



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

DEBORAH LUISA DE SOUSA SANTOS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *IL-10* EM
MULHERES COM LESÃO INTRAEPITELIAL E CÂNCER CERVICAL**

Natal - RN
JUNHO/2019

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE IL-10 EM
MULHERES COM LESÃO INTRAEPITELIAL E CÂNCER CERVICAL**

por

Deborah de Luisa Sousa Santos

Monografia Apresentada à
Coordenação do Curso de
Biomedicina da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte,
como Requisito Parcial à Obtenção
do Título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas.

Natal - RN

JUNHO/2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

A Monografia **ESTUDO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE IL-10 EM MULHERES COM LESÃO INTRAEPITELIAL E CÂNCER CERVICAL**

elaborada por DEBORAH LUISA DE SOUSA SANTOS

e aprovada por todos os membros da Banca examinadora foi aceita pelo Curso de Biomedicina e homologada pelos membros da banca, como requisito parcial à obtenção do título de

BACHAREL EM BIOMEDICINA

Natal, 06 de junho de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas
(Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/UFRN)

Prof. Dr. Ricardo Ney Cobucci (Chefe do Ambulatório de
Patologia Cervical/EBSERH)

Prof. Dra. Ana Katherine Da Silveira Goncalves De Oliveira
(Departamento da Toco-Ginecologia/UFRN)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Santos, Deborah Luisa de Sousa.

Estudo de polimorfismos na região promotora do gene il-10 em mulheres com lesão intraepitelial e câncer cervical / Deborah Luisa de Sousa Santos. - 2019.
49 f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Curso de Biomedicina, Natal, RN, 2019.

Orientadora: Prof. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas. Natal.

1. Polimorfismo - Monografia. 2. Região promotora - Monografia. 3. IL-10 - Monografia. 4. Lesão intraepitelial - Monografia. 5. Câncer cervical - Monografia. I. Freitas, Janaina Cristiana de Oliveira Crispim. II. Título.

RN/UF/BCZM
575.17

CDU

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Senhorinha e Etevaldo, que se esforçaram para contribuir com essa realidade e a Deus e Nossa Senhora, pela oportunidade em estar concretizando mais este sonho que me dediquei por tanto tempo.

Aos meus irmãos, Danilo e Diego, que contribuíram significativamente para a pessoa que sou hoje.

A minhas amigas e companheiras do LAPIM, Luisa, Rayanne e Juliany pela amizade e oportunidade de aprendizagem junto a vocês. E aos técnicos deste laboratório pelo grande trabalho que lá fazem, e são primordiais para o desenvolvimento das nossas pesquisas, Kleyton e Fabíola.

Ao Laboratório de Imunogenética (LIG) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fiocruz - PE e a Dra. Norma Lucena por ter me recebido em seu Laboratório tão bem e assim permitido a realização de partes muito importantes deste trabalho. E aos amigos de lá, que me acolheram em seu laboratório e me ajudaram a realizar esse projeto durante minha missão de estudos do projeto Procad-Capes em seu laboratório, em especial à Nanda, que mesmo distante sempre esteve disposta em ajudar e esclarecer minhas dúvidas. Sem essa minha passagem no LIG eu não teria conseguido.

A minha orientadora Prof. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas, que contribuiu de forma direta para essa realização.

Aos colegas de turma que levarei para a vida e que deixaram essa caminhada mais leve e divertida.

Ao meu namorado, Tyrone, que tanto me ajudou desta jornada, acreditando em mim até quando eu mesma não acreditava.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

No Brasil, o câncer cervical ocupa a terceira posição no *ranking* de incidência de câncer na população feminina. O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal agente causador do câncer cervical e lesões precursoras, e é importante destacar que muitas vezes o HPV utiliza estratégias para se evadir da resposta imunológica utilizando mecanismo que envolvam imunorregulação. No microambiente tumoral, tem-se destacado algumas moléculas imunorreguladoras e as mesmas têm contribuído para progressão do câncer cervical. A IL-10 é uma citocina imunossupressora, frequentemente elevada no microambiente tumoral. O gene que codifica a IL-10 humana está localizado no cromossomo 1 (1q31-32). Também foram identificados polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora de IL-10 que podem influenciar a produção da citocina, e conseqüentemente desempenhar um papel na susceptibilidade ao câncer. Neste estudo foram analisados os SNPs -1082A>G (*rs1800896*) e -819C>T (*rs1800871*) do gene *IL-10*, a partir de amostras de sangue periférico de 317 mulheres brasileiras, sendo 142 mulheres com alteração no colo do útero (grupo alterado), enquadradas com lesão intraepitelial cervical (SIL) (n=101, sendo 24 pacientes com lesão de baixo grau e 77 com lesão de alto grau) e câncer cervical (CC) (n=41), e 167 mulheres saudáveis representando o grupo controle. O objetivo foi verificar a frequência alélica e genotípica dos SNPs da região promotora da IL-10 e associar com desenvolvimento de SIL e CC. Como resultado, no polimorfismo *rs1800896*, a frequência do genótipo GG foi estatisticamente menor no grupo alterado (SIL e CC) e no grupo SIL, comparados ao grupo controle (OR = 0,35, CI 95% = 0,14 - 0,88, e p=0,026; OR = 0,36, CI 95% = 0,13 - 1,00, e p=0,049, respectivamente). O grupo CC, comparado ao controle, não mostrou nenhuma diferença significativa, assim como não houve diferença estatística entre os casos e controle no polimorfismo *rs1800871* (p>0,05). Desta forma, conclui-se que, no polimorfismo *rs1800896*, o genótipo GG apresentou não estar associado ao desenvolvimento de SIL e câncer cervical.

Palavra-chaves: Polimorfismo, região promotora, IL-10, Lesão intraepitelial, Câncer cervical.

ABSTRACT

In Brazil, cervical cancer occupies the third position in the ranking of cancer incidence in the female population. Human papillomavirus (HPV) is the main causative agent of cervical cancer and precursor lesions, and it is important to note that HPV often uses strategies to evade the immune response using mechanisms that involve immunoregulation. In the tumor microenvironment, some immunoregulatory molecules have been highlighted and they have contributed to the progression of cervical cancer. IL-10 is an immunosuppressive cytokine, often elevated in the tumor microenvironment. The gene encoding human IL-10 is located on chromosome 1 (1q31-32). Single-base polymorphisms (SNPs) have also been identified in the IL-10 promoter region that may influence cytokine production, and therefore play a role in cancer susceptibility. In this study the SNPs -1082A>G (*rs1800896*) and -819C>T (*rs1800871*) of the IL-10 gene were analyzed from peripheral blood samples from 317 Brazilian women, 142 women with alteration in the cervix (altered group), framed with SIL squamous intraepithelial lesion (SIL) (n = 101, 24 patients with low grade lesion and 77 with high grade lesion) and cervical cancer (CC) (n = 41) and 167 representing healthy women. The objective was to associate the allelic and genotypic frequency of IL-10 SNPs and to associate with the development of SIL and CC. As a result, in polymorphism *rs1800896*, the GG genotype frequency was statistically lower in the altered group (SIL and CC) and in the SIL group, compared to the control group (OR = 0.35, 95% CI = 0.14-0.88, p = 0.026, OR = 0.36, 95% CI = 0.13-1.00, p = 0.049, respectively). The CC group, compared to the control, did not show any significant difference, nor was there a statistical difference between the cases and control in the polymorphism *rs1800871* (p > 0.05). Thus, it can be concluded that, in the polymorphism *rs1800896*, the GG genotype was not associated with the development of SIL and cervical cancer.

Key words: Polymorphism, Promoter, IL-10, Intraepithelial lesion, Cervical cancer.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS E QUADROS	10
LISTA DE APÊNDICES	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Lesões intraepiteliais e câncer cervical	11
1.2 Papilomavírus humano (HPV)	11
1.3 Resposta imunológica contra o HPV	13
1.4 A interleucina IL-10	15
1.4 Polimorfismos no gene IL-10	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	23
3. METODOLOGIA	23
3.1 Comitê de Ética	23
3.2 Delineamento do Estudo	23
3.3 Coleta de amostras e de dados	24
3.4 Extração de DNA total a partir de células do sangue periférico e preparo das amostras	24
3.5 Análise dos polimorfismos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene IL-10	26
3.6 Análise computacional	27
3.7 Análise estatística	27
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES VOLUNTÁRIOS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACI	Anticoncepcional injetável
ACO	Anticoncepcional oral
CC	Câncer cervical
células NK	células Natural Killers
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CI 95%	Intervalo de confiança 95%
CTLs	Células T citotóxicos
DCs	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HPV	Papilomavírus humano
HR-HPV	<i>High Risk-HPV</i>
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IFN-gama	Interferon gama
IHENE	Instituto de Hemoterapia do Nordeste
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de IL-10
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK1/TyK2/STAT3	Janus Quinase-1 / Tirosina Quinase-2 / Transdutor de Sinal e Ativador de

Transcrição 3

LAPIM	Laboratório em Pesquisa de Imunologia Celular e Molecular
LIG	Laboratório de Imunogenética
LIGA	Liga Norte Riograndense Contra o Câncer
LR-HPV	<i>Low Risk-HPV</i>
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEJC	Maternidade-Escola Januário Cicco
MHC I e II	Moléculas de histocompatibilidade classe I e classe II
MMP-9	Matriz de Metaloproteinase-9
NF-kB	Fator Nuclear-Kappa beta
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SBE	STAT-Binding-Elements
SIL	Lesão intraepitelial
SNPs	Polimorfismos de base única
SOCS3	Proteína de Sinalização de Supressão de Citocina 3
T reg	Células T regulatórias
TAMs	Macrófagos associados a tumor
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-b1	Fator de crescimento transformador beta 1
Th	Células T Helper
Th1	Células T Helper tipo 1
Th17	Células T Helper tipo 17
Th2	Células T Helper tipo 2
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Tr1	Células T regulatória tipo 1

HR-HPV	<i>Undetermined Risk-HPV</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Frequência alélica e genotípica dos sítios polimórficos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene IL-10 em pacientes com alteração cervical	29
Tabela 2.	Frequência alélica e genotípica dos sítios polimórficos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene IL-10 em pacientes com lesão intraepitelial	29
Tabela 3.	Frequência alélica e genotípica dos sítios polimórficos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene IL-10 em pacientes com câncer cervical	30

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.	Desenvolvimento do câncer cervical após a infecção viral	13
Figura 2.	Desenvolvimento de células Th a partir do padrão de citocinas, com destaque para a produção de IL-10	14
Figura 3.	Via de sinalização de IL-10	17
Figura 4.	O mecanismo molecular pelo qual o HPV influencia a expressão gênica da IL-10 e vice-versa	18
Figura 5.	Imunossupressão celular mediada por IL-10	19
Quadro 1.	Condições da ciclagem para amplificação da sequência reguladora do gene <i>IL-10</i>	27
Quadro 2.	Teste de Chi-Quadrado de Pearson para avaliação de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg	28

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A	Questionário para pacientes voluntários	47
APÊNDICE B	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesões intraepiteliais e câncer cervical

O câncer de colo de útero ocupa o sétimo lugar no *ranking* mundial, sendo o quarto tipo mais comum na população feminina, excluindo os casos de tumores de pele não melanoma, com, aproximadamente 530 mil novos casos por ano (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, o câncer de colo de útero também ocupa a quarta posição de câncer com maior taxa de mortalidade em mulheres, com 5.727 óbitos, e estima-se 16.370 novos casos de câncer de colo do útero para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2018). Em um parâmetro regional, na região Nordeste do Brasil, o câncer cervical ocupa a segunda posição, com taxa de risco estimada de 19,49 novos casos a cada 100 mil mulheres, e o terceiro lugar de óbito por câncer feminino, com taxas de mortalidade de 6,15 por 100 mil habitantes (INCA, 2018). O câncer de colo de útero é raro em mulheres com até 30 anos e o pico da sua incidência acontece na faixa etária de 45 a 50 anos. A taxa de mortalidade aumenta progressivamente dos 40 anos, com expressivas diferenças regionais (INCA, 2018).

1.2 Papilomavírus humano (HPV)

A etiologia do câncer cervical (CC) é complexa e multifatorial. Atualmente, a principal causa de câncer cervical que têm sido provada é a infecção do papilomavírus humano (HPV) (MIN, PU & GU, 2018), pois sabe-se que há uma relação da presença deste tipo de tumor e a detecção do vírus na paciente. O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, que compreende pequenos vírus de DNA circular (aproximadamente 50-52 nm de diâmetro), que replicam seus genomas usando a maquinaria enzimática do hospedeiro, garantindo um alto grau de leitura de prova com baixas taxas de mutação (BURK, HARARI & CHEN., 2013). O genoma viral contém aproximadamente 8000 pares de bases (pb) (6000-8000 pb), composto tipicamente por um segmento não codificante denominado região reguladora *upstream*, envolvido no controle de transcrição e replicação, e oito *open reading frames*, as ORFs, divididos em duas regiões, as regiões precoces (E, do inglês *early*) e tardia (L, do inglês *late*). A região L codifica para os genes L1 e L2, produzindo as proteínas do capsídeo necessárias para a montagem do vírion (partícula viral completa, infecciosa). Já a região E codifica seis genes: E1, E2, E4,

E5, E6 e E7, envolvidos em múltiplas atividades, incluindo replicação viral e transformação celular (CHEN et al., 2005; NGUYEN, RAMÍREZ-FORT & RADY, 2014), no qual se têm um grande destaque para as proteínas E6 e E7 que estão envolvidas em interações com proteínas de supressão tumoral do hospedeiro, como p53 e pRb, promovendo, dessa forma, a ruptura do ciclo celular ordenado, além de envolver a telomerase, ativando-a para a imortalizar a célula infectada, uma vez que inativa o relógio telomérico, sendo proteínas oncogênicas de extrema importância para a atividade oncogênica do vírus.

Até o momento, mais de 200 tipos de HPV foram identificados, e, de acordo com seu potencial carcinogênico, são classificados como de baixo risco (LR-HPV, do inglês *low risk-HPV*), causando anormalidades de células cervicais benignas ou de baixo grau, verrugas genitais e papilomas laríngeos, e como de alto risco (HR-HPV, do inglês *high risk-HPV*), atuando como carcinógenos no desenvolvimento do câncer do colo do útero e outros cânceres anogenitais, e como risco indeterminado (UR-HPV, do inglês *undetermined risk-HPV*) (DOORBAR et al., 2015; BERTI et al., 2017). Entre o grupo HR-HPV, HPV16 e HPV18 estão relacionados com vários tipos de câncer, ambos responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer do colo do útero (WOODMAN, COLLINS & YOUNG, 2007; MIN, PU & GU, 2018), mas são enquadrados HPV de alto risco também HPV39, HPV35, HPV31, HPV 45, 51, 52 e 58, tendo uma gama de subtipos virais que possui potencial carcinogênico.

O HPV é um vírus sexualmente transmissível, no qual a infecção geralmente ocorre através de micro-abrasões, micro-feridas e/ou receptores de integrinas no epitélio de camada profunda, permitindo a entrada do vírus dentro de células basais, uma vez que a infecção deve ocorrer em uma célula mitoticamente ativa ou em uma célula-tronco basal, a fim de inserir efetivamente o genoma viral no núcleo e permitir a replicação do mesmo (NGUYEN, RAMÍREZ-FORT & RADY, 2014). Em geral, parte das infecções são assintomáticas e eliminadas em 6 a 8 meses. Entre a outra parte, cerca de 90% são eliminadas em poucos anos (1 a 3 anos) após a aquisição, enquanto 10% persistem (WINER et al., 2011). Alguns tipos de HPV podem estabelecer uma infecção crônica devido a persistência viral, permitindo o

desenvolvimento de SIL, que podem resultar em uma progressão ao câncer (BERTI et al., 2017) (Figura 1).

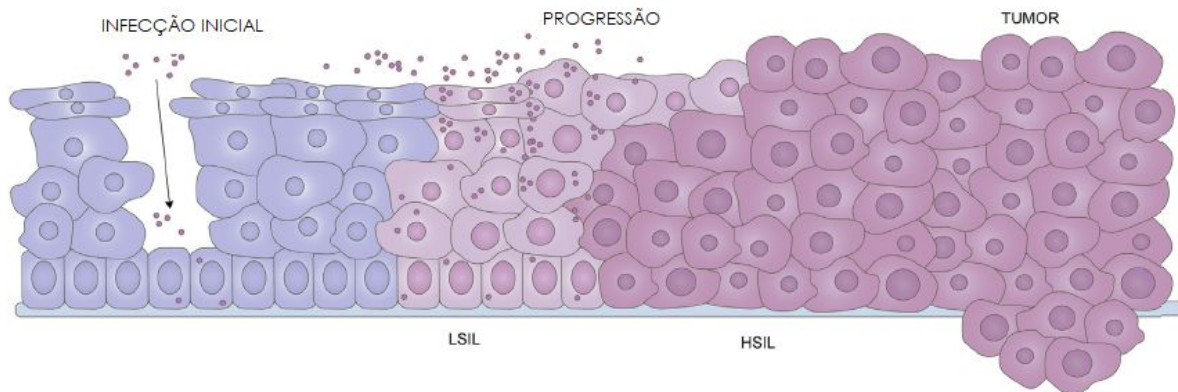


Figura 1. Desenvolvimento do câncer cervical após a infecção viral. O desenvolvimento do câncer do colo do útero começa com uma lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) que ocorre como resultado da infecção por HR-HPV associada ao comprometimento da eliminação do vírus. Por razões distintas, se a taxa de eliminação do HPV começar a diminuir, o risco de progredir para a lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) aumenta gradualmente. Na HSIL, uma consequente quebra do ciclo celular pode se tornar irreversível, levando a um fenótipo maligno completamente transformado, culminando no carcinoma cervical.

Fonte: Adaptado de Berti et al., 2017.

1.3 Resposta imunológica contra o HPV

Apesar da evidência de que o HPV está fortemente implicado como o agente causador na etiologia do câncer do colo do útero e seus precursores, a infecção pelo HPV sozinha não é suficiente para o desenvolvimento do câncer (GIANNINI, AL-SALEH & PIRON, 1998). Há um grande número de co-fatores que parecem influenciar no resultado da infecção pelo HPV (SZOKE et al, 2004). Em particular, a resposta imunológica mediada por células é importante para controlar a infecção pelo HPV e sua associação à neoplasia. Essa resposta celular é regulada por citocinas que são secretadas primariamente por células T *Helper* (Th) e macrófagos. A diferenciação das células Th é dirigida por citocinas que, dependendo do padrão de citocinas no micro-ambiente, promovem desenvolvimento de um tipo de população de célula Th e suprimem o desenvolvimento das outras populações, causando uma polarização.

Antigamente, o paradigma de células Th era voltado para células Th1, associada à resposta contra patógenos intracelular, e produzem interferon gama (IFN-gama) e interleucina 2 (IL-2), no qual são imuno-estimulatórias e estão associadas com a eliminação da infecção pelo HPV e regressão da lesão intraepitelial; e do outro lado células Th2, que produzem IL-4, IL-5, além de produzir IL-10, no qual são imunoregulatórias, possuem efeito imunossupressor e podem ser capazes de estimular o crescimento tumoral (GOVAN et al., 2003; SABAT et al., 2010). Mas hoje já se tem conhecimento de outras populações de células Th, como T regulatórias (T reg), T *Helper* 17 (Th17), T regulatórias do tipo 1 (Tr1) e T *Helper* 22 (Th22), que são importantes na resposta imunológica desse contexto, e em comum produzem, embora em quantidades ligeiramente diferentes, a interleucina-10 (IL-10), uma citocina imunorreguladora importante na qualidade da resposta imune, (Figura 2) (SABAT et al., 2010), contudo a produção dessa citocina se concentra em células T reg, Tr1 e Th2.

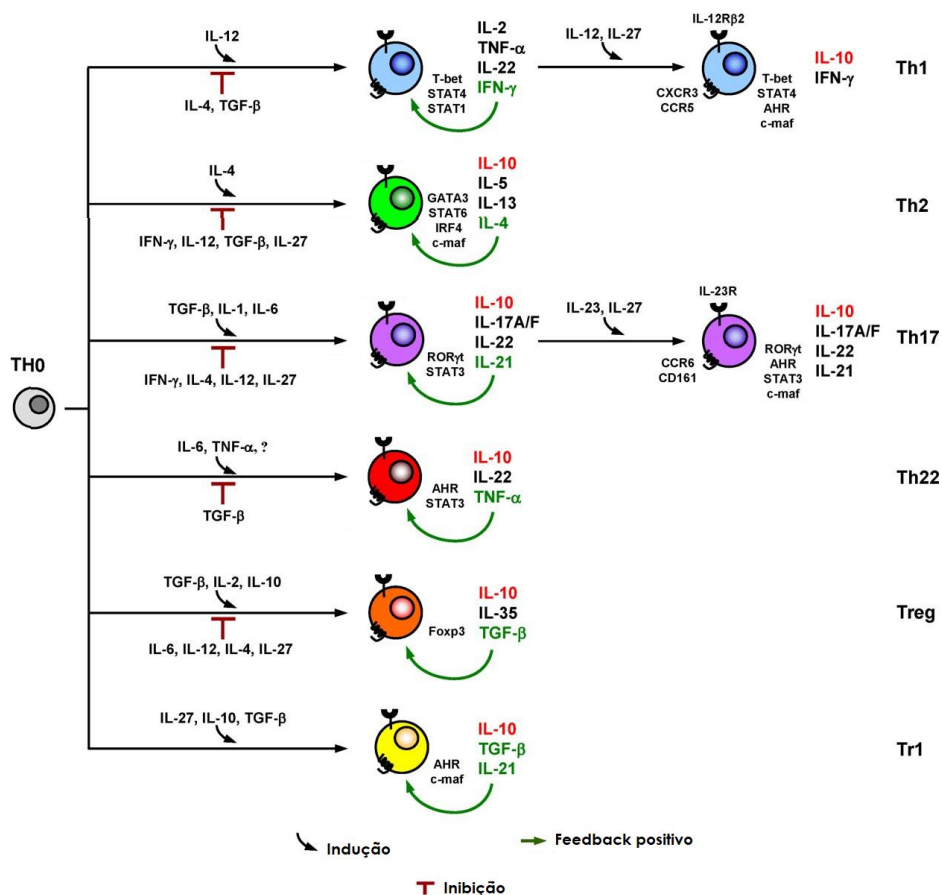


Figura 2. Desenvolvimento de células Th a partir do padrão de citocinas, com destaque para a produção de IL-10.

Fonte: Adaptado de SABAT et al., 2010.

No microambiente cervical, vários componentes imunológicos possuem um papel importante na estabilização da infecção pelo HPV assim como na regressão ou progressão do câncer cervical (BERTI et al., 2017). Um desses componentes é a IL-10, uma citocina imunorregulatória produzida por vários tipos de células. Sabe-se que a resposta imune contribui para o estadiamento de lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (HSIL), de modo que a expressão de INF-gama é diminuída e a expressão de IL-10 é aumentada. Nesses pacientes, o perfil de citocinas sistêmico é deslocado da resposta tipo Th1 para outros padrões de resposta. (SZOKE et al., 2004).

1.4 A interleucina IL-10

A IL-10 foi inicialmente descrita como uma citocina derivada de células T helper 2, no entanto, foi amplamente aceito que a IL-10 não está restringida a certos subconjuntos de células T (IYER & CHENG, 2012). Uma vasta gama de populações de células produz IL-10 humana, incluindo as já citadas células Th2, T reg, Tr1, Th17, Th22, e células T CD8 + citotóxicas. Além disso, alguns subconjuntos de células dendríticas, macrófagos, granulócitos, células B, células Natural *Killer* (NK), mastócitos, queratinócitos e fibroblastos, também podem produzir IL-10. Adicionalmente, várias células tumorais são capazes de produzir IL-10, como o mieloma múltiplo, melanoma e células de carcinoma escamoso cervical (BERTI et al., 2017). Quais dessas células são as principais responsáveis pela presença de IL-10 em situações definidas depende do tipo de estímulo, tipo de tecido afetado e ponto de tempo em um processo imunológico (SABAT et al., 2010).

O homodímero de IL-10 produzido atua em diferentes tipos de células, através do receptor de IL-10 (IL-10R), um receptor tetramérico de citocina transmembrana composto de duas subunidades de ligação de ligante (IL-10R1) e duas subunidades de sinalização acessórias (IL-10R2). A ligação do receptor ativa a sinalização JAK1 / TyK2 / STAT3 (Janus Quinase-1 / Tirosina Quinase-2 / transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), levando a grandes mudanças no perfil de expressão de genes imunomoduladores, que, na verdade, servem para inibir a liberação de mediadores pró-inflamatórios, diminuindo a apresentação de antígenos

e fagocitose, e concomitantemente aumenta as funções inibitórias, de tolerância e de eliminação de células, como macrófagos e monocitos. (IYER & CHENG, 2012; BERTI et al., 2017). A STAT3 está primariamente envolvida na regulação negativa da ativação de macrófagos, levando a uma modulação negativa na expressão de importantes citocinas inflamatórias, com Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α , do inglês *Tumor Necrosis Factor-Alpha*), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 1 beta (IL-1 β) (MOORE et al., 2001; BERTI et al., 2017).

A via JAK1/TyK2/STAT3 é iniciada quando o homodímero IL-10 se liga aos domínios extracelulares de ambas subunidades IL-10R1, ativando a fosforilação de várias quinases associadas ao receptor, incluindo JAK1, constitutivamente associadas às subunidades IL-10R1, e Tyk2, associados constitutivamente às subunidades IL-10R2. Depois de fosforiladas, essas quinases fosforilam resíduos de tirosina específicos, localizados no domínio intracelular do IL-10R1, que atuam como locais transitórios de ancoragem para o fator de transcrição latente STAT3, um fator nuclear de translocação chave que induz a ativação de genes específicos codificando citocinas anti-inflamatórias. Após a ligação a estes locais de ancoragem, JAK1 e Tyk2 fosforilam STAT3, que então se homodimeriza e transloca para o núcleo. Lá, STAT3 liga-se a elementos *STAT-Binding-Elements* (SBE), que estão localizados na região promotora de diferentes genes responsivos a IL-10, incluindo o gene *SOCS3*, que codifica a Proteína de Sinalização de Supressão de Citocina 3 (SOCS3) (WILLIAMS et al., 2004; BERTI et al., 2017). A SOCS3 provoca diferentes efeitos intracelulares, incluindo a inibição de JAK1, que leva a um feedback negativo da via JAK1/TyK2/STAT3. Além disso, parece inibir a expressão induzida por endotoxina de muitas citocinas inflamatórias, inibindo a via da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), afetando a translocação nuclear de NF- κ B (Fator Nuclear-Kappa beta) e, conseqüentemente, inibindo a síntese de IL-6, TNF- α e IL-1 β . (Figura 3) (WILLIAMS et al., 2004; BERTI et al., 2017).

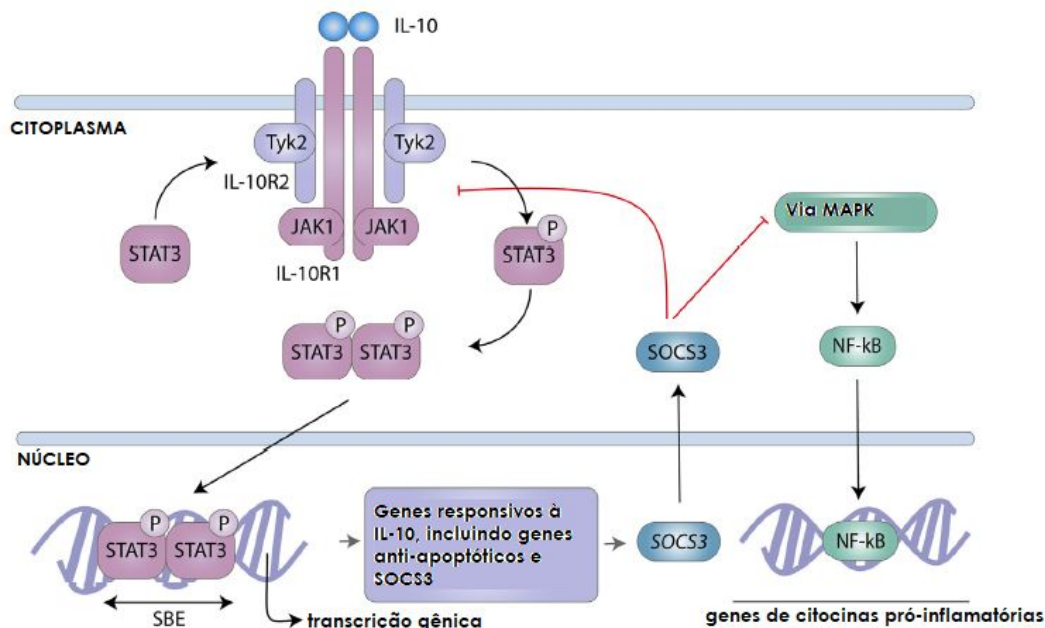


Figura 3. Via de sinalização de IL-10. A via de sinalização JAK1/TyK2/STAT3 é a mais comum a ser ativada em células mielóides, que resulta na inibição da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, além de um feedback negativo para a via.

Fonte: Adaptado de Berti et al., 2017.

Além disso, após a aquisição de uma infecção por HPV, especialmente com um HR-HPV, os níveis de citocinas como IL-10 e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), parecem aumentar ainda mais e são altamente expressos localmente nos casos de SIL (lesão intraepitelial) e câncer cervical (CC). Algumas proteínas precoces do HPV apresentam habilidade de se ligar a região promotora do gene da IL-10, levando a um aumento dos níveis dessa citocina. Tomados em conjunto, é possível supor que as proteínas E2, E6 e E7 do HPV aumentam a expressão da IL-10 (além disso, E6 e E7 estimula a expressão TGF- β 1), enquanto a IL-10 estimula a expressão das proteínas E6 e E7 do HPV, não esquecendo a interação entre a IL-10 e TGF- β 1. Isso acontece quando os níveis de IL-10 no microambiente se ligam ao seu receptor, fosforilando STAT3, que por sua vez liga-se a elementos SBE, como a região p97 da região promotora precoce do DNA do vírus, aumentando a expressão de E6 e E7. Junto com a E2, essas proteínas precoces se ligam a fatores de transcrição Sp1, que por sua vez promovem o aumento da expressão de IL-10, e também de TGF- β 1. (Figura 4) (TORRES-POVEDA, 2014; BERTI et al., 2017.)

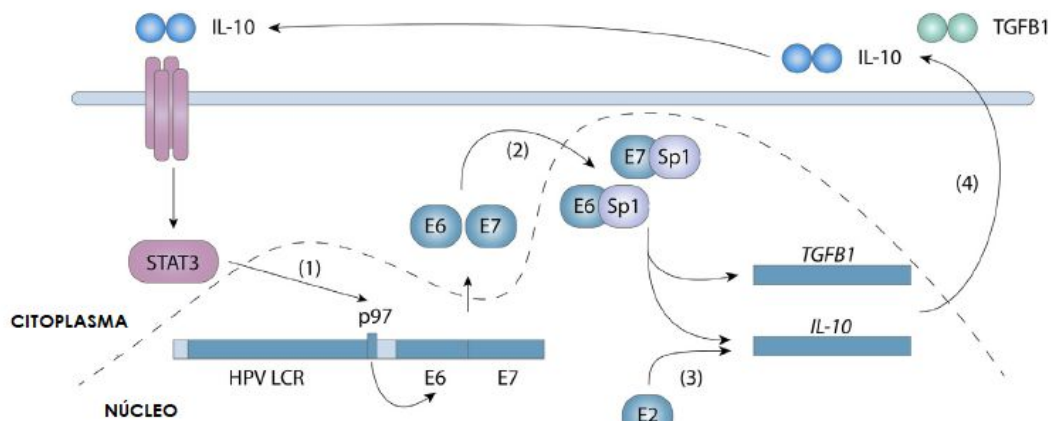


Figura 4. O mecanismo molecular pelo qual o HPV influencia a expressão gênica da IL-10 e vice-versa. Representa um ciclo vicioso, que facilita a progressão de uma infecção simples por HPV para o SIL ou o câncer cervical.

Fonte: Adaptado de Berti et al., 2017.

Independente da fonte de IL-10, os níveis dessa citocina são altos na maioria dos casos de câncer cervical (BERTI et al., 2017). Em diferentes microambientes, incluindo o colo uterino, a IL-10 exerce uma ampla gama de efeitos em vários tipos de células, que respondem ao seu papel antiinflamatório, imunossupressor e imunorregulatório, o que inclui a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, Interleucina-12 e IFN-gama, inibindo a polarização do perfil Th1 e também ativação de células NK, e TNF- α , IL-1b, IL-6, diminuindo a infiltração celular e inflamação). Ainda promove a indução da expressão de moléculas HLA-G, conhecidas por inibir a atividade das células T citotóxicas (CTLs) e as células NK. Além disso, IL-10 é responsável pela regulação negativa de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86, moléculas de adesão intercelular, como ICAM-1, e também interfere na maturação de monócitos para células dendríticas (DC) (MOSSER & ZHANG, 2008; SABAT et al., 2010; BERTI et al., 2017). Assim, a IL-10 tem um efeito inibitório na diferenciação das DCs e prejudica suas propriedades de apresentação de antígenos, promovendo a anergia de linfócitos T CD4⁺ (Figura 5).

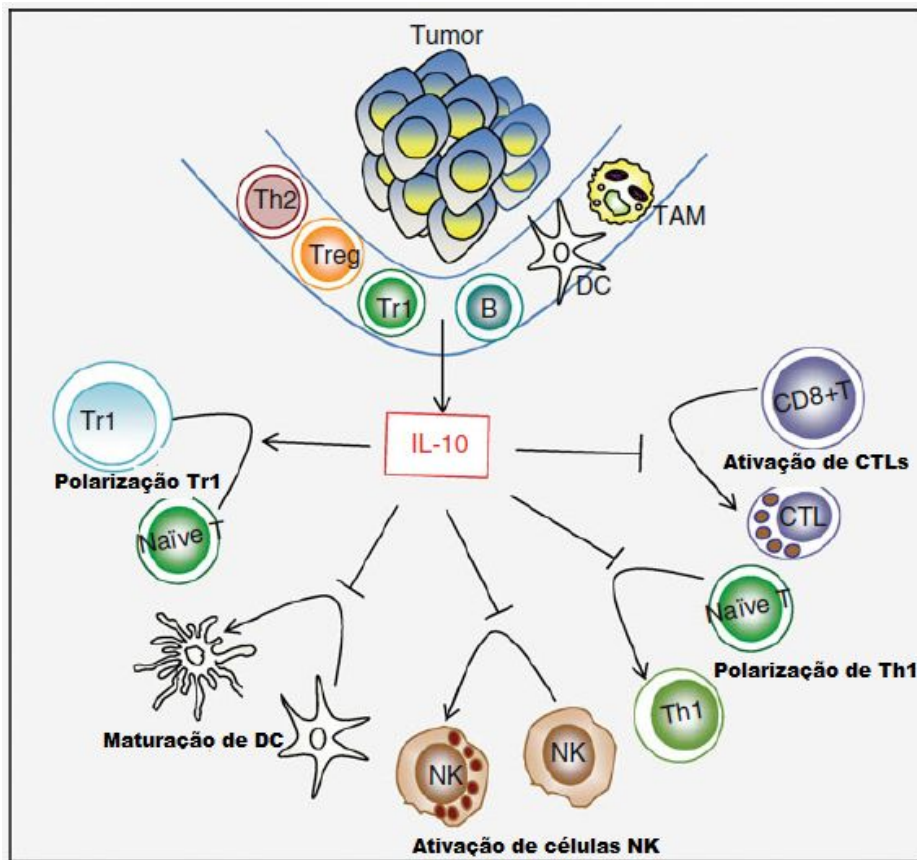


Figura 5. Imunossupressão celular mediada por IL-10. A IL-10 pode ser induzida no microambiente tumoral por vários tipos de células, incluindo células Th2, Tr1, T regs, células dendríticas (DCs), macrófagos associados a tumor (TAM), células B e até mesmo as células tumorais. A citocina exerce vários efeitos em diferentes tipos celulares, entre eles expandindo a regulação de células Tr1, uma um subconjunto indutivo de células T reguladoras que desempenham um papel fundamental na promoção e manutenção da tolerância imunológica; inibição da maturação da DC podendo prejudicar a apresentação do antígeno; inibição da polarização para células Th1 , através da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, e supressão da ativação de células NK e linfócitos T citotóxicos (CTL).

Fonte: Adaptado de Gopal et al., 2014.

Apesar da crença consolidada da IL-10 como um fator inibitório clássico, dados acumulados baseado em modelos experimentais têm mostrado que a IL-10 tem efeitos imunossupressores e imuno-estimulatórios em diferentes células, dependendo do contexto da estimulação e da concentração de múltiplos fatores envolvidos em cada contexto. Em certas situações, IL-10, de fato, induz imunossupressão e escape tumoral, assim promove o crescimento de tumor, através da inibição do fenótipo polarizado Th1 e supressão de citocinas

pró-inflamatórias; da inibição de passos importantes na detecção imune, como a inibição da expressão de moléculas de MHC II em células apresentadoras de antígenos, e expressão de moléculas de MHC I em células tumorais, e inibindo moléculas co-estimulatórias nas células dendríticas, como CD80 e CD86, causando anergia da resposta celular de linfócito CD4+ contra o patógeno; e ainda promove a indução da expressão de moléculas HLA-G, conhecidas por inibir a atividade das células T citotóxicas (CTLs) e as células NK. Enquanto em outras situações, IL-10 parece promover uma resposta citotóxica anti-tumoral que leva a regressão de tumor, pois apesar de contraditório, pode estimular a diferenciação de CTLs (aumentando o número de linfócitos T citotóxicos efetores) e da secreção de IFN-gama (levando à indução de citotoxicidade em tumores estabelecidos), além de estimular células NK e sua atividade citotóxica, e adicionalmente, exerce propriedade antiangiogênica, pois inibe a produção de fatores angiogênicos importantes, como VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) e MMP-9 (Matriz de Metaloproteinase-9), apoiando sua atividade antitumoral, além de poder aumentar a lise de células tumorais dependentes de células NK (KUNDU & FULTON, 1997; STEARNS et al., 1999; ROH et al., 2002; MOSSER & ZHANG, 2008; BERTI et al, 2017).

1.4 Polimorfismos no gene IL-10

Os polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*) são a forma mais freqüente de variação na seqüência de DNA encontrada no genoma humano e podem ser definidos como regiões pontuais do DNA, onde a base nucleotídica seja variável na população. Os resultados mais simples para uma mutação em uma base única é a substituição de um nucleotídeo por outro, que é conhecido como polimorfismo de único nucleotídeo (FREITAS, 2009). Estes são caracterizados pelas variações genéticas que podem ocorrer quando um único nucleotídeo, adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G), no genoma possuem seqüências alteradas. Embora mais de 99% dos humanos possuam seqüências de DNA que são as mesmas em toda a população, variações nas seqüências de DNA podem ter um grande impacto sobre a forma como os seres

humanos respondem a doenças, bactérias, vírus, toxinas, produtos químicos, drogas e outras terapias (FREITAS, 2009).

A maioria dos SNPs não são responsáveis pelo estado de uma doença, mas pode servir como marcadores biológicos para a identificação de um estado de alteração biológica no indivíduo. No caso de SNPs em genes relacionados à resposta imunológica, a variação pode promover sérias consequências na qualidade da resposta contra patógenos e até mesmo contra tumores, pois pode promover um desbalanço dessa resposta, tornando o indivíduo mais ou menos susceptível ao desenvolvimento de certas patologias.

No gene da IL-10, que está localizado no cromossomo 1q31-31, com tamanho de 4,8 kb (quilobases), contendo 5 exons e 4 íntrons que codificam 178 aminoácidos, já foram reportados, até o momento, pelo menos 50 *loci* polimórficos. Os três SNPs mais comuns na região promotora da IL-10 que têm sido reportados como significantes influenciadores da transcrição e expressão do gene são -1082A > G (*rs1800870*), -819 T > C (*rs1800871*) and -592C > A (*rs1800872*) (GUO et al., 2018; ZIDI et al., 2015). Tem sido descrito que esses SNPs podem influenciar a transcrição do níveis de RNA mensageiro (RNAm) de IL-10 e a expressão da proteína *in vitro*, e conseqüentemente desempenha um papel na susceptibilidade para câncer (BARBISAN et al., 2012).

Supõe-se que a região envolvendo a posição -819C>T é relacionada à regulação positiva da expressão do gene IL-10, de forma que a mudança de C (selvagem) para T (mutado) pode interferir na expressão da citocina. Por outro lado, a posição -592 faz parte do sítio de ligação da STAT3 e está envolvida com a regulação negativa da expressão de IL-10 (GOMES, 2014). Em particular, a associação dos alelos G e A no gene *IL-10* na região -1082A>G têm ganhado uma grande importância no estudos de polimorfismo e sua associação com a susceptibilidade a lesões intraepiteliais e câncer cervical, apresentando-se como um sítio de ligação de fatores de transcrição cujo a mudança do alelo A (selvagem) para o alelo G (mutado) aumentaria a produção de IL-10, e conseqüentemente os genótipos AA estariam envolvidos com a baixa produção de IL-10, AG com uma produção intermediária, e GG com a alta produção da citocina (GOMES, 2014; BARBISAN et al., 2012; TURNER et al., 1997).

Algumas pesquisas moleculares têm mostrado que esses polimorfismos podem influenciar e/ou mudar a susceptibilidade de indivíduos para diferentes formas de câncer, como câncer de pescoço e cabeça, câncer gástrico, leucemia, câncer cervical, entre outros (GUO et al., 2018). Foi demonstrado que a IL-10 influencia tanto a susceptibilidade como o curso de várias doenças, e os diferentes polimorfismos no promotor do gene da IL-10 foram associados com a prevalência e gravidade da doença. De fato, alguns estudos informam que 50% a 70% da variabilidade observada da secreção de IL-10 pode ser explicada por fatores genéticos (REUSS et al., 2002; IYER & CHENG, 2012). Trabalhos recentes, por exemplo, sugerem que o alelo -1082G parece ter uma baixa afinidade de ligação com o fator de transição PU.1, um membro da família dos fatores de transcrição *Ets* que inibe a expressão do gene e é produzido por todas as células da linhagem hematopoiética, exceto por células T periféricas, mostrando um aumento na atividade transcricional do promotor da IL-10 (REES et al., 2002; PALADINO et al., 2006; REUSS et al., 2002).

Diante das funções e fontes da IL-10, a expressão ou sinalização prejudicada dessa citocina pode aumentar a depuração de patógenos durante uma infecção aguda, mas também exagerar a resposta inflamatória, resultando em imunopatologia exacerbada e dano ao tecido. Por outro lado, alguns patógenos podem aproveitar a capacidade imunossupressora da IL-10 para limitar a resposta imune do hospedeiro, levando à infecção persistente (IYER & CHENG, 2012).

Muitos estudos têm demonstrado que etnicidade e polimorfismo na citocina possuem papel importante na susceptibilidade a ampla gama de doenças, incluindo câncer cervical (GOVAN et al., 2003). Por isso, identificar as fontes celulares de IL-10, bem como os mecanismos moleculares que regulam a expressão de IL-10 são críticos para desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas contra a patologia associada à produção prejudicial de IL-10 (BROOKS et al., 2006; RONCAROLO et al., 2006; IYER & CHENG, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os SNPs localizados na região promotora do gene da IL-10, -1082A>G (*rs1800896*) e -819C>T (*rs1800871*), a partir de amostras de sangue periférico de mulheres brasileiras saudáveis e com lesão intraepitelial e câncer cervical, com o intuito de verificar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos estudados e a associação com desenvolvimento de lesões e câncer cervical.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos -1082A>G (*rs1800896*) e -819C>T (*rs1800871*), na região promotora do gene *IL-10* em mulheres com lesão intraepitelial e câncer cervical, e saudáveis;
- Verificar a possível associação do genótipo relacionados à alta produção de IL-10, genótipo GG, do polimorfismo -1082A>G (*rs1800896*), e genótipo TT, do polimorfismo -819C>T (*rs1800871*), na região promotora do gene *IL-10*, com o desenvolvimento de lesão intraepitelial e câncer cervical em mulheres.

3. METODOLOGIA

3.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer, sob o parecer nº 68615417.0.0000.5293 , no qual as pacientes só participaram do estudo ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), subjugado a este protocolo.

3.2 Delineamento do Estudo

O estudo de dois polimorfismos da região promotora (-1082A>G e -819C>T) do gene *IL-10* é analítico transversal do tipo descritivo, com mulheres que procuraram atendimento para rastreamento de câncer cervical na Maternidade-Escola Januário Cicco (MEJC) e Liga Norte Riograndense Contra o Câncer (LIGA), ambos localizados na cidade de Natal/RN, e doadoras de sangue no Instituto de Hemoterapia do Nordeste (IHENE), localizado na cidade do Recife/PE.

As pacientes que foram incluídas no estudo são mulheres maiores de 18 anos de idade que aceitaram participar do estudo, tiveram amostra de sangue periférico coletada e tinham no prontuário médico resultados de citologia cervical e biópsia. Os casos foram considerados todas as mulheres atendidas na MEJC e LIGA e que, na base de dados, apresentavam citopatológico alterado, a partir da análise dos prontuários médicos. O número definido para os casos, definido como grupo alterado, na qual se enquadra mulheres diagnosticadas com LSIL, HSIL ou câncer cervical, foi de 142 mulheres. Os controles foram considerados mulheres saudáveis, com citopatológico sem lesão, podendo apresentar resultado de inflamação apenas. O grupo controle foi de 167 mulheres, sendo 41 pacientes atendidas na MEJC e LIGA, e 126 mulheres saudáveis doadores de sangue do IHENE, que negaram histórico familiar de câncer e doenças autoimunes.

3.3 Coleta de amostras e de dados

O estudo laboratorial foi realizado no Laboratório em Pesquisa de Imunologia Celular e Molecular (LAPIM) nas dependências do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFRN; no Laboratório de Imunogenética (LIG) e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas, sendo estes no Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz/PE. Os prontuários médicos das pacientes foram disponibilizados pelas locais de coleta e avaliados para registros dos resultados citopatológicos e posterior enquadramento da paciente nos grupos. As características sócio-demográficas de todas as participantes foram coletadas através da aplicação de um formulário, para avaliação e descrição da população estudada. Por fim, era feita a coleta de, aproximadamente, 4 mL de sangue periférico da paciente em tubos de coleta contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), em seguida, homogeneizado por inversão e armazenados à uma temperatura de 2 a 6 °C até o momento da extração de DNA.

3.4 Extração de DNA total a partir de células do sangue periférico e preparo das amostras

A extração de DNA foi realizada a partir do método *salting out*, que consiste na lise das membranas das células, com a liberação do DNA, e posterior separação

do DNA dos componentes proteicos, a partir da remoção das proteínas através da saturação do meio (SPEROTTO, 2014). O processo inicialmente promove a transferência da amostra de sangue para um tubo Falcon, de fundo cônico, para realização da lise de células eritrocitárias, com três ou mais lavagens, utilizando Tampão de Lise I, que contém 10 mmol/L de Tris-HCl com pH 8.0, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L EDTA com pH 8.0, e 25 mL/L Triton X-100 (SALAZAR, 1998), em centrifugação de 3.600 rpm por 7 minutos para formação de pellet, a cada lavagem, até a remoção total de hemoglobina. Em seguida, são adicionados ao pellet 900 µL de Tampão de Lise II, contendo 10 mmol/L Tris-HCl com pH 8.0, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L EDTA com pH 8.0, 0.4 mol/L NaCl, and 10 g/L dodecil sulfato de sódio (SDS) (SALAZAR, 1998), que por sua vez promove a lise das células leucocitárias, 600 µL de Cloreto de Sódio 6M e 220 µL de Perclorato de Sódio, sais que deixam o meio hipertônico, promovendo a precipitação de proteínas, e 25 µL de SDS 10%, detergente que dissolve lípidos, e portanto a membrana celular e nuclear. A adição e combinação destes reagentes ao *pellet* livre de hemoglobina promove a fragmentação das células leucocitárias, liberando o DNA para o meio, e a precipitação das proteínas após uma centrifugação de 3.600 rpm por 7 minutos. Assim, 750 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf, devidamente identificado, e adicionados o mesmo volume de isopropanol, para aglutinação do DNA. O material ficou armazenado em -20° C por, no mínimo, 18 horas, para a segunda etapa da extração.

A segunda etapa deste processo de extração de DNA consistiu em duas etapas de lavagem com etanol a 70%, que por sua vez promove a precipitação do DNA. Antes das lavagens foi feita uma centrifugação 10.000 rpm por 5 minutos, em centrífuga Mini Spin, com a amostra ainda embebida em isopropanol, para precipitação de DNA e descarte do álcool. Em seguida, para cada etapa foram adicionados 1000 µL de etanol a 70% e centrifugados nas mesmas condições, formando um pellet de DNA da amostra, e o sobrenadante contendo sais e outros reagentes indesejáveis é descartado em cada etapa. Ao final, realizou-se uma rotação máxima por poucos segundos (*spin*) na amostra, para que todo o álcool ainda presente no tubo seja separado do precipitado, deixando-o evaporar em temperatura ambiente. Após isso, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL água

Milli-Q (água autoclavada). Todo o processo de extração de DNA foi realizado no LAPIM (Natal/RN).

Após a extração completa, as amostras de DNA eram enviadas ao Instituto de Medicina Tropical da UFRN para quantificação. O método garantia a razão 260/280 (pureza) aproximadamente de 1,80 (SALAZAR, 1998).

As amostras que atendiam ao critério de inclusão deste estudo foram selecionadas e alíquotadas para a análise do polimorfismo da região promotora do gene *IL-10* no LIG (Fiocruz/PE), no período de novembro a dezembro de 2018. Até serem utilizadas para análise do polimorfismo, as amostras ficaram armazenadas em -20°C.

3.5 Análise dos polimorfismos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene IL-10

A região promotora do gene *IL-10* foi amplificada a partir do DNA genômico extraído das amostras, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada em termociclador SimpliAmp (Applied Biosystem, California - USA). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo H₂O DEPC, tampão de PCR 1X; 3,0 mM de MgCl₂; 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 0,4 pmol de cada iniciador, 1,6% de Dimetilsulfóxido (DMSO), 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA de cada paciente. As condições de amplificação da sequência estão descritas no Quadro 1. Os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de interesse foram: IL-10 down 5' TAAATATCCTCAAAGTTCC 3' e IL-10 up 5' AGGTAGAGCAACACTCCTCGTC 3'. O tamanho do produto amplificado corresponde à aproximadamente 650 pb. Após a amplificação das regiões de interesse, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% com *Sybr safe* e, posteriormente, visualizadas em fotodocumentador Transilluminator (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta, para confirmação da amplificação da região de interesse. As amostras foram sequenciadas utilizando o protocolo Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, California - USA) no equipamento ABI Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, California - USA). Para reação do sequenciamento foi utilizado apenas o primer IL-10 down e adicionado à reação DMSO, a fim de evitar a formação de

background que pudesse interferir na leitura do gráfico de cromatografia, uma vez que este funciona como desnaturante, facilitando a desnaturação total das fitas do DNA, principalmente em sequência que é rica em conteúdo CG (OLIVEIRA, 2012), como é o caso.

Quadro 1 - Condições da ciclagem para amplificação da sequência reguladora do gene *IL-10*.

Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
94	3 minutos	1x
94	45 segundos	40x
54	45 segundos	
72	1 minuto	
72	7 minutos	1x
10	∞	-

Fonte: A autora, 2018.

3.6 Análise computacional

Os cromatogramas foram analisados com os softwares Lasergene SeqMan 7.0 (DNASTAR, Wisconsin - USA) e MEGA X (Pennsylvania State University, Pensilvânia - USA). As frequências alélicas e genotípicas foram analisadas por cálculos desenvolvidos na plataforma de planilhas Excel e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado através da plataforma online OEGE (Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies) (RODRIGUEZ et al., 2009).

3.7 Análise estatística

As informações clínicas e laboratoriais foram analisadas com o software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, California - USA). A análise de associação utilizou o teste exato bicaudal de Fisher, e o *odds ratio* (OR) quando indicado, com seu intervalo de confiança 95% (CI 95%) sendo considerado significativo estatisticamente quando o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Em relação aos dados demográficos obtive-se os seguintes achados: a média de idade das participantes do estudo foi de 38 anos (desvio padrão $\pm 12,11$). Vale ressaltar, que não houve diferenças significativas entre o grupo alterado e o grupo controle com relação a idade.

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos -1082A>G e -819C>T da região promotora da IL-10 nos grupos patologia cervical, que engloba LSIL, HSIL e CC, e grupo controle estão descritas na Tabela 1. Posteriormente o grupo alterado foi estratificado em grupo de lesão intraepitelial (n=101, sendo 24 LSIL e 77 HSIL) e grupo câncer cervical (n=41), para comparação de cada um separadamente com o grupo controle. As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados para grupo lesão intraepitelial e para o grupo câncer cervical, comparadas ao grupo controle, estão nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Através do Teste de Chi-Quadrado de Pearson verificou-se que população de patologia cervical para o polimorfismo na região -1082A>G não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), assim como a população enquadrada no grupo lesão intraepitelial. As demais populações, em ambos os polimorfismos estudados, apresentavam-se em HWE (Quadro 2).

Quadro 2 Teste de Chi-Quadrado de Pearson para avaliação de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	Grupo alterado (SIL e câncer)	Lesão intraepitelial	Câncer	Controle
Polimorfismo -1082 (A>G)	$\chi^2= 7.92^*$	$\chi^2= 4,84^{**}$	$\chi^2= 2.34$	$\chi^2= 2.35$
Polimorfismo -819(C>T)	$\chi^2= 0.12$	$\chi^2= 0.63$	$\chi^2= 0.35$	$\chi^2= 3.44$

**p value* <0,005.

** *p value* <0,05.

Fonte: A autora, 2018.

Deste estudo, para o polimorfismo -1082A>G, a frequência alélica do alelo A foi vista em 65,0% das controles e do alelo G em 35,0%. No grupo alterado a

frequência do alelo A foi de 68,3% e do alelo G de 31,7%; no grupo de lesão intraepitelial apenas, o alelo A foi visto em 68,3% e alelo G em 31,7%; e no grupo composto por apenas pacientes com câncer cervical, a frequência alélica de A foi vista em 68,3% e o alelo G em 31,7%. Com relação a frequência genotípica, no grupo controle, a frequência do genótipo AA foi de 44,9%, AG de 40,1%, e GG de 15%. No grupo alterado, a frequência do genótipo AA foi de 41,5%, AG de 53,5%, e GG de 5%; no grupo lesão intraepitelial, a frequência genotípica de AA foi de 41,6%, AG de 53,5% e GG de 4,9%; e o grupo câncer, AA foi visto em 41,5%, AG em 53,7% e GG em 4,9%.

Para o polimorfismo -819C>T, a frequência alélica do alelo C foi vista em 62,6% das controles e do alelo T em 37,4%. No grupo alterado, a frequência do alelo C foi de 64,4% e do alelo T de 35,6%; no grupo de lesão intraepitelial, o alelo C foi de 64,0% e do alelo T de 36%; e no grupo composto por apenas pacientes com câncer cervical, a frequência alélica de C foi de 64,6% e do alelo T de 35,4%. Com relação a frequência genotípica, no grupo controle, a frequência do genótipo CC foi de 42,5, CT de 40,1%, e CC de 17,4%. No grupo alterado, a frequência do genótipo CC foi de 40,8%, CT de 47,2%, e CC de 12%; no grupo lesão intraepitelial, a frequência genotípica de CC foi de 39,6%, CT de 49,5%, e CC de 11%; e o grupo câncer, CC foi de 43,9%, CT de 41,5%, e CC de 14,6%. O alelos A e C, considerados selvagens, e com maior frequência no grupo controle, foram usados como pontos de referência, assim como os genótipos AA e CC, e a associação relativa da doença dos alelos G e T, e genótipos AG e GG, assim como CT e TT, respectivamente, foi expressa pelo cálculo dos *odds ratio* (OR) e seu CI 95%.

As pacientes do grupo alterado apresentaram uma distribuição da frequência dos alelos A e G na posição -1082A>G da região promotora do gene *IL-10* semelhantes ao grupo controle (A vs. G OR= 0,86; CI 95% 0,59 - 1,20; p=0,393), assim como visto na frequência dos alelos C e T na posição -819C>T (C vs. T OR= 0,92; CI 95% 0,66 - 1,28; p=0,674). Estratificando o grupo alterado, separadamente, em lesão intraepitelial e câncer cervical, as frequências alélicas também não mostraram nenhuma diferença significativa, comparado ao controle (Lesão intraepitelial: A vs. G OR= 0,86; CI 95% 0,59 - 1,25; p=0,452; C vs. T OR= 0,94; CI

95% 0,66 - 1,34; p=0,787) (Câncer cervical: A vs. G OR= 0,86; CI 95% 0,51 - 1,44; p=0,606; C vs. T OR= 0,91; CI 95% 0,55 - 1,51; p=0,799).

Com relação às frequências genóticas, no sítio polimórfico -1082 A>G, o genótipo GG mostrou-se diferente no grupo alterado em relação ao controle, com significância estatística (OR= 0,35, CI 95% 0,14 - 0,88; p=0,026). Posteriormente, estratificando o grupo alterado em grupo lesão intraepitelial e grupo câncer, foi observado uma diferença com significância estatística do genótipo GG no grupo lesão intraepitelial comparado ao grupo controle (OR= 0,36; CI 95% 0,13 - 1,00; p=0,049), e do grupo câncer não houve nenhuma significância estatística entre a frequência em nenhum dos genótipos, comparada ao grupo controle. Com relação ao sítio polimórfico na posição -819C>T, também não houve diferença estatística entre os grupos para nenhum dos genótipos.

Tabela 1. Frequência alélica e genotípica dos sítios polimórficos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene *IL-10* em pacientes com lesão intraepitelial e câncer cervical.

	ALTERAÇÃO CERVICAL		CONTROLES		pvalue	Odds Ratio	CI 95%
	n	Freq	n	Freq			
-1082 A>G	284		334				
Alelo A	194	0,6831	217	0,6497	Referência		
Alelo G	90	0,3169	117	0,3503	0,3935	0,86	0,61 - 1,204
Genótipo	142		167				
AA	59	0,4155	75	0,4491	Referência		
AG	76	0,5352	67	0,4012	0,1493	1,44	0,89 - 2,31
GG	7	0,0493	25	0,1497	0,0266	0,35	0,14 - 0,88
-819 C>T	284		334				
Alelo C	183	0,6444	209	0,626	Referência		
Alelo T	101	0,3556	125	0,374	0,6754	0,92	0,66 - 1,28
Genótipo	142		167				
CC	58	0,4085	71	0,425	Referência		
CT	67	0,4718	67	0,401	0,4593	1,22	0,75 - 1,98
TT	17	0,1197	29	0,174	0,3885	0,72	0,36 - 1,43

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 2. Frequência alélica e genotípica dos sítios polimórficos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene *IL-10* em pacientes com lesão intraepitelial.

	LESÃO INTRAEPITELIAL	CONTROLES	

	n	Freq	n	Freq	pvalue	Odds Ratio	CI 95%
-1082 A>G	202		334				
Alelo A	138	0,683	217	0,6497	Referência		
Alelo G	64	0,317	117	0,3503	0,4518	0,86	0,59 - 1,25
Genótipo	101		167				
AA	42	0,416	75	0,449	Referência		
AG	54	0,535	67	0,401	0,1877	1,44	0,85 - 2,42
GG	5	0,050	25	0,150	0,0498	0,36	0,13 - 1,00
-819 C>T	222		334				
Alelo C	142	0,640	209	0,626	Referência		
Alelo T	80	0,360	125	0,374	0,7879	0,942	0,66 - 1,34
Genótipo	101		167				
CC	40	0,396	71	0,425	Referência		
CT	50	0,495	67	0,401	0,3434	1,32	0,77 - 2,26
TT	11	0,109	29	0,174	0,4357	0,67	0,30 - 1,49

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 3. Frequência alélica e genotípica dos sítios polimórficos -1082A>G e -819C>T da região promotora do gene *IL-10* em pacientes com câncer cervical.

	CÂNCER CERVICAL		CONTROLES		pvalue	Odds Ratio	CI 95%
	n	Freq	n	Freq			
-1082 A>G	82		334				
Alelo A	56	0,683	217	0,650	Referência		
Alelo G	26	0,317	117	0,350	0,6058	0,86	0,51 - 1,44
Genótipo	41		167				
AA	17	0,415	75	0,449	Referência		
AG	22	0,537	67	0,401	0,3671	1,45	0,71 - 2,96
GG	2	0,049	25	0,150	0,2363	0,36	0,07 - 1,64
-819 C>T	82		334				
Alelo C	53	0,646	209	0,626	Referência		
Alelo T	29	0,354	125	0,374	0,7990	0,91	0,55 - 1,51
Genótipo	41		167				
CC	18	0,439	71	0,425	Referência		
CT	17	0,415	67	0,401	1,000	1,00	0,47 - 2,10
TT	6	0,146	29	0,174	0,8041	0,82	0,29 - 2,26

Fonte: A autora, 2018.

5. DISCUSSÃO

Os estudos dos polimorfismos de vários genes de citocinas têm sido implicados na indução da suscetibilidade ou proteção ao câncer causados por

agentes infecciosos, devido ao seu papel na determinação da resposta imune do hospedeiro (GOVAN et al., 2003). Sabe-se, a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico está associado ao surgimento de câncer colo uterino (STANCZUK et al., 2001). Um dos fatores que cria um ambiente permissivo para replicação viral são os mecanismos que medeiam a imunovigilância e conseqüentemente a imunoevasão. Trabalhos sugerem que pacientes cujas respostas imunes celulares estão comprometidas têm alta prevalência de lesões cervicais induzidas pelo HPV. O impacto da resposta imune varia com o perfil de citocinas e diferentes fatores de transcrição (STANCZUK et al., 2001). De fato, o antigo paradigma do perfil Th1 e Th2 foi quebrado, e hoje sabe-se que além do perfil Th1, Th2, tem o Th17, Th22, Tregs, Tr1. Os trabalhos mostram, que a predominância das citocinas do tipo Th1 é associada com a eliminação da infecção pelo HPV e regressão das neoplasias intraepiteliais cervicais, enquanto citocinas do tipo Th2, Th17 e Tregs, podem possuir um efeito supressor na resposta imune celular. Desse lado, IL-10 induz a imunossupressão e auxilia no escape imunológico do tumor, promovendo o crescimento do tumor (GOPAL, 2014).

Neste estudo, analisamos a possível relação dos polimorfismos na região promotora do gene da citocina IL-10 na lesão intraepitelial e câncer cervical. Em nossas pacientes, no polimorfismo -1082 A>G da região promotora do gene *IL-10*, o genótipo GG, relacionado ao fenótipo de alta produção de IL-10, apresentou ser significativamente menor no grupo alterado (LSIL, HSIL e câncer cervical) e no grupo apenas de lesão intraepitelial (LSIL e HSIL), quando comparadas ao grupo controle ($p=0,026$; e $p=0,049$, respectivamente), e ambos os grupos apresentaram o OR menor que 1 (um), indicando uma força de relação baixa deste genótipo com surgimento das lesões intraepiteliais e o câncer cervical. No grupo alterado, o OR foi 0,35 (CI 95% = 0,14 - 0,88), e no grupo apenas de lesões intraepiteliais obteve-se OR de 0,36 (CI 95%= 0,13 - 1,00), o que pode indicar que não há influência deste genótipo, alto produtor de IL-10, com o desfecho de lesão intraepitelial e câncer cervical, mostrando nenhuma associação do genótipo GG com a susceptibilidade de desenvolvimento de lesões intraepiteliais. Uma das razões por estes valores entre o grupo alterado e grupo de lesão intraepitelial estarem próximo se dá pelo motivo de que o grupo alterado é composto de 72,67% de pacientes com lesão intraepitelial

cervical (LSIL e HSIL). O grupo câncer comparado ao controle não houve nenhuma diferença significativa. E em relação ao polimorfismo -819 C>T, também não houve nenhuma diferença estatística entre casos e controle.

Com relação ao polimorfismo -1082A>G na região promotora da *IL-10*, no estudo de Szoke et al. (2004), feitos com mulheres da Hungria com atipias citológicas, no qual incluiu LSIL, HSIL e câncer cervical, a média de idade das paciente era entre 31 e 35 anos, próximo a média de idade das pacientes deste estudo (38 anos). O estudo também utilizou com o grupo controle 168 pacientes doadores de sangue, assim como este. Neste SNP, as frequências dos alelos A e G no grupo controle foi de 51% e 49%, respectivamente, e as frequências genotípicas foram AA 25%, AG 51% e GG 24%. Entre as pacientes com anormalidades cervicais (sem diferenciar HPV positivas e negativas), foi vista uma distribuição nas frequências do genótipo alterada (desequilíbrio de Hardy-Weinberg), que também foi vista neste estudo, com o alelo A na frequência de 58% e do alelo G de 42%. A frequência do genótipo AA dessas pacientes foi detectado em 35%, genótipo AG em 49% e GG em 16%. O estudo então traz como resultado que, na análise da associação da patologia e os genótipos do polimorfismo -1082A>G, deve ser levado em conta que o alelo A é mais frequente do que o alelo G na maioria das populações não caucasianas, e que foi vista uma resistência à atipia citológica, não relacionada ao HPV, significativamente diferente em pacientes com genótipo GG comparado aos controles (OR=0,27, CI 95% 0,11–0,63; p=0,05), concluindo que mulheres carreadores do alelo G nesta posição demonstraram menos susceptibilidade à alterações citológicas não relacionadas a infecção do HPV, o que corrobora com o achado deste estudo com relação ao genótipo GG. O mecanismo pelo qual a habilidade no aumento da produção de IL-10 pode proteger contra mudanças celulares reativas pode ser explicado pelas propriedades anti-inflamatórias da IL-10, tendo em vista que a citocina regula negativamente as mudanças regenerativas e displásicas das células no epitélio escamoso, esse efeito é mediado através dos receptores de IL-10 nos queratinócitos, podendo ter desfavorável a progressão da lesão e desenvolvimento ao câncer (SZOKE et al., 2004).

No estudo de Barbisan et al. (2012), os resultados apresentados mostram nenhuma relação entre os polimorfismos da região promotora do gene *IL-10* com as lesões e câncer cervical. A idade média do grupo controle foi de 37 anos (DP \pm 11) e 44 anos (DP \pm 11) para o grupo caso. Nesse estudo, o impacto do polimorfismo da *IL-10* foi avaliado em 298 amostras correspondendo a 122 casos de câncer cervical e 176 controles saudáveis, obtidos de mulheres brancas da Argentina, e nenhum polimorfismo pareceu estar associado com a susceptibilidade de desenvolver câncer cervical ou infecção pelo HPV. A frequência dos alelos do polimorfismo -1082A>G não mostrou diferença estatística significativa ($p > 0,05$), tendo a frequência do alelo A de 68,8% e alelo G de 31,2%, nos controles; e nos casos foi de 66% para o alelo A e 34% para o alelo G. Com relação a frequência genotípica, a frequência dos genótipos no grupo controle foi de AA com 44,9%, AG com 47,2% e GG com 8,0%. Estas frequências apresentam-se bastante similares às frequências encontradas neste estudo. Apesar de nenhuma diferença significativa, o OR foi de 1,10 para genótipo AG, ajustado pela idade, ($p = 0,737$) e para o genótipo GG foi OR=0,56 ($p = 0,338$), similares aos achados deste estudo.

Outros estudos também não apresentaram nenhuma associação significativa entre o polimorfismo da posição -1082>G com a lesão intraepitelial e câncer cervical, como estudo de Zoodsma et al (2005), feito em mulheres holandesas, que apresentou a frequência alélica do alelo G com 53,2% nas controles e nas pacientes casos de 52,5%, e do alelo A com 46,8% e 47,5%, respectivamente. A frequência das pacientes controles para o genótipo AA foi 21,5%, AG de 35,7% e GG 27,9%; já para pacientes casos, que incluíam mulheres com lesão intraepitelial cervical e câncer cervical, o genótipo AA foi de 23,2%, AG foi de 48,7% e GG de 28,2%. Em seguida, estratificando para os casos para: HSIL, os genótipos AA representava 21,3%, AG 47,9% e GG 30,9%; e o grupo câncer com frequência do genótipo AA de 23,1%, AG de 48,9% e GG de 28,0%. Os valores deste estudo já se apresentam um pouco distantes dos achados neste estudo, e nenhum grupo apresentou $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle.

Mais estudos que não apresentaram diferenças significativas no polimorfismo -1082A>G comparando mulheres com câncer cervical e controles saudáveis, parecem condizentes com os achados deste estudo, apesar do número amostral (n)

desse grupo ser baixo neste estudo. Como o estudo de Govan et al. (2003), que utilizou dois grupos étnicos sul-africanos, no polimorfismo -1082A>G, apresentando o grupo câncer cervical com as seguintes frequências do genotípicas: AA de 45%, AG de 41% e GG de 15%, e a frequência alélica foi alelo A de 55% e alelo G 45%; já o grupo controle teve a frequência do genótipo AA em 42%, AG em 36% e GG em 23%, com frequência alélica do alelo A de 60% e alelo G de 40%. Em Zidi et al. (2015), que compreendeu um estudo com 86 mulheres com câncer cervical e 126 controles, na Tunísia, com a média da idade de 51,26 (DP \pm 0,70) anos para os pacientes e 44,84 (DP \pm 10,60) anos para as controles saudáveis. Nesse estudo, na população caso, a frequência do alelo A foi de 59%, e o alelo G de 41%; e na população controle, alelo A foi de 60% e alelo G de 40%, sem diferença estatística na frequência alélica entre casos e controles. A frequência genotípica da população caso com genótipo AA foi de 38,4%, AG foi de 41,9% e GG de 19,7%; e na população controle, com genótipo AA foi de 40,5%, AG foi de 39,7% e GG de 19,8%, que também não apresentou diferença estatística, de forma que não se observou associação significativa entre o polimorfismo -1082A>G com o desfecho do câncer cervical (ZIDI et al., 2015). Roh et al. (2002), também observou nenhuma associação no polimorfismo do gene *IL-10* entre as pacientes sul coreanas com câncer cervical comparados em relação ao controle, uma vez que nesse estudo, na posição -1082A>G, só foi encontrado o genótipo AA tanto nas pacientes casos como controle, conseqüentemente a frequência do alelo G era 0% e do alelo A era 100%, em ambos os grupos. Dessa forma, a influência das diferentes funções relacionado ao polimorfismo do sítio -1082>G é presumivelmente ausente entre as mulheres sul-coreanas devido ao seu monomorfismo neste SNP (ROH et al., 2002). Em um estudo recente, de DU et al. (2019), com 522 mulheres chinesas com câncer cervical entre março de 2014 e julho de 2017 e 550 mulheres controle, apresentou como resultado a frequência alélica do alelo A em 67,1% das pacientes e 66,7% das controles, e do alelo G de 32,9% das pacientes e 33,3% das controles, sem significância estatística ($p=0,837$). Com relação ao genótipo, no modelo codominante obteve-se para a frequência do genótipo AA de 52,3%, AG de 29,7% e GG de 18 % nas pacientes; já no controle AA foi de 51,3%, AG de 30,9% e GG 17,8%, sem significância estatística, assim como em outros modelos genéticos

trabalhados ($p > 0,05$), mostrando outro resultado sem associação significativa do polimorfismo com o risco de câncer cervical, assim como no estudo de Torres-Poveda et al. (2016), que usando o mesmo modelo genético, obteve-se para o genótipo AA a frequência de 60,5% dos casos e 55% dos controles, genótipo AG com 35% dos casos e 39% dos controles e GG 4,5% dos casos e 6% dos controles. Já a frequência alélica foi do alelo A com 78% e alelo G com 22% nos casos, e no controle, alelo A com 74,5% e G com 25,5%, apresentando nenhuma diferença estatística entre casos e controles.

E ainda há estudos que apresentam resultados controversos a este estudo. Matsumoto et al. (2010) realizou um estudo com 440 mulheres japonesas, sendo 173 controles e 267 casos, no qual 163 tinha lesão intraepitelial e 104 com câncer cervical invasivo. A frequência alélica do alelo A nos casos era de 53% e alelo G de 47%; já nos controles o alelo A era de 95% e alelo G de 5%, bem diferente do apresentado neste estudo. Já a frequência genotípica nos casos foi representada por 76,4% com AA, 21% com AG e 2,6% com GG, e nos controles 90,1% com AA, 9% com AG e 0,6% com GG. Esses valores mostraram que nessa população a frequência de portadores dos alelo G (genótipos AG ou GG), que está associada à maior produção de IL-10, aumentou significativamente de acordo com a gravidade da doença: 9,8% nas pacientes controle; 19,6% nas pacientes com lesão; e 29,8% em pacientes com câncer cervical ($p < 0,001$) (MATSUMOTO et al., 2010). Assim, as mulheres com genótipos GG ou AG foram estimadas com um risco significativamente maior de desenvolver câncer cervical do que as mulheres com genótipo AA (OR=3,9; CI 95% 2,1 - 7,3; $p < 0,001$). Outro estudo, feito na Índia, por Singhal et al. (2014), com 506 pacientes, sendo 256 casos (208 com câncer cervical e 48 com lesões intraepiteliais) e 250 controles saudáveis, a frequência alélica do alelo A nos casos era de 48% e alelo G de 52%, já nos controles o alelo A era de 61% e alelo G de 38%. As distribuições genotípicas de AA, AG e GG foram 40, 43 e 17% para controles, enquanto nos casos 17, 38 e 45%, respectivamente. Quando foi comparado os controles com os casos, foi observado que os pacientes do grupo lesão que tinham o genótipo AG + GG apresentavam um risco 2 vezes maior de câncer do colo do útero em comparação aos controles (OR = 2,24, CI95% = 1,09-4,60; $p = 0,04$). Em consideração a frequência alélica, os dados desse estudo

indicam que quando a frequência do alelo G é elevada nos casos, e o aumento de risco de câncer cervical também aumenta. E Stancuzk et al (2001) fez um estudo no Zimbabué, com 77 mulheres com câncer cervical e 69 mulheres saudáveis. A frequência alélica nessa população foi de 57% do alelo A e 43% do alelo G, no grupo de câncer; e 92% do alelo A e 8% do alelo G, no grupo controle. O genótipo GG, relacionado a alta produção de citocina IL-10, foi encontrada em 1,4% e em nenhum dos controles, o genótipo para produção média (AG) foi encontrado em 40,2% pacientes com câncer em comparação com 16% nos controles. O genótipo AA (baixo produtor) foi predominantemente detectado em 58,4% das mulheres com câncer comparado a 84% das mulheres saudáveis. Segundo esse estudo, as pacientes com câncer foram significativamente ($p=0,001$) mais propensas ter o genótipo de produtor médio de IL-10, designado pelo genótipo AG, o que se assemelha com nossos resultados, apesar do genótipo AG não ter tido diferença significativa comparado ao controle, mas apresentou o OR maior que 1 (um).

Estudos que abordam a relação do polimorfismo -819C>T com lesão intraepitelial e câncer cervical é menos extensivo que o polimorfismo anteriormente citado. Em Roh et al. (2002), na posição -819C>T, o alelo C tinha frequência 30% e o alelo T de 70% no grupo controle, enquanto nos casos, o alelo C era de 27% e T de 73%. O genótipo CC apresentou 8%, CT em 43% e TT em 49% nos controles, e nos casos o genótipo CC apresentou 8%, CT em 39% e TT em 53%, não tendo nenhuma significância estatística ($p=0,69$). Esse resultado corrobora, de fato, com os resultados neste estudo. E Singhal et al. (2014), a frequência do genótipo CC, CT, TT foi de 28, 48 e 24% nos controles, enquanto 21, 50 e 29% nos casos, respectivamente (Singhal et. al, 2014). Ao comparar a distribuição genotípica entre os grupos nenhum houve diferença significativa também. Singh et al. (2009), fez um estudo focando apenas no polimorfismo -819C>T, no qual participaram 150 pacientes com câncer cervical e 162 mulheres saudáveis atendidas na cidade de Lucknow, na Índia. A frequência alélica na posição -819C>T foi do alelo C com 59,7% e alelo T com 40,3%; e controles, tendo a frequência do alelo C de 66,3% e do alelo T de 32,6%, sem diferença estatística ($p=0,051$). A frequência genotípica, adotando apenas o modelo dominante, foi o genótipo CC com 37,3% dos casos

contra 47,53% dos controles e CT+TT com 62,7% dos casos contra controles 52,5%, não apresentando nenhuma diferença significativa ($p=0,07$).

Zidi et al. (2015), Torres-Poveda et al. (2016) e DU et al. (2019) encontraram resultados controverso aos resultados deste estudo para posição -819C>T, pois mostram diferença significativa entre as frequências alélicas e genóticas neste SNP. O estudo de Zidi et al (2015) observou na sua população controle a frequência do alelo T foi de 30% e o alelo C 70%, o mesmo refletiu na população controle, sem diferença estatística na frequência alélica entre casos e controles. Na frequência genotípica, a população caso teve 52,3% com genótipo CC, 37,2% com genótipo CT e 10,5% com TT. Na população controle tem 44,4% pacientes com genótipo CC, 52,3% com genótipo CT e 3,2% com genótipo TT. Desse estudo, o genótipo TT teve uma frequência significativamente maior comparada ao controle, 10.5% vs. 3.2% ($p = 0.028$), com $OR=4,00$, indicando relação positiva com o caso de câncer. O estudo de Torres-Poveda et al. (2016), utilizando 400 mulheres da Cidade do México, sendo 200 controles e 200 casos com câncer cervical, observou em modelo co-dominante, a distribuição genotípica para o genótipo CC no grupo caso com 24,5% e controle com 40,5%; CT com 48,5% dos casos e 42,5% dos controles, e TT com 27% dos casos e 17% do controles. Já a frequência alélica obteve-se alelo C com 48,75% e T com 51,25% no grupo caso, e no controle, o alelo C com frequência de 61,75% e T de 38,25%. Os resultados apresentaram diferença estatística dos portadores do alelo T comparados aos controles ($OR = 1,67$, $CI\ 95\ %\ 1,92-2,35$; $p = 0,003$), e no modelo co-dominante, o genótipo TT apresentou $OR = 2,60$ ($CI\ 95\ %\ 1,33-5,13$; $p = 0,004$). E DU et al. (2019), também traz o estudo no polimorfismo -819C>T, com relação a frequência alélica, obteve-se: alelo C com 47,3% das pacientes e 45,7% controles; alelo T com 52,7% das pacientes e 54,3% controles, sem significância estatística ($p=0,460$). Com relação ao genótipo, no modelo codominante obteve-se para esta posição, o genótipo CC com 19,4%, CT com 55,9% e TT com 24,7%, nas pacientes; já no controle, o genótipo CC com 20,4%, CT com 50,7% e TT 28,9%, mostrando significância estatística do genótipo CT dos casos comparados ao controle, com associação positiva ao câncer cervical ($OR= 1,29$, $CI\ 95\ %\ 1,05 -1,58$; $p=0,013$).

O estudo de Chagas et. al (2013) feito com mulheres brasileiras, com os mesmos polimorfismos deste estudo, utilizou 364 pacientes, sendo 171 com lesão cervical e HPV-positivas e 193 mulheres saudáveis (citologia normal) com resultado HPV-negativo. A idade das pacientes com anomalia cervical positiva para HPV (casos) variou de 18 a 63 (média de 34,7; DP± 10,8) e a idade dos controles variou de 18 a 65 anos (média de 34,7; DP± 11,2). Dado parecido com a média de idade das pacientes deste estudo. Com relação ao polimorfismo -819C>T para o grupo caso, as frequências dos alelos C e T foram de 59% e 41%, respectivamente. Para o grupo controle, as frequências C e T foram 63% e 37%, respectivamente. A frequência genotípica observada no grupo caso foi de 33% com genótipo CC, 52% CT e 15% TT. No grupo controle, a frequência do genótipo foi de 41% com genótipo CC, 44% com CT e 15% com TT. Usando o genótipo CC com referência, com relação às frequências alélicas, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com HPV positivo e lesão intraepitelial cervical e controles saudáveis (alelo C vs. T: OR = 1,15, CI 95%: 0,84–1,57 e p = 0,36). E nas frequências genotípicas também não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos controle e caso (CC vs. CT: OR = 1,48, CI 95%: 0,92–2,39 e p = 0,11; CC vs. TT: OR = 1,15, CI 95%: 0,58–2,27 e p = 0,75). Quanto ao polimorfismo -1082A>G, foram analisados para o grupo caso, as frequências dos alelos A e G foram 56% e 44%, respectivamente. Em relação ao grupo controle, as frequências A e G foram 60% e 40%, respectivamente. A frequência do genótipo no grupo caso foi de 33% (AA), 45% (AG) e 22% (GG). No grupo controle, a frequência do genótipo foi de 36% (AA), 48% (AG) e 16% (GG). Com relação às frequências alélicas, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes infectadas pelo HPV/lesões cervicais e os controles saudáveis (alelo A vs. G: OR = 1,18, CI 95%: 0,86-1,60; p = 0,29), e nenhuma diferença foi identificada para as frequências genotípicas também, entre os grupos controle e caso. (AA vs. AG OR = 1,02; CI 95%: 0,62–1,65; p>0,05; AA vs. GG OR = 1,44, CI 95%: 0,76–2,73, p=0,23). Apesar dos alvos populacionais deste estudo e o estudo referido serem parecidos, os resultados divergentes podem ser dar pela falta de relação do polimorfismo e seu efeito com características como detecção do HPV, além da miscigenação das populações de cada estudo.

Tendo em vista o exposto, é possível observar que os resultados de estudos anteriores sobre o efeito do polimorfismo na posição -1082A>G na região promotora do gene da *IL-10* e o risco de lesão intraepitelial e câncer cervical são controversos. Esse polimorfismo tem sido associado com o risco ou a proteção de desenvolver lesões e câncer cervical em populações do Japão, Índia, Zimbábue e Hungria, enquanto estudos na Holanda, Argentina, África do Sul, China, Coreia do Sul, Tunísia, e outro estudo no Brasil, não encontraram nenhuma associação (MATSUMOTO et al., 2010; SINGHAL et al., 2014; STANCZUK et al., 2001; SZOKE et al., 2004; ZOODSMA et al., 2005; BARBISAN et al. 2012; GOVAN et al., 2003; ROH et al. 2002; DU et al., 2019; ZIDI et al., 2015; CHAGAS et al., 2013). Na população japonesa, indiana e do Zimbábue, o genótipo na posição -1082A>G correspondendo a alta e produção intermediária, GG e AG, respectivamente, foram significativamente associados com a severidade da doença cervical (MATSUMOTO et al., 2010; SINGHAL et al., 2014; STANCZUK et al., 2001). Já na população húngara, o genótipo GG parece ter efeito desfavorável ao desenvolvimento do câncer cervical, não relacionada ao HPV (SZOKE et al., 2004). Como apontado por muitos autores, a discrepância dos resultados reportados entre os estudos pode se ser explicada pela frequência do alelo G na população controle: no Japão é de 5%; no Zimbábue é de 8%; no México de 25,5%, e na Hungria é de 49% (MATSUMOTO et al., 2010; STANCZUK et al., 2001; TORRES-POVEDA et al., 2016; SZOKE et al., 2004). Evidentemente, as frequências alélicas deste polimorfismo pareciam diferir amplamente de acordo com a etnia. Em contraste, na população Chinesa têm baixa frequência deste alelo, no estudo de ROH et al. (2001), não apresentou nenhuma paciente com este alelo. A produção anormal de IL-10 já tem sido reportada em pacientes com lesão cervical e câncer invasivo (GIANNINI, AL-SALEH & PIRON, 1998). Também, têm sido mostrado que no sangue periférico, células mononucleares de pacientes com lesão e câncer produzem altos níveis de IL-10 após uma estimulação mitogênica, comparada aos controles. Entretanto, outros estudos têm revelado que IL-10 tem funções imunoestimulatórias (ROH et al., 2002). Como esperado, a frequência do alelo G obtida neste estudo (35%) foi similar ao reportado em outro estudo brasileiro (40%), e também ao reportado na Hungria

(49%), em que foi encontrando uma baixa associação do genótipo GG e lesões intraepiteliais.

Em sistema murino, demonstrou-se que a IL-10 funciona como um fator de diferenciação de células T citotóxicas, promovendo um número maior de CTL ativadas por IL-2 para proliferar e se diferenciar em poderosas células efetoras citotóxicas. Além disso, vários estudos de transfecção gênica de IL-10 mostraram que a citocina tem habilidades para inibir o crescimento de tumores e metástases em vários tipos de câncer, embora os mecanismos não tenham sido esclarecidos (CHEN & ZLOTNIK, 1991; ROH et al., 2002). Este efeito da IL-10 pode atuar inibindo os fatores angiogênicos, como o VEGF, IL-1b, TNF-a, IL-6 e metaloproteinases, ou aumentar a lise de células tumorais dependentes de células NK (KUNDU & FULTON, 1997; STEARNS et al., 1999; ROH et al., 2002; MOSSER & ZHANG, 2008; BERTI et al, 2017). Esses achados podem explicar a relação do genótipo GG como alto produtor da citocina IL-10 e seu efeito desfavorável à progressão das lesões intraepiteliais e possível desenvolvimento do câncer cervical.

Contudo, existem algumas limitações deste estudo que devem ser consideradas. Primeiro, o número limitado do tamanho da amostra pode reduzir a confiabilidade dos resultados e afetar a avaliação das associações entre esses polimorfismos da IL-10 e a suscetibilidade à lesão intraepitelial e câncer cervical, principalmente ao estratificar o grupo alterado. Segundo, fatores de risco adicionais, como detecção da infecção por HPV e tipificação desse vírus nas pacientes ainda não foram considerados. As interações entre fatores genéticos e ambientais e o desenvolvimento do câncer não puderam ser avaliados em este estudo. Terceiro, a associação entre os polimorfismos -1082A> G e -819T> C e o risco de desenvolvimento da patologia cervical foi analisada separadamente, e não foi vista a influência dos haplótipos relacionados a esses alelos. Por fim, embora na literatura, resultados sugerem que uma predisposição genética para produzir níveis mais elevados de IL-10 possa ser importante na patogênese do câncer do colo do útero, acreditamos que nenhuma das citocinas deve ser vista isoladamente. Portanto, seria importante estudar não apenas polimorfismos de outras citocinas, mas também seus receptores, que também são polimórficos. Esses questionamentos poderão ser abordados em estudos futuros.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em consideração final, neste estudo descritivo, verificou-se que o polimorfismo -819C>T (*rs1800871*), da região promotora do gene *IL-10*, não teve diferença significativa entre a população estudada comparada a população controle. Contudo, no polimorfismo -1082A>G (*rs1800896*) foi encontrado que a frequência do genótipo GG foi estatisticamente menor no grupo alterado (LSIL, HSIL e câncer cervical) e no grupo lesão intraepitelial cervical (LSIL e HSIL), quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, o principal achado do nosso estudo sugere que neste SNP, o genótipo GG, relacionado a alta produção de IL-10, parece não apresentar efeito de associação ao desenvolvimento de SIL, uma vez que o *odds ratio* foi menor que 1 (um).

Estudos maiores são necessários para entender completamente a predisposição genética para a progressão das lesões intraepiteliais e o desenvolvimento do câncer cervical, incluindo interações entre fatores genéticos e ambientais, além de uma análise de regressão linear, a influência do haplótipo e das interações com outras citocinas. Mas conclui-se que esse marcador pode ser alvo de novas pesquisas, para avaliar e desenvolver programas de prevenção precoce e possivelmente ser clinicamente usado como biomarcador imunológico em pacientes com lesões intraepiteliais cervicais.

REFERÊNCIAS

1. BARBISAN, Gisela et al. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.1549-1556, 17 maio 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0408-1>.
2. BERTI, Fernanda Costa Brandão et al. The role of interleukin 10 in human papillomavirus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine & Growth**

- Factor Reviews**, [s.l.], v. 34, p.1-13, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.002>.
3. BROOKS, David G et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature Medicine*, [s.l.], v. 12, n. 11, p.1301-1309, 15 out. 2006. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1492>.
 4. BURK, Robert D.; HARARI, Ariana; CHEN, Zigui. Human papillomavirus genome variants. **Virology** 445 (2013), [s.l.], p. 232–243, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>.
 5. CHAGAS, Bárbara Simas et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 19, p.32-37, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.016>.
 1. CHEN, W F; A ZLOTNIK,. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. **The Journal Of Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 147, p.528-534, jul. 1991.
 6. CHEN, Z. et al. Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 79, n. 11, p.7014-7023, 12 maio 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.11.7014-7023.2005>.
 7. DOORBAR, John et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews In Medical Virology**, [s.l.], v. 25, p.2-23, mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1822>.
 8. DU, Guang-hui et al. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 are associated with an increased risk of cervical cancer. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 66, p.154-161, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.015>.
 9. ESTIMATIVAS 2018. Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.
 10. FREITAS, L C; OLIVEIRA, A V. **UTILIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs) NA IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS GENÉTICAS**. Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Centro Universitário de Maringá . 30 de outubro de 2009.
 11. GIANNINI; AL-SALEH; PIRON. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clinical & Experimental Immunology**, [s.l.], v. 113, n. 2, p.183-189, ago. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00639.x>.
 12. GLOBOCAN, World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>. Acesso em: 13/12/2018.
 13. GOMES, Renan Garcia. Associação De Polimorfismos Nas Sequências Regulatórias Dos Genes Hla-g, Il-10 E Tnf E A Sua Respectiva Expressão Gênica Em Lesões De Mucosa Em Pacientes Portadores De Doença Inflamatória Intestinal. 2014. **Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde)** - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE, Recife, Brasil, 2014

14. GOPAL, Murugaiyan. Role of Cytokines in Tumor Immunity and Immune Tolerance to Cancer. **Cancer Immunology**, [s.l.], p.93-119, 29 ago. 2014. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-44006-3_7.
15. GOVAN, Vandana et al. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. **Journal Of Carcinogenesis**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.3-10, 2003. Medknow. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3163-2-3>.
16. GUO, Chong et al. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 15, p.12365-12375, 12 jan. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.24193>.
17. INCA, Instituto Nacional De Câncer (Brasil). **Conceito e Magnitude**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>. Acesso em: 10/12/2018.
18. IYER, Shankar Subramanian; CHENG, Genhong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Crit Rev Immunol**, [s. l.], v. 1, n. 32, p.23-63, 01 jan. 2013.
19. KUNDU, Namita; FULTON, Amy M.. Interleukin-10 Inhibits Tumor Metastasis, Downregulates MHC Class I, and Enhances NK Lysis. **Cellular Immunology**, [s.l.], v. 180, n. 1, p.55-61, ago. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/cimm.1997.1176>.
20. MATSUMOTO, K. et al. Interleukin-10 -1082 Gene Polymorphism and Susceptibility to Cervical Cancer Among Japanese Women. **Japanese Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 40, n. 11, p.1113-1116, 17 jun. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyq094>.
21. MIN, Zhihong; PU, Xiaowen; GU, Zhengrong. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection. **Oncology Letters**, [s.l.], p.7189-7194, 28 set. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2018.9520>.
22. MOORE, Kevin W. et al. INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.683-765, abr. 2001. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>.
23. MOSSER, David M.; ZHANG, Xia. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 226, n. 1, p.205-218, dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065x.2008.00706.x>.
24. NGUYEN, Harrison P.; RAMÍREZ-FORT, Marigdalena K.; RADY, Peter L.. The Biology of Human Papillomaviruses. **Human Papillomavirus**, [s.l.], p.19-32, 2014. S. KARGER AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000355959>.
25. OLIVEIRA, Renato dos Reis. Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias. 2007. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2007.
26. PALADINO, N. et al. Gender Susceptibility to Chronic Hepatitis C Virus Infection Associated with Interleukin 10 Promoter Polymorphism. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 80, n. 18, p.9144-9150, 29 ago. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00339-06>.

27. REES, L.E.M. et al. The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. **Cellular And Molecular Life Sciences: CMLS**, [s. l.], v. 3, n. 56, p.560-569, 18 jan. 2002.
28. REUSS, e et al. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors – a twin study. **Genes & Immunity**, [s.l.], v. 3, n. 7, p.407-413, nov. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6363920>.
29. ROH, Ju Won et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 184, n. 1, p.57-63, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00193-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00193-3).
30. RONCAROLO, Maria Grazia et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 212, n. 1, p.28-50, ago. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x>.
31. SABAT, Robert et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.331-344, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>.
32. SALAZAR, Luis A. et al. Optimized Procedure for DNA Isolation from Fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood Useful in Clinical Molecular Testing. **Clinical Chemistry**, [s.i.], v. 8, n. 44, p.1748-1750, ago. 1998.
33. Santiago Rodriguez, Tom R. Gaunt and Ian N. M. Day. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. **American Journal of Epidemiology Advance Access**, published on January 6, 2009, DOI 10.1093/aje/kwn359.
34. SINGH, Hariom et al. Association of TNFA (-308G>A) and IL-10 (-819C>T) Promoter Polymorphisms With Risk of Cervical Cancer. **International Journal Of Gynecological Cancer**, [s.l.], v. 19, n. 7, p.1190-1194, out. 2009. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1111/igc.0b013e3181a3a3af>.
35. SINGHAL, Pallavi et al. Association of IL-10 GTC haplotype with serum level and HPV infection in the development of cervical carcinoma. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.2287-2298, 21 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-014-2836-6>.
36. SPEROTTO, Raul Antonio (Org.). Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. **Lajeado: Editora Univates**, 2014.
37. STANCZUK, Grazyna A. et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 94, n. 6, p.792-794, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.1543>.
38. SZÖKE, Krisztina et al. IL-10 Promoter nt - 1082A/G Polymorphism and Human Papillomavirus Infection in Cytologic Abnormalities of the Uterine Cervix. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.245-251, abr. 2004. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/107999004323034114>.
39. STEARNS, Mark E. et al. Role of Interleukin 10 and Transforming Growth Factor β 1 in the Angiogenesis and Metastasis of Human Prostate Primary Tumor Lines from Orthotopic Implants in Severe Combined Immunodeficiency Mice. **Clinical Cancer Research**, [s.i.], v. 5, n. -, p.711-720, mar. 1999.

40. TORRES-POVEDA, K. et al. Risk allelic load in Th2 and Th3 cytokines genes as biomarker of susceptibility to HPV-16 positive cervical cancer: a case control study. *Bmc Cancer*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.330-344, 24 maio 2016. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2364-4>.
41. TORRES-POVEDA, Kirvis. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. **World Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.753-763, 2014. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.753>.
42. TURNER, D. M. et al. An Investigation Of Polymorphism In The Interleukin-10 Gene Promoter. **European Journal Of Immunogenetics**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.1-8, fev. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2370.1997.tb00001.x>.
43. WILLIAMS, L. et al. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is the Dominant Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of IL-10 in Human Macrophages. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 172, n. 1, p.567-576, 19 dez. 2003. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.567>.
44. WINER, R. L. et al. Early Natural History of Incident, Type-Specific Human Papillomavirus Infections in Newly Sexually Active Young Women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.699-707, 20 dez. 2010. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-10-1108>.
45. WOODMAN, Ciaran B. J.; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S.. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.11-22, jan. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2050>
46. ZIDI, Sabrina et al. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms as genetic biomarkers of cervical cancer susceptibility among Tunisians. **Cytokine**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.343-347, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.028>.
47. ZOODSMA, M. et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. **International Journal Of Gynecological Cancer**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.282-290, nov. 2005. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00433.x>.

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES VOLUNTÁRIOS



CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL Th17 E CÉLULAS T REGULATÓRIAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNE A TIPOS DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO

QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES VOLUNTÁRIOS

Registro interno:		Registro Externo:	
Nome:		Idade:	
Endereço:			
Bairro:	Cidade:	Telefone contato:	
Naturalidade:		Estado Civil:	
Trabalha: () Sim () Não		Profissão:	
Carteira assinada: () Sim () Não		Recebe benefício do governo: () Sim () Não	
Rendimento do seu trabalho:		Rendimento da família:	
Nível de escolaridade: () Ens. Fund 1 () Ens. Fund 2 () Ens. Médio () Ens. Superior			
Número de Gestações:		Partos:	Abortos:
Método contraceptivo: () ACO () ACI () DIU () Preservativo () Laqueadura () Nenhum			
() Usa preservativo F () Usa preservativo M () Sempre () Às vezes () Nunca			
() Tem parceiro fixo		Sexo do parceiro fixo: () M () F	
() Tem parceiros ocasionais () 1 () 2 a 4 () mais de 4		Sexo do parceiro ocasional: () M () F	
Idade da primeira menstruação:		Data da última menstruação:	Sexarca:
Hábitos do parceiro:			
() Álcool () Cigarro () Álcool/Cigarro () Drogas () Homossexual () Outro parceiro(a)			
Já teve parceiro com suspeita de DST: () Sim () Não		HIV: () Sim () Não	
Já teve alguma DST: () Sim () Não Qual (is)?			
Já fez teste de HIV: () Sim () Não		Na gestação: () Sim () Não	
Faz ducha vaginal: () Sim () Não		Com: () Água () Sabão () Medicamentos	
Queixa clínica: () Corrimento () Sangramento () Ferida () Verruga () Dor pélvica () Outros			
Tem dores ou sangramento durante a relação sexual: () Sim () Não			
Resultado da Citologia: () Normal () Inflamação () HSIL () LSIL () ASC-US () ASC-H			
Observações:			
Colposcopia:			
Laudo da biópsia:			

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Pesquisador responsável: Prof (a). Dra. Janaina C. de O. C. Freitas

ESCLARECIMENTO À PARTICIPANTE DA PESQUISA

Prezada,

A senhora está sendo convidada a participar de um estudo denominado "Caracterização do perfil Th17 e células T regulatórias envolvidos na resposta imune a tipos de Papilomavírus humano", para entendermos como funcionam as defesas da mulher contra o vírus HPV, o qual pode provocar câncer do colo do útero. Antes de decidir se quer participar, é importante que a senhora entenda a razão desse estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto e faça qualquer pergunta se tiver dúvidas.

Objetivo da pesquisa: Nosso estudo irá avaliar se existe relação entre algumas células do colo uterino e as células de defesas das pacientes que estão em tratamento de lesões que podem ter sido ocasionadas pela infecção do vírus HPV. Essas células sanguíneas de defesa se chamam linfócitos Th17 e células T regulatórias.

Descrição dos procedimentos: Para o andamento desse estudo será necessário à coleta de 8µl de sangue por punção venosa. O sangue coletado não será usado em programas de doação de células, tecidos ou órgãos. O sangue coletado, bem como células ou produtos derivados da amostra de sangue não serão comercializadas em nenhuma situação. Também será realizada a coleta da região do colo do útero. Tal amostra será utilizada para a classificação do tipo de HPV. Uma vez coletadas as amostras, elas serão armazenadas no laboratório de citologia clínica na UFRN, até realização dos estudos necessários.

Critérios de escolha das amostras: Participarão deste estudo as pacientes do sexo feminino, HIV-negativas, com citologia positiva e negativa para HPV das quais selecionaremos 100 com HPV+ e 50 com HPV-.

Riscos ou transtornos: As atividades deste projeto oferecem o mínimo de risco à saúde das mulheres participantes da pesquisa. Podemos citar apenas possíveis hematomas, sangramentos e desmaios referentes à coleta do material biológico.

Embora os riscos sejam mínimos, em casos de complicações no momento da coleta, teremos total apoio com cuidados básicos à saúde e medicamentos

disponibilizados pela instituição responsável – UFRN. Entretanto, toda a coleta será realizada por profissional da saúde com qualificação e treinamento adequado para reduzir os riscos e complicações, alcançando desse modo um serviço seguro e confiável.

Benefícios: Sua participação no estudo é voluntária, sem nenhum benefício imediato. Os resultados obtidos com esta pesquisa poderão ajudar no diagnóstico precoce do câncer e auxiliar na elaboração de novos prognósticos para esta doença.

Ressarcimento: Caso não seja possível realizar a coleta no momento do consentimento, a paciente será ressarcida com um valor referente às despesas (comprovadas), como transporte, alimentação, entre outras; para o retorno da mesma ao ambulatório, em outra oportunidade, para realização da coleta.

Indenização: Em caso de danos devidamente comprovados, resultantes desta pesquisa, a paciente será devidamente indenizada pela instituição responsável – UFRN.

Participação voluntária: A mulher participante do projeto de pesquisa poderá desistir da colaboração em qualquer etapa e por qualquer motivo, sem que haja nenhuma penalidade ou prejuízo ao mesmo.

Sigilo das informações: Todas as informações sobre as pacientes serão mantidas em segredo e sua privacidade será mantida. Os resultados da pesquisa serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores e, mais tarde, publicados sem que sua identidade seja revelada para isso.

Se for de seu interesse, poderá obter os resultados da tipagem genética realizada na amostra de seu sangue. Para isso, deverá contatar a pesquisadora responsável Janaina C. de O. C. Freitas. A qualquer momento, seja durante o período de realização do estudo ou no futuro, é garantido o seu direito de retirar as informações genéticas relacionadas à amostra de seu sangue do banco de dados do estudo.

Em qualquer momento, em caso de dúvidas éticas ou reclamações, procurar o comitê de ética em pesquisa da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer (telefone: 84-40055501) e do Hospital Universitário Onofre Lopes, ou a pesquisadora responsável a prof (a) Janaina C. de O. C. Freitas, no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande Do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Av. Gustavo Cordeiro de Farias, sem número, Petrópolis, Natal, CEP 59010180. Telefone (84) 33429829.

Declaro que li as informações neste documento e concordo em participar da pesquisa.

Nome:.....

RG:.....Telefone: Data:

Endereço:.....

Assinatura da doadora

Assinatura do pesquisador