [53] KISSELJOV, F. L. (2000). Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry, Rússia*. 65(1): 68-77.
- [54] KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (2005): *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*, Elsevier, 7a. Ed., Rio de Janeiro, Cap 7: 281-356.
- [55] LEITE, C. A.; ACAY, R. R.; RECHE, P. M.; SILVA, O. G.; SOUSA, S. O. M. (2008). Detecção do papilomavírus humano com lesões verrucosas orais por meio da técnica de hibridização in situ. *Revista Gaúcha de Odontologia*. 56(3): 237–243.
- [56] MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol*. 79(6):647-664. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>

- [57] MALEJCZYK, J.; MALEJCZYK, M.; MAJEWSKI, S.; ORTH, G.; JABLONSKA, S.. (1993). NK-cell activity in patients with HPV16-associated anogenital tumors: defective recognition of HPV16-harboring keratinocytes and restricted unresponsiveness to immunostimulatory cytokines. *Int. J. Cancer*. 54:917–921.
- [58] MARCK, V. E.; DE VIEYST, H.; STEYAERT, S. (2003). Distribution of Human Papillomavirus in a Family Planning Population in Nairobi, Kenya. *Sexually Transmitted Diseases*. 30(2):137-142.
- [59] MARGARET, E.; MCLAUGHLIN-DRUBIN.; MÜNGER, K. (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research, Amsterdam*. 143:195-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008>
- [60] MCCLUGGAGE, W. G. (2003). Endocervical glandular lesions: controversial aspects and ancillary techniques. *J Clin Pathol*. 56: 164-173. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.3.164>
- [61] MICHELLE, S. L.; LAIMINS, A. L. (2004). Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology*. 68(2):362-372. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>
- [62] MILLER, C. S.; JOHNSTONE, B. M. (2001). Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 91(6):622-635. <http://dx.doi.org/10.1067/moe.2001.115392>
- [63] MOCELLIN, S.; PANELLI, M. C.; WANG, E.; NAGORSEN, D.; MARINCOLA, F. M. (2003). The dual role of IL10. *Trends Immunol*. 24(1):36-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)00009-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(02)00009-1)
- [64] MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 19(1): 683-765. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- [65] MOORE, R. J.; OWENS, D. M.; STAMP, G.; ARNOTT, C.; BURKE, F.; EAST, N.; et al. (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*. 5(7):828-831. Erratum in: *Nat Med* 1999 Sep; 5(9):1087. <http://dx.doi.org/10.1038/10552>
- [66] MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. Kidlington. 24(3):S1 – S10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
- [67] NAKAGAWA, J. T. T.; SHIRMER, J.; BARBIERI, M. (2010). Vírus HPV y cancer del cuello uterino. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 63(2):307-311. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672010000200021>
- [68] NORONHA, V.L. et al. (1999). Fatores de risco para câncer em lesões da cérvix uterina. *Revista Paraense de Medicina*.13:18- 24.

- [69] OH, B. R.; SASAKI, M.; PERINCHERY, G.; RYU, S. B.; PARK, Y. I.; CARROLL, P.; DAHIYA, R. (2000). Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer. *J Urol.* 163(5): 1584-1587. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67683-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67683-5)
- [70] PENN, I. (1986). Cancers of the anogenital regions in renal transplant recipients. Analysis of 65 cases. *Cancer.* 58: 611-616.
- [71] PINHEIRO, P. MD.Saúde. Exame Papanicolau – AUSCUS, LSIL, NIC1, NIC 2 e NIC3. 2014. Online. Disponível em: < <http://www.mdsaude.com/2014/09/exame-papanicolau.html> > Acessado em 04 de janeiro de 2015.
- [72] PSYRRI, A.; DIMAIO, D. (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature Clinical Practice Oncology.* 5(1):24 – 31. <http://dx.doi.org/10.1038/ncponc0984>
- [73] POPA, C.; NETEA, M. G.; VAN RIEL, P. L.; VAN DER MEER, J. W.; STALENHOF, A. F. (2007). The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid. Res.*48: 751-762. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R600021-JLR200>
- [74] RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V.; SILVA, I. S. B. (2001). Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 47(2):179-184.
- [75] SANTANA, E. A.; BISELLI, P. M.; BISELLI, J. M.; ALMEIDA, M. T. G.; BERTELLI, E. C. P. (2008). Câncer cervical: etiologia, diagnóstico e prevenção. C.P. Bertelli. *Arquivos de Ciências da Saúde.* 15(4): 199-204.
- [76] SASAKI, M.; NAKAJIMA, K.; PERINCHERY, G.; FUJINO, T.; OH, B. R.; FUJIMOTO, S.; et al. (2000). Frequent genotype changes at -308 of the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human uterine endometrial cancer. *Oncol Rep.* 7(2): 369-73. <http://dx.doi.org/10.3892/or.7.2.369>
- [77] SCHIFFMAN, M. H.; BURK, R.D. (1997). Human papillomaviruses In EVANS, A.S.; KASLOW, R.A. *Viral infections of humans. Epidemiology and control.* 4a ed. Nova Iorque: Plenum Medical Book Company.
- [78] SILLMAN, F.; STANEK, A.; SEDLIS, A. ROSENTHAL, J.; LANKS, K. W.; BUCHHAGEN, D.; NICASTRI, A.; BOYCE, J. (1984). The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosupressed women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150: 300-308.
- [79] SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. (2003). O papel do papiloma vírus humano no câncer. *HPV e Câncer - Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 29: 48-54.
- [80] SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G. M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer.* 121,621–632. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22527>

- [81] SMITH, E. M.; SUMMERSGILL, K. F.; ALLEN, J.; HOFFMAN, H. T.; MCCULLOCH, T.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. (2000). Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*. 109(11): 1069-1076.
- [82] SMITH, H. O.; TIFFANY, M. F.; QUALLS, C. R.; KEY, C. R. (2000). The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States: a 24-year population based study. *Gynecol Oncol*. 78: 97-105. <http://dx.doi.org/10.1006/gyno.2000.5826>
- [83] SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. (2005). Papilomavirus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Rev.Bras.de Cancerologia*. 51(2): 155-160.
- [84] SPITTLER, A.; SCHILLER, C.; WILHEIM, M.; TEMPFER, C.; WINKLER, S.; BOLTZ-NITULESCU, G. (1995). IL10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4 driven CD23 expression on cultured human blood 48 monocytes: effects of IL10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology*. 85(2): 311-317.
- [85] STANCZUK, G. A.; SIBANDA, E. N.; PERREY, C.; CHIRARA, M.; PRAVICA, V.; Hutchinson, I. V.; Tswana, S. A. (2001). Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL10 production. *International Journal of Cancer*. 94(6): 792-794. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.1543>
- [86] STEVENS, L.M. (2002). Papillomavirus. *The Journal of the American Medical Association*. 287(18): 2452. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.287.18.2452>.
- [87] SYRJANEN, K. (2004). Is improved detection of adenocarcinoma in situ by screening a key to reducing the incidence of cervical adenocarcinoma? *Acta Cytol*. 48:591-594.
- [88] TAWFIK, EL-AMNSI. M.; CUSCHIERI, K. S.; MORRIS, R. G.; WILLIAMS, A. R.. (2006): Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma and its precursors in Scottish patients. *Int J Gynecol Cancer*. 16: 1025-1031.
- [89] TCHERNEV, G. (2009). Sexually transmitted papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, clinic, morphology, important differential diagnostic aspects, current diagnostic and treatment option. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 84(4):377-389. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962009000400009>
- [90] THULER, L. C. S. (2008). Mortalidade por cancer do colo do útero no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 30(5): 216-218.
- [91] TYRING, S. K. (2000). Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 43(1): 18-26.
- [92] VARNAL, A. D.; BOLLMANN, M.; BANKFALVI, A.; KOVACS, K.; HELLER, H.; SCHMITT, C.; VOLEK, J.; SZENDY, M.; BOLLMANN, R.; HILDENBRAND, R. (2009). The prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in oral epithelial hyperplasia: proposal of a concept. *Journal of Oral Pathology & Medicine, Germany*. 38(2):181-187. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00723.x>

- [93] VERDIANI, L. A.; DERCHAIN, S. F. M.; SCHWELLER, M.; GONTIJO, R. C.; ANGELO-ANDRADE, L. A.; ZEFERINO, L. C. (2003). Atypical glandular cells in cervical smear: analysis of diagnostic methods. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 25:193-200. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032003000300008>
- [94] YAMADA, T.; MANOS, M. M.; PETO, J.; GREER, C. E.; MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; WHEELER, C.M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology.* 71(3): 2463-2472.
- [95] YAMAOKA, M.; YAMAGUCHI, S.; OKUYAMA, M.; TOMOIKE, H. (1999). Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure: behavior of interleukin-10 in association with tumor necrosis factor-alpha. *Jpn Circ J.* 63(12): 951-956. <http://dx.doi.org/10.1253/jcj.63.951>
- [96] YIN, Y.; CHEN, X.; SHU, Y. (2009). Gene expression of the invasive phenotype of TNFalpha- treated MCF-7 cells. *Biomed. Pharmacother.* 63: 421-428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2009.04.032>
- [97] WANG, N.; YIN, D.; ZHANG, S.; WEI, H.; WANG, S.; ZHANG, Y.; LU, Y.; DAI, S.; LI, W.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y. (2012). TNF-Alpha rs1800629 Polymorphism Is Not Associated with HPV Infection or Cervical Cancer in the Chinese Population. *PLOS ONE.* 7(9): 1-5.
- [98] WESTIN, M. C. A. (2009). Células glandulares atípicas e adenocarcinoma “in situ” de acordo com a classificação de Bethesda 2001: Associação cito-histológica [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
- [99] WHO, World Health Organization. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Online. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp> >
- [100] ZAINO, R. J. (2000). Glandular lesions of the uterine cervix. *Mod Pathol.* 13:261-274.
- [101] ZIDI, S.; BENOETHMEN, .; SGHAIER, I.; GUAZOUENI, E.; MEZLINI, A.; SLIMEN, B.; YACOUBI-LOUESLATI, B. (2014). Association of IL10-1082 and IFN- γ +874 Polymorphisms with Cervical Cancer among Tunisian Women. *ISRN Genetics.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/706516>
- [102] ZHAO, C.; AUSTIN, R. M.; PAN, J.; BARR, N.; MARTIN, S. E.; RAZA, A.; COOB, C. (2009). Clinical significance of atypical glandular cells in conventional pap smears in a large, high-risk U.S. West Coast minority population. *Gynecol Cytopathol.* 53: 154-159.

**Artigo submetido ao periódico “Molecular Biology Reports”. ISSN: 0301-4851.
Área de avaliação: Medicina Veterinária
Estrato: A2**

1 Polymorphisms in *TNF-α* and *IL-10* genes in women with cervical disease in Pernambuco,
2 Brazil.

3 Alex Paulino da Silva^{1,2}, Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos^{1,2}, Telma Maria Lubambo
4 Costa^{4,5}, Alex Sandro Rolland de Souza^{4,5}, Maria de Mascena Diniz Maia¹, Sérgio Crovella⁶,
5 Paulo Roberto Eleutério de Souza^{1,2,3}.

6

7 ¹ Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife -PE,
8 Brazil.

9 ² Graduate Program in Science Tropical Animal, Rural Federal University of Pernambuco.

10 ³ Graduate Program in Cellular and Molecular Biology Applied, University of Pernambuco.

11 ⁴ Postgraduate Program in Mother and Child Health - Integrative Medicine Institute Prof.
12 Fernando Figueira (IMIP)

13 ⁵ Institute of Integral Medicine Prof. Fernando Figueira (IMIP).

14 ⁶ Graduate Program in Genetics, Federal University of Pernambuco.

15

16 Disclosure statement: The authors claim no conflicts of interest.

17 Financial support: CNPq and FACEPE.

18 Corresponding Author: Paulo Roberto Eleutério de Souza

19 Address: Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900 Recife, PE,
20 Brazil. Phone: (+55) 81-33206073/ 81-97318391.

21 E-mail: paulo.souza@db.ufrpe.br (P.R.E. Souza).

22

23

24

25

26

27

1 **ABSTRACT**

2 **Background.** Susceptibility to infectious diseases is associated with the profile of genes
3 involved in the immune response to infection. **Objective:** This study aims at investigating
4 whether the polymorphisms at promoters regions of *IL-10* -1082 (A> G, rs1800896) and *TNF-*
5 α (-308 G>A, rs1800629) genes, were associated with susceptibility to HPV
6 infection/progression to cervical dysplasia and adenocarcinoma. **Materials and Methods:**
7 The study population consisted of 240 women infected with HPV (72 with adenocarcinoma and
8 168 with cervical intraepithelial lesion) and 169 healthy control women. *IL10* -1082 (A> G)
9 and *TNF- α* -308 (G> A) polymorphisms were analyzed by ARMS-PCR. **Results:** There was
10 significant increase in the frequency of *IL10* -1082G allele in both cervical dysplasia (OR =
11 1.39; P = 0.0372) and adenocarcinoma patients (OR = 2.19; P = 0.0002). The same was
12 observed concerning individuals with GG genotype (OR = 2.17, P = 0.047 and OR = 3.8; P =
13 0.0029, respectively). For *TNF- α* -308 polymorphism, there was no association of the allele or
14 genotype frequencies in relation to cervical disease (P> 0.05). On the other hand, there were
15 susceptibility in relation to risk factors such as age> 35 years (OR = 2.57; p = 0.0057), age of
16 first sexual intercourse 1st <18 years (OR = 6.6224, p <0.0001), smoking (OR = 3.80; P =
17 0.0003), African origin (OR = 5.18, p <0.0001) and co-infection by *Chlamydia trachomatis*
18 (OR = 2.41; P = 0.0315). **Conclusion:** Our findings suggest that polymorphisms in the *IL-10*
19 and *TNF- α* genes may play a role in susceptibility or severity of cervical disease in the study
20 population.

21 **Keywords:** Tumor Necrosis Factor alpha, Interleukin 10, Glandular cervical lesions,
22 Adenocarcinoma, HPV.

23

24

25

26

27

28

1 INTRODUCTION

2 Despite the infection by one of the types of human papillomavirus of high oncogenic
3 risk (HR-HPV) is the main cause of cervical cancer and its precursor lesions (Cervical
4 Neoplasms Intraepitelais NIC) (Ferlay *et al.*, 2010; Moscicki *et al.*, 2006; de Villiers *et al.*,
5 2004; Bosch *et al.*, 2002; Walboomers *et al.*, 1999), the presence of other cofactors plays an
6 important role in the viral etiology, such as: alcoholism, multiple partners, multiparous, use of
7 oral contraceptives, age, co-infections with other types of pathogens [Human
8 Immunodeficiency Virus (HIV), Herpes Simplex Virus (HSV), *Chlamydia trachomatis* (CT)]
9 and also one should take into consideration the genetic factors of the host (Moscicki *et al.*,
10 2006; Franceschi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001; IARC, 1995). The type and quality of the
11 immune response are factors that create an enabling environment for viral replication, and
12 individuals with impaired cellular immune response have a high prevalence of cervical lesions
13 induced by HPV (Stanley, 2006; Konya & Dillner, 2001; Womack *et al.*, 2000).

14 Interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) are two
15 multifunctional cytokine involved in the immune response of the host. IL-10 is an anti-
16 inflammatory cytokine excreted by a variety of cells and has dual activity on immune
17 response and suppresses the cellular immune response (Th-1), and stimulates the humoral
18 immune response (Th-2) (Mege *et al.*, 2006). Patients with severe squamous intraepithelial
19 lesions (SIL) has been found with the level of IL-10 expression increased (El-Sherif *et al.*,
20 2001; Jacobs *et al.*, 1998;. Kim *et al.*, 1995). The TNF- α is a pro-inflammatory cytokine
21 secreted mainly by macrophages, and has a key role in inflammation, immune homeostasis
22 and host defense. Furthermore, increases expression of adhesion molecules and activation of
23 neutrophils, stimulates the production of cytokines, and acts as a T cell costimulatory
24 activation and antibody production (Wajant, 2009; Elahi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2003). The
25 TNF- α is involved in the defense against HPV infection, modulating viral replication (zur
26 Hausen, 2000).

27 Polymorphisms in genes related with the immune response, such as *IL-10* and *TNF- α*
28 genes may be involved in the etiology of cervical disease (Berrington *et al.*, 2004). Several
29 polymorphisms have been described to *IL-10* gene, in particular three in the promoter region
30 (-1082 A/G -819 T/C and - 592 A/C) may influence the transcriptional level of mRNA and
31 protein expression *in vitro* and consequently their role in cancer (Turner *et al.*, 1997).

1 However, regardless of the position of the other polymorphic sites in relation to *IL-10* gene,
2 individuals who had the -1082 AA genotype were associated with low production, -1082 GA
3 with middle and -1082GG with high production of *IL-10* protein *in vivo* and *in vitro* studies
4 (Hutchinson *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1997).

5 *TNF- α* also has several gene polymorphisms located in its promoter region: -1031
6 (T/C), -863 (C/A), -857 (C/T), -308 (G/A), -238 (G/A), -1196 (C/T), -1125 (G/C), -572 (A/C),
7 -316 (G/A), -163 (G/A) e -70 (G/A). However, single nucleotide polymorphisms (SNP)
8 located at position -308 (G> A) of *TNF- α* gene causes variation in the serum concentration of
9 the protein encoded by the gene. The *TNF- α* -308 GG genotype was associated with low
10 protein production, while -308 AA and -308 AG genotypes were associated with middle and
11 high protein production, respectively (Fernandes *et al.*, 2008).

12 In relation to cervical lesions, the presence of the *TNF- α* -308 GG genotype has been
13 associated with the induction of cervical squamous cervical intraepithelial lesions (SCIL),
14 whereas the presence of *TNF- α* -308AG and *TNF- α* -308AA genotypes were associated with
15 the progression to cervical lesions and even in the formation of invasive cervical cancer
16 (ICC), however their results were contradictory (Wang, 2012; Fernandes *et al.*, 2008; Duarte
17 *et al.*, 2005, Deshpande *et al.*, 2005; Stanczuk *et al.*, 2003; Calhoun *et al.*, 2002).

18 Despite of *IL-10* -1082 (A/G) and *TNF- α* -308 G/A polymorphisms have been studied
19 on the susceptibility to many infectious diseases, functional importance about these
20 polymorphisms is still clarified. Therefore, this research aimed to investigate the possible
21 association among *IL-10* -1082 (rs1800896) and *TNF- α* -308 (rs1800629) gene
22 polymorphisms and the susceptibility to cervical intraepithelial lesions as well as for
23 adenocarcinoma in a population from Northeast of Brazil.

24 **METHODOLOGY**

25 **Design and study site**

26 A cross-sectional study was performed aimed at analyzing *IL-10* and *TNF- α* genes
27 polymorphisms in women with squamous cervical intraepithelial lesion (SCIL) and cervical
28 adenocarcinoma. Women were recruited at the Lower Genital Tract Pathology Clinic at

1 Women's Healthcare Center of the Prof. Fernando Figueira Institute of Integrated Medicine
2 between January 2008 to April 2010.

3 The laboratorial analyses were conducted at the Laboratory of Genetics, Biochemistry
4 and DNA sequencing Professor Tânia Falcão of the Universidade Federal Rural de
5 Pernambuco. The local Ethics Committee for Research (n° 3326/13) approved the study and
6 all patients and controls agreed to participate, signing the Terms of Free and Informed
7 Consent.

8 **Patients and Controls**

9 The study population consisted of 3 groups: group 1: 96 women with cervical lesions
10 and HPV-positive; Group 2: 72 women with cervical adenocarcinoma and positive HPV;
11 Group 3: 169 healthy control women, HPV negative. The samples of this study were selected
12 from a DNA bank originated from cervical smears of women aged 16 to 75 years assisted by
13 spontaneous demand in the Central Public Health Laboratory of Pernambuco (LACEN) and
14 Integrative Medicine Institute Professor Fernando Figueira (IMIP), from January 2008 to
15 April 2010. As regards the samples of Group 2, were included in this group women between
16 31 and 76 years of age with histopathological diagnosis of adenocarcinoma in situ and
17 invasive cervical the uterus, identified in the file Cervical Pathology Service of the CAM-
18 IMIP, in the period between 2001 and 2014. The study excluded women who had undergone
19 treatment for the cervix or diagnosed with HIV and patients with adenocarcinoma not
20 included paraffin blocks nail biopsy or surgical piece. For the healthy control group were
21 excluded women who had the cytology diagnosed with atypical cells and colposcopy with
22 abnormal colposcopic findings or suggestive of invasion and positive for HPV infection. For
23 all groups, information was collected from medical records of patients in relation to biologic
24 factors, sociodemographic, reproductive, and lifestyle habits.

25 ***IL-10* and *TNF-α* genes polymorphisms analysis**

26 The presence of polymorphisms in the promoter regions of *IL-10* -1082 (G> A) and
27 *TNF-α* -308 (G> A) genes were analyzed by sequence specific PCR technique (PCR-SSP).
28 The analyzes of *IL-10* -1082 (rs1800896) polymorphism gene were performed as described by
29 Crilly *et al.* (2003) while *TNF-α* -308 (rs1800629) polymorphism gene was performed as

1 described by Perrey *et al.* (1999). The sequences of the primers used for both regions are
2 shown in Table 1.

3 The amplification reactions for analysis of both polymorphic sites were made to a final
4 volume of 15 μ l. The reaction mixture contained approximately 50 ng of DNA vaginal
5 secretions, 1X Platinum Taq Buffer (Invitrogen Life Technologies), 200 μ M dNTPs, 2.5 mM
6 MgCl₂, 1U Taq DNA Platinum DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) and 1 μ M
7 of each primer (common and specific allele). The cycling conditions used were the same as
8 previously described in the literature cited above.

9 **Statistical analysis**

10 Statistical analysis was performed using the BioEstat 5.0 software. The study was
11 cross-sectional with independent samples consisting of nominal data (genotype). The
12 influence of each polymorphism on the risk for development of (pre) neoplastic cervical
13 disease was estimated by odds ratio (OR) using a confidence interval of 95% for the
14 parameters.

15 Allele frequencies were estimated by direct gene counting. The prevalence of different
16 genotypes in patients and controls was analyzed by the χ^2 test and by the Fisher exact test in
17 contingency tables. P-value under or equal to 0.05 were considered statistically significant.

18

1 **Results**

2 Tables 2 and 3 show the distribution of allelic and genotypic frequencies of *IL-10* -
3 1082 A> G and *TNF-α* -308 G> A genes polymorphisms, between cases and healthy control
4 groups. Individuals with *IL-10* -1082GG genotype and *IL-10* -1082 G allele were significantly
5 associated with risk to cervical lesions increased [OR = 2.17, p = 0.047; OR = 1.39, p = 0.037,
6 respectively], as well as to development of adenocarcinoma [OR = 3.8; p = 0.0029; OR =
7 2.19, p = 0.0002]. However, no significant difference in the frequencies allelic and genotypic
8 distribution were observed relation to *TNF-α* -308 G>A gene polymorphism, when compared
9 with SCIL (p> 0.05) and adenocarcinoma (p> 0.05) (Table 3).

10 In the Tables 3 and 4, we related clinical features, sociodemographic, reproductive and
11 habits from patients selected with the two polymorphisms analyzed. Seven risk factors (age>
12 35anos, age at first sexual intercourse 1st <18 years in pregnancies> 3, use of OCP, smoker,
13 African origin, and coinfection with CT) were evaluated with relation to risk of development
14 for both cervical lesions and adenocarcinoma and it was compared with *IL-10* -1082 A>G and
15 *TNF-α* -308 G>A genes polymorphisms (Table 4 and 5, respectively). Of all the analyzed
16 cofactors, only patients with aged over 35 years were associated with *IL-10* -1082 A> G gene
17 polymorphism (Table 4). Regarding the *TNF-α* -308 G> A gene polymorphism, significant
18 differences were observed with respect to age> 35 years (OR = 2.57, p = 0.0057), 1st first
19 sexual intercourse <18 (OR = 6, 62; p <0.0001), smoking (OR = 3.80; p = 0.0003), use of
20 OCP (OR = 14.17; p <0.0001), and *Chlamydia trachomatis* by coinfection (OR = 2.41; p =
21 0.0315) (Table 5). On the other hand, no significant difference was observed among the
22 cofactors and the presence of adenocarcinoma for both the polymorphisms analyzed in this
23 study (p> 0.05).

24 **Discussion**

25 In this study, we evaluated the distribution of genotype and allele frequencies for both
26 rs1800896 and rs1800629 polymorphisms with the susceptibility for cervical lesions and
27 development of adenocarcinoma. Our findings suggest that the presence of variants GG and
28 GA genotype as well as G allele in the promoter region of the *IL-10* (rs1800896) gene
29 influence both the developing cervical lesions and adenocarcinoma. Matsumoto *et al.* (2010)
30 studying a Japanese population found association among high production genotypes (GA and

1 GG) of IL-10 and the degree severity of cervical disease. These findings can be explained by
2 the increase in the transcriptional activity of mRNA and once IL-10 is a cytokine produced by
3 Th-2 cells and possesses immunosuppressive and antiangiogenic activities, it may lead to an
4 increased susceptibility for both cervical lesions and adenocarcinoma.

5 Since AA genotype was associated with decreased serum levels of protein in some
6 studies involving different types of cancers (like as cervical, prostate and breast cancer)
7 (McCarron *et al.*, 2002; Giordani *et al.*, 2003), it was considered as a biomarker for the
8 development of cervical lesions as well as progression for cervical cancer (Wang *et al.*, 2013;
9 Fernandes *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2007; Passmore *et al.*, 2007; Stanczuk *et al.*, 2001).

10 In relation to *TNF- α* -308 G/A gene polymorphism, it is known that the transcriptional
11 level of mRNA of the *TNF- α* protein increases from 6 to 9 times in vitro in the presence of
12 the transition from G to A, and may affect the susceptibility for various diseases (Kroeger *et al.*
13 *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997). However, literature data are still contradictory when related
14 with the susceptibility for cervical lesions and progression to cervical cancer. In this study, no
15 association was found among the *TNF- α* -308 G/A gene polymorphism and the susceptibility
16 to cervical lesions or development of adenocarcinoma ($p > 0.05$). Souza *et al.* (2005) studying
17 a Portuguese population also found no significant association with the development of pre-
18 invasive cervical lesions. However, in this same study they found that individual with -308A
19 allele and -308AA genotype had an increased risk for developing cervical cancer.

20 Kirkpatrick *et al.* (2004) found a significant association between individuals carriers of
21 GG genotype (low secretary) with the development of cervical intraepithelial lesion low
22 grade, but they did not found association with respect to the development of cervical cancer.
23 This last result was in agreement with other that also showed no association (Wang *et al.*,
24 2012; Stanczuk *et al.*, 2003; Govan *et al.*, 2006). On the other hand, in others studies this
25 polymorphism it was associated with the development of cervical cancer (Deshpande *et al.*,
26 2005; Azar *et al.*, 2004; Ivansson *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2009). Furthermore, a meta-
27 analysis performed by Liu *et al.* (2012) showed that individuals from African origin carrying
28 the -308 AA genotype had been protected against developing cervical cancer, but no
29 association in relation to Caucasian origin was observed. These discordant results were
30 explained by the possible difference in genetic background between the different populations
31 analyzed.

1 Regarding the socio-behavioral factors our results showed that *IL-10* gene
2 polymorphism was associated only with age above 35 years. On the other hand, when we
3 analyzed the *TNF- α* -308 polymorphism, individuals carrying of the GA and AA genotypes
4 were significantly associated with several risk factors, as age > 35 years, age at first
5 intercourse <18 anos, prolonged use of oral contraceptives (ACO), smoking, and presence of
6 co-infection with CT (p< 0,05). Duarte *et al.* (2011) found similar results and suggested that
7 these results could be explained due to HPV latency in the body, causing histological changes
8 in women older age. Bezerra *et al.* (2005) showed that the early age of first sexual intercourse
9 considering the malformation of the female reproductive system contributes directly to an
10 increase in the chance of developing cervical lesions. A study performed by Rose *et al.* (2009)
11 found that the use of ACO potentializes the onset of cervical lesions by about three times. In
12 this same study found an increased risk for women that more parities. Furthermore, Simonetti
13 *et al.* (2009) suggested in their study that the co-infection by CT can cause inflammatory
14 responses that damage the cervical mucosa, leading to lesions or even facilitate the HPV
15 infection.

16 **Conclusion**

17 In our study, we found association of rs1800896 and rs1800629 polymorphisms with
18 the predisposition to develop of cervical lesions and adenocarcinoma. In addition, the clinical
19 data of the patients also presented significant differences with the two polymorphisms
20 analyzed. Thus, our data suggest that *IL-10* and *TNF- α* gene can be used as molecular markers
21 in patients predisposed to the screening cervical disease.

22 **Acknowledgements**

23 We thank the patients and their families by collaboration and understanding to
24 achievement of this work. This research was financed by FACEPE (Foundation for Science
25 and Technology State of Pernambuco) and CNPq (National Council for Scientific and
26 Technological Development).

27 **Conflicts of interest**

28 The authors declare no conflicts of interest

29

1 References

- 2 (1) Azar, K. K., Tani, M., Yasuda, H., Sakai, A., Inoue, M., & Sasagawa, T. (2004).
3 Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in
4 cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol*, 35, 1376–1384.
5 <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2004.08.012>
6
- 7 (2) Berrington, D. G., Sweetland, S., & Green, J. (2004). Comparison of risk factors for
8 squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 90,
9 1787-1791. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22357>
10
- 11 (3) Bezerra, S. J. S., Gonçalves, P., Franco, E. S., & Pinheiro, A. K. B. (2005). Perfil de
12 mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para
13 câncer do colo uterino. *J Bras Doenças Sex Transm*, 17(2), 143-148. ISSN: 0103-0465.
14
- 15 (4) Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J., & Shah, K. V. (2002). The causal
16 relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55, 244-
17 265.
- 18 (5) Calhoun, E. S., McGovern, R. M., Janney, C. A., Cerhan, J. R., Iturria, S. J., Smith, D.
19 I., ...Persing, D. H.(2002) Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer. *Clin*
20 *Chem*, 48, 1218– 1224.
- 21 (6) Crilly, A., Hamilton, J., Clark, C. J., Jardine, A., & Madhok, R. (2003). Analysis of the
22 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis.
23 *Rheumatology (Oxford)*, 42(11), 1295-1298
24 <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keg420>.
25
- 26 (7) de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004).
27 Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17–27.
28 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
29
- 30 (8) Deshpande, A., Nolan, J. P., White, P. S., Valdez, Y. E., Hunt, W. C., Peyton, C. L., &
31 Wheeler, C. M. (2005). TNF- alpha promoter polymorphisms and susceptibility to
32 human papillomavirus 16- associated cervical cancer. *J Infect Dis*, 191(6), 969–976.
33 <http://dx.doi.org/10.1086/427826>
34
- 35 (9) Duarte, S. J. H., Matos, K. F., Oliveira, P. J. M., Matsumoto, A. H., Morita, L. H. M.
36 (2011). Fatores de risco para câncer cervical em mulheres assistidas por uma equipe de
37 saúde da família em Cuiabá, MT, Brasil. *Cienc. Enferm*, 17(1), 71-80.
38 <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95532011000100008>
39
- 40 (10) Duarte, I., Santos, A., Sousa, H., Catarino, R., Pinto, D., Matos, A., ... Medeiros, R.
41 (2005) G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of
42 invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 334 (2), 588-592.
43 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.137>
44
45

1 (11) Elahi, M. M., Asotra, K., Matata, B. M., & Mastana, S. S. (2009). Tumor
2 necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of
3 association with health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 163–172.
4 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.01.007>

5

6 (12) El-Sherif, A. M., Seth, R., Tighe, P. J., & Jenkins, D. (2001). Quantitative
7 analysis of IL-10 and IFN-g mRNA levels in normal cervix and human
8 papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol*, 195(2), 179– 185.
9 <http://dx.doi.org/10.1002/path.929>

10

11 (13) Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. Estimates
12 of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. (2010). *Int J Cancer*, 127,
13 2893-2917. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25516>

14

15 (14) Fernandes, A. P., Gonçalves, M. A., Simões, R. T., Mendes-Junior, C. T., Duarte, G.,
16 & Donadi, E. A. (2008) A pilot casecontrol association study of cytokine
17 polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV related cervical lesions. *Eur*
18 *J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 140(2), 241-244. [http://dx.doi.org/](http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.04.007)
19 [10.1016/j.ejogrb.2008.04.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.04.007)

20

21 (15) Franceschi, S., Rajkumar, T., Vaccarella, S., Gajalakshmi, V., Sharmila, A., Snijders,
22 P. J. F., ... Herrero R. Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in
23 Chennai, India: A case-control study. (2003). *Int J Cancer*, 107(1), 127-33
24 [http://dx.doi.org/ 10.1002/ijc.11350](http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11350)

25

26 (16) Giordani, L., Bruzzi, P., Lasalandra, C., Quaranta, M., Schittulli, F., Ragione, F. D.,
27 Iolascon, A. (2003). Association of Breast Cancer and Polymorphisms of Interleukin-
28 10 and Tumor Necrosis Factor- Genes. *Clinical Chemistry*, 49(10), 1664-1667.
29 <http://dx.doi.org/10.1373/49.10.1664>

30

31 (17) Govan, V. A., Constant, D., Hoffman, M., & Williamson, A. L. (2006). The allelic
32 distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African
33 women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer*, 6, 24.
34 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-6-24>

35

36 (18) Hutchinson, I. V., Pravica, V., Hajeer, A., & Sinnott, P. J. (1999). Identification of
37 high and low responders to allografts. *Rev Immunogenet*, 1:323–333.

38 (19) International Agency for Research on Cancer (IARC). (1995). Working Group on the
39 Evaluation of Carcinogenic risks to humans. IARC monographs on the evaluation of
40 carcinogenic risks to humans. 64, 409. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/>

- 1 (20)Ivansson, E. L., Juko-Pecirep, I., & Gyllensten, U. B. (2010) Interaction of
2 immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical
3 cancer. *Gynecol Oncol*, 116(3), 544–548.
4 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.10.084>
5
- 6 (21)Jacobs, N., Giannini, S. L., Doyen, J., Baptista, A., Moutschen, M., Boniver, J., &
7 Delvenne, P. (1998). Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women
8 with pre- neoplastic lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Immunol*, 111, 219–224.
- 9 (22)Kim, J., Modlin, R. L., Moy, R. L. Dubinett, S. M., Mchugh, T., Nickoloff, B. J., &
10 Uyemura, K. (1995). IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell
11 carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol*,
12 155, 2240–2247.
- 13 (23)Kirkpatrick, A., Bidwell, J., van den Brule, A. J., Meijer, C. J., Pawade, J., & Glew, S.
14 (2004). TNF alpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia.
15 *Gynecol Oncol*, 92(2), 675–679. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.11.025>
16
- 17 (24)Konya, J., & Dillner, J. (2001). Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv*
18 *Cancer Res*, 82, 205–238.
- 19
- 20 (25)Kroeger, K. M., Carville, K. S., & Abraham, L. J. (1997). The -308 tumor necrosis
21 factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*, 34, 391–399.
22 [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(97\)00052-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(97)00052-7)
23
- 24 (26)Li, H., Groop, L., Nilsson, A., Weng, J., & Tuomi, T. (2003). A combination of human
25 leukocyte antigen DQB1*02 and the tumor necrosis factor alpha promoter G308A
26 polymorphism predisposes to an insulin- deficient phenotype in patients with type 2
27 diabetes. *J Clin Endocr Metab*, 88, 2767–2774. [http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-](http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-020506)
28 020506
- 29
- 30 (27)Liu, L., Yang, X., Chen, X., Kan, T., Shen, Y., Chen, Z., & Hu, Z. (2012). Association
31 between TNF-a polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol*
32 *Rep*, 39, 2683-2688. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1022-9>
33
- 34 (28) Liu, S., Semenciw, R., Mao, Y. (2001). Cervical cancer: the increasing
35 incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women.
36 *CMAJ*, 164(8), 1151-1152.
37
- 38 (29)Matsumoto, K., Oki, A., Satoh, T., Okada, S., Minaguchi, T., Onuki, M.,
39 ...Yoshikawa, H. (2010). Interleukin-10–1082 gene polymorphism and susceptibility

- 1 to cervical cancer among Japanese women. *Jpn J Clin Oncol*, 40(11), 1113–1116.
2 <http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyq094>
- 3
- 4 (30)McCarron, S. L., Edwards, S., Evans, P. R., Gibbs, R., Dearnaley, D. P., Dowe, A., &
5 Southgate, C. (2002). Influence of cytokine gene polymorphisms on the development
6 of prostate cancer. *Cancer Res*, 62: 3369-3372.
7
- 8 (31)Mege, J-L., Meghari, S., Honstetter, A., Capo, C., & Raoult, D. (2006). The two faces
9 of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis*, 6(9), 557 –569.
10 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70577-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70577-1)
11
- 12 (32)Mendonça, V.G., Guimarães, M. J. B., Lima Filho, J. L., Mendonça, C. G., Martins,
13 D. B. G., Crovella, S., & Alencar, L. C. A. (2010). Infecção cervical por
14 papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de
15 alto grau e câncer de colo do útero. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 31, 476-485.
16 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032010001000002>
17
- 18 (33) Moscicki, A-B., Schiffman, M., Burchell, A., Albero, G., Giuliano, A. R.,
19 Goodman, M. T., ... Palefsky, J. (2012). Updating the Natural History of Human
20 Papillomavirus and Anogenital Cancers. *Vaccine*, 30S, F24-F33.
21 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.089>
- 22
- 23 (34)Passmore, J. A., Morroni, C., Shapiro, S., Williamson, A. L., & Hoffman, M. (2007).
24 Papanicolaou smears and cervical inflammatory cytokine responses. *Journal of*
25 *Inflammation*, 4(8), 1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-4-8>
26
- 27 (35)Perrey, C., Turner, S. J., Pravica, V., Howell, W. M., & Hutchison, I. V. 1999. ARMS-
28 PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene
29 polymorphisms. *Transpl Immunol*, 7, 127–128. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-3274\(99\)80030-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-3274(99)80030-6)
30
31
- 32 (36)Rosa, M. I., Medeiros, L. R., Rosa, D. D., Bozzeti, M. C., Silva, F. R., & Silva, B. R
33 (2009). Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública*, 25 (5), 953-
34 964. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000500002>
35
- 36 (37)Simonetti, A.C., Melo, J. H. L., Souza, P. R. E., Brunaska, D., & Lima Filho, J. L.
37 (2009). Immunological's host profile for HPV and Chlamydia trachomatis a cervical
38 cancer cofactor. *Microbes and Infection*, 11, 435-442.
39 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.01.004>
40

- 1 (38) Singh, H., Jain, M., Sachan, R., & Mittal, B. (2009). Association of TNFA (-308G>A)
2 and IL-10 (-819C>T) promoter polymorphisms with risk of cervical cancer. *Int J*
3 *Gynecol Cancer*, 19, 1190–1194. <http://dx.doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181a3a3af>
4
- 5 (39) Song, S. H., Lee, J. K., Seok, O. S., & Saw, H. S. (2007). The relationship between
6 cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine
7 cervix. *Gynecologic Oncology*, 104, 732-738.
8 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.10.054>
9
- 10 (40) Souza, H., Oliveira, S., Santos, A. M., Catarino, R., Moutinho, J., & Medeiros, R.
11 (2014). Tumour necrosis factor alpha 308 G/A is a risk marker for the progression from
12 high-grade lesions to invasive cervical cancer. *Tumor Biol*, 35, 2561–2564.
13 <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-1337-3>
14
- 15 (41) Stanczuk, G. A., Sibanda, E. N., Tswana, A. S., & Bergstrom, S. (2003)
16 Polymorphism at the -308-promotor position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)
17 gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 13, 148-153.
18 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-1438.2003.13046.x>
19
- 20 (42) Stanczuk, G. A., Sibanda, E. N., Perrey, C., Chirara, M., Pravica, V., Hutchison, I., &
21 Tswana, S. A. (2001). Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with
22 a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer*, 94(6): 792-
23 794. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.1543>
24
- 25 (43) Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24, S16-
26 S22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.002>
- 27 (44) Turner, D. M., Williams, D. M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P. J., &
28 Hutchison, I. V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene
29 promoter. *Eur J Immunogenet*, 24(1), 1–8.
- 30 (45) Wajant, H. (2009) The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*, 49, 1–15.
31 http://dx.doi.org/10.1007/400_2008_26
- 32 (46) Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A.,
33 Shah, K. V. ... Muñoz, M. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of
34 invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19.
35 [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199909\)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f)
36
- 37 (47) Wang, Y., Liu, X. H., Li, Y. H., & Li, O. (2013) The paradox of IL-10-mediated
38 modulation in cervical cancer (Review). *Biomedical Reports*, 1, 347-351.
39 <http://dx.doi.org/10.3892/br.2013.69>
40
- 41 (48) Wang, N., Yin, D., Zhang, S., Wei, H., Wang, S., Zhang, Y., ... Zhang, Y. (2012).
42 TNF-Alpha rs1800629 Polymorphism Is Not Associated with HPV Infection or

- 1 Cervical Cancer in the Chinese Population. *Plos One*, 7(9), 1-5.
2 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0045246.t003>
3
- 4 (49) Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., & Duff, G. W.
5 (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter
6 on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 94(7), 3195–3159.
7
- 8 (50) Womack, S. D., Chirenje, Z. M., Gaffikin, L., Blumenthal, P. D., McGrath, J. A.,
9 Chipato, T., ... Shah, K. (2000). HPV-based cervical cancer screening in a population
10 at high risk for HIV infection. *Int J Cancer*, 85(2), 206–10.
11 [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000115\)85:2<206::AID-](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000115)85:2<206::AID-IJC10>3.0.CO;2-Q)
12 [IJC10>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000115)85:2<206::AID-IJC10>3.0.CO;2-Q).
13
- 14 (51) zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell
15 control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 92(9), 690–698.
16 <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/9>

Table 1. Sequence of primers used in the study

Primer	Sequence Sense	Antisense Sequence	Reference
IL-10 -1082 A	5'- ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3'	5'- CAGTGCCAAGTGAAGAATTTGG-3'	Crilly <i>et al.</i> (2003)
IL-10 -1082 G	5'- CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'		
TNF- α -308 G	5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'	5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3'	Perrey <i>et al.</i> (1999)
TNF- α -308 A	5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'		

Table 2. genotypic and allelic distribution of the polymorphism of the promoter region of the IL10 (-1082 A / G) in patients with cervical lesion, patients with adenocarcinoma and healthy control.

IL10 Promoter -1082	Group 1 n=168 (%)	Group 2 n= 72 (%)	Group 3 n=169 (%)	χ^2 P (Value)	OR (95% CI)	P*
Genotype						
AA	36 (21,5)	14 (19)	28 (16,57)		Reference	
GA	76 (45,2)	20 (28)	121 (71,6)	6,158 (0,0131)^a 7,844 (0,0051)^b	0,4885 (0,2760 - 0,0195)^a 0,3306 (0,1490 - 0,7336)^b	0,0195^a 0,01^b
GG	56 (33,3)	38 (53)	20 (11,83)	4,687(0,0304)^a 10,109 (0,0015)^b	2,1778 (1,0703 - 4,4311)^a 3,8 (1,6413 - 8,7979)^b	0,0470^a 0,0029^b
AA/GG+GA	36/132	14/58	28/141	1,294 (0,2554) ^a 0,290 (0,59) ^b	0,7281 (0,421 - 1,2595) ^a 0,8227 (0,4042 - 1,6745) ^b	0,3180 ^a 0,7239 ^b
Allele						
A	148 (44,0)	48 (33,3)	177 (52,37)		Reference	
G	188 (56,0)	96 (66,7)	161 (47,63)	4,671 (0,0307)^a 14,698 (0,0001)^b	1,3965 (1,0312 - 1,8912)^a 2,1988 (1,4637 - 3,3031)^b	0,0372^a 0,0002^b

^a Comparative results between the group of patients with cervical lesions and the control group

^b Comparative results between the group of patients with adenocarcinoma and the control group

χ^2 –Chi squared test; P value de χ^2 ; OR – Odds ratio; CI –Confidence Interval; P* – P value de odds ratio

Characteristics in bold show significant values

Table 3. genotypic and allelic distribution of the polymorphism of TNF- α promoter region (-308 G / A) in patients with cervical lesions (Group 1), patients with adenocarcinoma (Group 2) and control patients

TNF- α Promoter -308	Group 1 n=168 (%)	Group 2 n= 72 (%)	Group 3 n=169 (%)	χ^2 P (Value)	OR (95% CI)	P*
Genotype						
GG	103 (61,3)	44 (61,1)	95 (56,21)		Reference	
GA	58 (34,5)	26 (36,1)	74 (43,79)	2.07 (0.1502) ^a 0.898 (0.3433) ^b	0,7229 (0,4644 - 1,1254) ^a 0,7586 (0,4281 - 1,3444) ^b	0,1847 ^a 0,4217 ^b
AA	7 (4,2)	2 (2,8)	-		No analysis	
GG/GA+AA	103/65	44/28	95/74	0.903 (0.342) ^a 0.496 (0.4812) ^b	0,8102 (0,5247 - 1,2510) ^a 0,8170 (0,4653 - 1,4344) ^b	0.401 ^a 0,5741 ^b
Allele						
G	264 (78,6)	114(79,2)	264 (78,1)		Reference	
A	72 (21,4)	30 (20,8)	74 (21,9)	0.021 (0.8835) ^a 0.067 (0.7956) ^b	0.9730 (0.6744 - 1.4038) ^a 0.9388 (0.5823 - 1.5138) ^b	0.9577 ^a 0.8902 ^b

^a Comparative results between the group of patients with cervical lesions and the control group

^b Comparative results between the group of patients with adenocarcinoma and the control group

χ^2 –Chi squared test; P value de χ^2 ; OR – Odds ratio; CI –Confidence Interval; P* – P value de odds ratio

Characteristics in bold show significant values

Table 4. Distribution of genotype polymorphism of the promoter of the IL-10 gene region (-1082 A / G) in patients with cervical lesions and socio-behavioral characteristics.

socio-behavioral characteristics		n=168	Group 1		χ^2 (P Value)	OR (95%IC)	P*
			AA (n)	AG+GG (n)			
Age > 35 years	y	49	25	24	35,979 (<0,0001)	0,0978 (0,0424-0,2255)	<0,0001
	n	119	11	108			
Age of first sexual intercourse <18 years	y	116	26	90	0,543 (0,4616)	0,8242 (0,3644-1,8681)	0,3937
	n	52	10	42			
Above 3 pregnancies	y	85	19	66	0,087 (0,7676)	0,8947 (0,4278-1,8715)	0,9144
	n	83	17	66			
Using ACO ¹	y	83	19	64	0,209 (0,6479)	0,8421 (0,4026-1,765)	0,7882
	n	85	17	68			
Smoker	y	50	14	36	1,826 (0,1766)	0,5893 (0,2723-1,2751)	0,252
	n	118	22	96			
African derivation	y	58	8	50	3,067 (0,0799)	2,1341 (0,9023-5,0477)	0,1203
	n	110	28	82			
CT-positive	y	24	4	20	0,377 (0,5392)	1,4286 (0,4554-4,4810)	0,7298
	n	144	32	112			

¹Oral contraceptive

χ^2 –Chi squared test; P value de χ^2 ; OR – Odds ratio; CI –Confidence Interval; P* – P value de odds ratio

Characteristics in bold show significant values

Table 5. Distribution of genotype polymorphism of the promoter region of the TNF- α gene (-308 G / A) in patients with cervical lesions and socio-behavioral characteristics

socio-behavioral characteristics		n = 168	Group 1		χ^2 (P Value)	OR (95%IC)	P*																																																																				
			GG (n)	AG+AA (n)																																																																							
Age > 35 years	Y	93	49	44	6,528 (0,0106)	2,5714 (1,3545-4,8815)	0,0057																																																																				
	N	75	54	21				Age of first sexual intercourse <18 years	Y	99	44	55	28,903 (<0,0001)	6,6224 (3,0571-14,3458)	<0,0001	N	69	59	10	Above 3 pregnancies	Y	80	45	35	1,648 (0,1992)	1,5037 (0,8057-2,8066)	0,2605	n	88	58	30	Using ACO ¹	y	81	48	33	0,277 (0,5986)	14,1797 (4,6013-43,6973)	<0,0001	n	87	55	32	Smoker	y	47	18	29	14,568 (0,0001)	3,8040 (1,8786-7,7030)	0,0003	n	121	85	36	African derivation	y	60	22	38	18,577 (<0,0001)	5,1818 (2,6194-10,2510)	<0,0001	n	108	81	27	CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315
Age of first sexual intercourse <18 years	Y	99	44	55	28,903 (<0,0001)	6,6224 (3,0571-14,3458)	<0,0001																																																																				
	N	69	59	10				Above 3 pregnancies	Y	80	45	35	1,648 (0,1992)	1,5037 (0,8057-2,8066)	0,2605	n	88	58	30	Using ACO ¹	y	81	48	33	0,277 (0,5986)	14,1797 (4,6013-43,6973)	<0,0001	n	87	55	32	Smoker	y	47	18	29	14,568 (0,0001)	3,8040 (1,8786-7,7030)	0,0003	n	121	85	36	African derivation	y	60	22	38	18,577 (<0,0001)	5,1818 (2,6194-10,2510)	<0,0001	n	108	81	27	CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315	n	132	87	45								
Above 3 pregnancies	Y	80	45	35	1,648 (0,1992)	1,5037 (0,8057-2,8066)	0,2605																																																																				
	n	88	58	30				Using ACO ¹	y	81	48	33	0,277 (0,5986)	14,1797 (4,6013-43,6973)	<0,0001	n	87	55	32	Smoker	y	47	18	29	14,568 (0,0001)	3,8040 (1,8786-7,7030)	0,0003	n	121	85	36	African derivation	y	60	22	38	18,577 (<0,0001)	5,1818 (2,6194-10,2510)	<0,0001	n	108	81	27	CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315	n	132	87	45																				
Using ACO ¹	y	81	48	33	0,277 (0,5986)	14,1797 (4,6013-43,6973)	<0,0001																																																																				
	n	87	55	32				Smoker	y	47	18	29	14,568 (0,0001)	3,8040 (1,8786-7,7030)	0,0003	n	121	85	36	African derivation	y	60	22	38	18,577 (<0,0001)	5,1818 (2,6194-10,2510)	<0,0001	n	108	81	27	CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315	n	132	87	45																																
Smoker	y	47	18	29	14,568 (0,0001)	3,8040 (1,8786-7,7030)	0,0003																																																																				
	n	121	85	36				African derivation	y	60	22	38	18,577 (<0,0001)	5,1818 (2,6194-10,2510)	<0,0001	n	108	81	27	CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315	n	132	87	45																																												
African derivation	y	60	22	38	18,577 (<0,0001)	5,1818 (2,6194-10,2510)	<0,0001																																																																				
	n	108	81	27				CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315	n	132	87	45																																																								
CT-positive	y	36	16	20	5,494 (0,0191)	2,4167 (1,1422-5,1134)	0,0315																																																																				
	n	132	87	45																																																																							

¹Oral contraceptive

χ^2 –Chi squared test; P value de χ^2 ; OR – Odds ratio; CI –Confidence Interval; P* – P value de odds ratio

Characteristics in bold show significant values