

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

NATÁLIA PEREIRA DA ROCHA

IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO NO RECEPTOR
PARA TNF- α (TNFR1 POSIÇÃO +36A/G) E SUA
EXPRESSÃO EM LESÕES DE COLO UTERINO

Rio de Janeiro

2013

Identificação do polimorfismo no receptor para
TNF- α (*TNFR1* posição +36A/G) e sua expressão
em lesões de colo uterino

NATÁLIA PEREIRA DA ROCHA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
a obtenção do grau de Mestre em
Ciências.

Orientador: Prof Dra Maria da Glória

Rio de Janeiro
2013

NATÁLIA PEREIRA DA ROCHA

Identificação do polimorfismo no receptor para
TNF- α (*TNFR1* posição +36A/G) e sua expressão
em lesões de colo uterino

Dissertação apresentada ao Curso de
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria da Glória Bonecini-Almeida

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Dra. Graziela Zanini

Doutora em Ciências /IPEC –FIOCRUZ

Dra. Márcia Andrade da Rocha

Doutora em Ciências/IPEC – FIOCRUZ

Dra. Elizabeth Avvad

Doutora em Ciências /UERJ

Dedico este trabalho a todas as
pacientes que aceitaram a participar deste
estudo e à população em geral.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Augusto Rocha e Eliane Pereira, por tudo que fizeram por mim até hoje, pelo amor, carinho, dedicação, atenção e incentivo em todas as etapas da minha vida, tanto pessoal, quanto profissional. Não há palavras que possam descrever isso e muito menos meu amor e agradecimento por TUDO.

Ao meu irmão, Roberto Rocha, que sempre foi um exemplo pra mim, pela amizade, pelas conversas e pelo apoio sempre, principalmente durante os últimos dois anos.

À minha orientadora, Dra Maria da Glória Bonecini, por ter me recebido no laboratório na iniciação científica, me mostrado o que é pesquisa e desde então, ter acreditado na minha capacidade.

Ao Dr. Fábio Russomano (IFF) e à Dra. Beatriz Grinsztejn (IPEC) pela obtenção do material biológico das pacientes com lesões cervicais utilizado neste presente estudo.

À Dra. Jacyara Macedo e ao Dr. Evandro Klumb (UERJ) pela obtenção do material biológico do grupo controle utilizado neste presente estudo.

À Dra Elyzabeth Avvad, por sua importante ajuda tanto na inclusão das mulheres atendidas no IFF, agilizando consideravelmente nosso trabalho, quanto na obtenção das amostras parafinizadas para avaliação da expressão gênica.

Aos membros da banca Dra. Graziela Zanini, Dra. Elizabeth Avvad e Dra. Márcia Andrade da Rocha por terem aceitado participar da avaliação do presente estudo.

Às Dras Márcia Andrade da Rocha e Ana Teresa Gomes Fernandes, por terem me ensinado a técnica de PCR-RFLP, utilizada na realização deste trabalho, ainda na iniciação científica, e por todo apoio além das experimentações.

À Dra. e amiga Ana Teresa Gomes Fernandes, por todo incentivo, apoio, paciência, companheirismo, ensinamentos, broncas, brincadeiras, pela confiança que depositou em mim, enfim...por tudo.

Ao Marcel Quintana, pela ajuda nas análises estatísticas da marcação de imunohistoquímica.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas, do IPEC, Fiocruz: Dra. Cynthia, Andreia, Monique, Márcia, Ana Teresa, Davi, Bruna, Mariana e Odete, e aos que fizeram parte, Márcio e Larissa... por toda ajuda, ensinamentos e pelos momentos de descontração que foram muito importantes e inesquecíveis.

Aos meus grandes amigos, Mônica Vieira e Ricardo França, pelo companheirismo e força desde a faculdade até o mestrado. Obrigada, acima de tudo, pela grande amizade.

Aos amigos Tássia Alves e Gustavo Queiroz, pela força, conversas, paciência nos momentos de estresse e ausência e pelos momentos de descontração que me proporcionaram. Foi importantíssimo. Obrigada, queridos.

Ao meu namorado e amigo Vinícius Corrêa, por estar do meu lado sempre, me dando força, me levantando nos momentos de fraqueza, pelo amor, carinho, amizade e incentivo, principalmente nos últimos dois anos, onde pude realizar mais uma etapa importante da minha vida profissional. Te amo!

E um agradecimento especial a todas as pacientes que aceitaram participar deste estudo, contribuindo, assim, para melhor compreensão a respeito das infecções estudadas.

*“Desconfiai do mais trivial, na aparência singelo.
E examinai, sobretudo, o que parece habitual.
Suplicamos expressamente: não aceiteis o que é de hábito
como coisa natural, pois em tempo de desordem sangrenta,
de confusão organizada, de arbitrariedade consciente, de
humanidade desumanizada, nada deve parecer natural,
nada deve parecer impossível de mudar.”
(Bertolt Brecht)*

Rocha, N.P. **Identificação do polimorfismo no receptor para TNF- α (*TNFR1* posição +36A/G) e sua expressão em lesões de colo uterino.** Rio de Janeiro, 2013. 86p.. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

RESUMO

A infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma cervical. Contudo, a maioria das mulheres permanece assintomática, desenvolvendo lesões intraepiteliais de baixo e alto grau. Estudos demonstram que polimorfismos nas regiões promotoras de genes de citocinas estão associados com a gravidade de muitas doenças infecciosas. Dentre estas, podemos citar a citocina pró-inflamatória TNF- α , onde suas atividades celulares são mediadas pela interação entre a citocina e seus receptores (TNFR1 e R2). Assim, tivemos como objetivo neste estudo, identificar polimorfismos dos receptores de TNF- α e associar ao aparecimento e progressão da lesão cervical, além de avaliar a expressão da proteína TNFR1 em lesões cervicais. As técnicas de PCR e RFLP foram realizadas para identificar o polimorfismo de base única (SNP) do gene *TNFR1* na posição +36A/G. Para a expressão da proteína foi realizada a imunohistoquímica em fragmentos de tecido parafinado provenientes de lesões cervicais e histerectomias (controle). Foram incluídas 365 mulheres neste estudo, sendo 183 pacientes e 182 controles. O genótipo AA *TNFR1*+36A/G foi associado com a proteção ao desenvolvimento de lesões de baixo grau ($p=0,03$) Para a análise da expressão de TNFR1, foram selecionadas 46 mulheres (17 controles, 15 HSIL e 14 LSIL). Foi observado um aumento na expressão deste receptor em células inflamatórias no corion de mulheres portadoras de HSIL quando comparadas com o grupo controle ($p=0,001$). Ao associarmos os genótipos com a expressão da proteína, foi observado que portadoras de *TNFR1*+36AA não apresentam alterações na expressão TNFR1 independente do grau de lesão cervical. Assim, a presença de TNFR1 pode estar sendo modulada negativamente pela infecção por HPV e este marcador pode ser utilizado como indicador para a progressão de lesões pré-malignas cervicais.

Palavras-chave: NIC, TNFR1, polimorfismo, ativação celular

Rocha, N.P. **Identification of TNF- α receptor polymorphism (*TNFR1+36A/G*) and its expression in uterine cervix lesions** Rio de Janeiro, 2013. 86p. Dissertation [Master degree in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

ABSTRACT

HPV infection is the main risk factor for development of cervical carcinoma. However, most women remain asymptomatic, developing high grade and low intraepithelial lesions. Studies demonstrated that polymorphisms in promoter regions of cytokines genes are associated with the severity of many infectious diseases. Among these, we mention the proinflammatory cytokine TNF- α , where their cellular activities are mediated by cytokine and their receptors (TNFR1 and R2) interaction. Thus, in this study, we have the aim to identify TNF- α receptors polymorphisms and associate with the onset and progression of cervical lesions, and to evaluate the TNFR1 expression in cervical lesions. PCR and RFLP techniques were performed to identify the single base polymorphism (SNP) TNFR1 gene at position +36 A/G. For protein expression, it was performed immunohistochemistry on paraffin tissue fragments from cervical lesions and hysterectomies (control). Three hundred and sixty five women were included, 183 patients and 182 controls. The AA genotype *TNFR1 +36 A /G* was associated with protection from developing low-grade lesions ($p = 0.03$) for the analysis of TNFR1 expression, we selected 46 women (17 controls, 15 HSIL and 14 LSIL). It was observed an increase in the receptor expression on inflammatory cells from corion of HSIL women when compared with the control group ($p = 0.001$). By associating genotypes with expression of the protein, it was observed that carriers of TNFR1 +36 AA did not show changes in the TNFR1 expression, independent cervical lesion degree. Thus, the TNFR1 presence may be negatively being modulated by HPV infection and this marker can be used as an indicator of premalignant cervical lesions progression.

Keywords: CIN, TNFR1, polimorphism, cellular activation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático exemplificando os tipos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em grau 1, 2 e 3 e câncer cervical (CaCx)	03
Figura 2. Modelo esquemático da infecção por HPV	04
Figura 3. Vias de sinalização dos receptores TNFR1	26
Figura 4. Vias de sinalização dos receptores TNFR2	28
Figura 5. Esquema da eletroforese em gel mostrando os genótipos do <i>loci TNFR1</i> digeridos pela enzima de restrição <i>MspaA1I</i>	42
Figura 6. Gel de agarose à 3% mostrando os produtos de RFLP, digeridos pela enzima de restrição <i>MspaA1I</i> , corados com brometo de etídio	48
Figura 7. Distribuição de células que expressaram TNFR1 nas lesões cervicais em mulheres do grupo controle, LSIL e HSIL.	52
Figure 8. Distribuição de células expressando TNFR1 na cérvix uterina de mulheres do grupo controle e mulheres com lesões cervicais, divididas em LSIL e HSIL	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados Clínicos e comportamentais	46
Tabela 2: Análise genotípica do polimorfismo do gene <i>TNFR1+36A/G</i> em mulheres com e sem lesão de colo uterino causado por HPV	48
Tabela 3: Análise genotípica do polimorfismo do gene <i>TNFR1 (+36A/G)</i> em mulheres com lesão de alto e baixo grau comparada com grupo controle	50
Tabela 4: Análise genotípica do polimorfismo do gene <i>TNFR1 (+ 36 A/G)</i> em mulheres com lesão de alto e baixo graus	51
Tabela 5: Distribuição das células expressando TNFR1 em lesões cervicais	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- cIAP – *Cellular inhibitor of apoptosis* (Inibidor celular de apoptose)
- DD – *Death domain* (Domínio de morte)
- DNA – *Desoxyribonucleotide acid* (Ácido Dextribonucleotídeo)
- DST – Doença Sexualmente Transmissível
- E2F – *Transcription factor* (Fator de Transcrição)
- FADD – *Fas-associated death domain* (domínio de morte associado ao Fas)
- FLICE - *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme* (Enzima conversora de interleucina-1 semelhante ao FADD)
- HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HPV – *Human Papilloma Virus* (Vírus do Papiloma Humano)
- HSIL - *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepithelial de alto grau)
- IFF – Instituto Fernandes Figueira
- IFN – Interferon
- IL – *Interleukin* (Interleucina)
- INOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintase induzida)
- IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- IRF – *Interferon regulatory factor* (Fator regulador de interferon)
- ISGF – *Interferon-stimulated gene factor* (Fator genetic estimulador de interferon)
- JNK - *Jun N-terminal kinases* (Quinase c-Jun N-terminal)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LSIL - *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão intraepithelial de baixo grau)
- MHC - *Major histocompatibility complex* (Complexo de histocompatibilidade principal)
- NFκB - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Fator de transcrição nuclear kappa B)
- NIC – Neoplasia Intra-epitelial Celular
- NK- *natural killer*

- NO – *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)
- NOS – *Nitric Oxide Synthase*
- p53 – proteína 53
- PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerase em cadeia)
- pRb – proteína do retinoblastoma
- PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrão molecular associado ao patógeno)
- PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell* (Células mononucleares de sangue periférico)
- RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
- RIP – *Receptor-Interacting Protein* (Proteína de interação com o receptor)
- SODD - *Silencer of death domain* (Domínio do silenciador de morte)
- TACE - *Tumor necrosis factor- α -converting enzyme* (Enzima conversora do fator de necrose tumoral)
- TGF - *Transforming growth factor* (Fator de transformação do crescimento)
- TBS – *Tris Base Saline*
- Th – *T Help* (célula T auxiliar)
- TLR – *Toll-Like Receptor* (Receptores do tipo Toll)
- TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
- TNFR - *TNF receptor* (receptor de TNF)
- TRAF – *TNF receptor associated factor* (Fator associado ao receptor de TNF)
- TRADD - *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain* (Domínio de morte associado ao receptor-1 de TNF)
- VEGF - *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)	01
1.1.1 Aspectos Gerais	01
1.1.2 Ciclo replicativo do HPV e Infecção	03
1.1.3 Epidemiologia.....	06
1.1.5 Câncer Cervical e Fatores de Risco	07
1.2 RESPOSTA IMUNE AO HPV	10
1.2.1 Evasão Imune	10
1.2.2 Resposta Imune inata na infecção por HPV.....	11
1.2.3 HPV e Inflamação.....	13
1.2.4 Imunidade Adaptativa na infecção pelo HPV	15
1.2.5 Perfil de Citocinas na infecção por HPV	18
1.3 FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALFA (TNF- α)	21
1.3.1 Aspectos Gerais	21
1.3.2 TNF na Inflamação e Apoptose	23
1.3.2 Receptores de TNF e Vias de Sinalização.....	24
1.3.3 TNF e Carcinogênese.....	29
1.3.4 TNF- α e HPV.....	29
1.3.5 Polimorfismo em <i>TNF</i> e seus receptores (<i>TNFR1</i> e <i>TNFR2</i>).....	32
2 OBJETIVO	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
2 METODOLOGIA.....	36
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA.....	36
3.1.2 Critérios de inclusão.....	37
3.1.3 Critérios de exclusão.....	38

3.1.4	Questionário sócio-econômico e identificadores de fatores de risco ambiental para o HPV.....	38
3.2	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE TNF- α (<i>TNFR1</i>)	38
3.2.1	Obtenção de amostras biológicas	38
3.2.2	Extração de DNA	39
3.2.3	Amplificação por PCR e RFLP.....	40
3.2.3.1	Determinação do polimorfismo de <i>TNFR1</i> +36A/G.....	40
3.2.4	Digestão com enzimas de restrição.....	41
3.2.5	Eletroforese em gel de agarose.....	41
3.3	EXPRESSÃO <i>IN SITU</i> TNFR1 EM LESÕES DE COLO UTERINO	42
3.4	QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS POSITIVAS.....	43
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	CASUÍSTICA.....	45
4.2	ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA O GENE <i>TNFR1</i> +36 A/G.....	47
4.2.1	Distribuição do gene <i>TNFR1</i> +36 A/G e sua associação com a presença de NIC.....	47
4.3	EXPRESSÃO DO TNFR1 EM LESÕES CERVICAIS	51
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÕES.....	61
7	PERSPECTIVAS.....	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9	ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

1.1.1 Aspectos Gerais

O HPV é um vírus não-envelopado, pertencente à família *Papillomaviridae*, formado por um capsídeo icosaédrico consistindo de 72 capsômeros, com DNA de dupla-fita, circular e com aproximadamente 8 mil pares de bases. O genoma do HPV é dividido em duas regiões, uma reguladora (LCR - *Long Control Region*) e a outra codificadora (ORF - *Open Reading Frames*). A região reguladora é caracterizada pela origem de replicação das partículas virais e pela transcrição. Já a região codificadora é ainda dividida em outras duas regiões, a precoce, conhecida como região E (do inglês, *early*) e a tardia, conhecida como região L (do inglês, *late*) (revisto por Rosa et. al., 2009). A região E contém cerca de seis genes, *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, que estão envolvidos na replicação do DNA viral, transcrição e transformação da célula. A região L contém dois genes, os quais codificam proteínas do capsídeo viral, a L1 e a L2 (Faridi et al, 2011). Na década de 70, o HPV foi associado ao desenvolvimento de tumores cervicais e a partir daí renovou-se o interesse pelo HPV, devido a evidências de uma provável relação deste vírus com o câncer genital feminino, em especial do colo uterino (Meisels et al.1977), sendo conhecido atualmente como a principal causa de câncer na cérvix uterina.

O HPV possui tropismo pelo tecido epitelial, mas os diferentes tipos do HPV infectam regiões específicas. Alguns são mais prevalentes em lesões cutâneas enquanto outros são mais prevalentes em mucosas, especificamente do trato genital (Bosch et al, 2008). Atualmente são conhecidos mais de 100 genótipos diferentes de HPV, onde 40 afetam o epitélio escamoso do trato anogenital e 15 são considerados oncogênicos e estão envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical (de Villiers et al, 2004; Castellsagué et al, 2008). Além disso, estes vírus são classificados de acordo com seu potencial

oncogênico em duas categorias: *baixo risco*, sendo os subtipos HPV6 e 11 os mais comuns, causando verrugas genitais/condilomas sem tendências de evolução para lesões malignas (Stanley et.al., 2007); e *alto risco* onde encontramos os subtipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 afetando o trato anogenital. Os subtipos HPV16 e 18 são os mais associados com o desenvolvimento do câncer, a partir da transformação das células normais em células oncogênicas sendo responsáveis por mais de 90% dos cânceres cervicais (IARC, 2007; Boccardo et al, 2010).

Infecções subclínicas causadas pelo HPV, na grande maioria, se curam espontaneamente sem desenvolver sintomas, podendo o vírus ser erradicado ou diminuído a um nível indetectável. O aparecimento de evidências clínicas é consequência do desenvolvimento de lesões de baixo ou alto grau, podendo se tornar uma infecção persistente com subtipos de HPV de alto risco (Carter et al, 2011). As lesões cervicais causadas pelo HPV são conhecidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) e são consequência da persistência viral no hospedeiro. Essas lesões podem ser classificadas em diferentes níveis: NIC 1 (sendo também caracterizadas como Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau - LSIL), NIC 2/NIC 3 (também caracterizadas como Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau – HSIL) e câncer invasivo, com alta expressão das oncoproteínas E6 e E7 (von Knebel Doeberitz, 2002) (Figura 1). A progressão de uma lesão de NIC 1 para uma NIC 2/3, e para câncer pode ocorrer em dois anos ou até mesmo levar décadas (Curado et al, 2007).

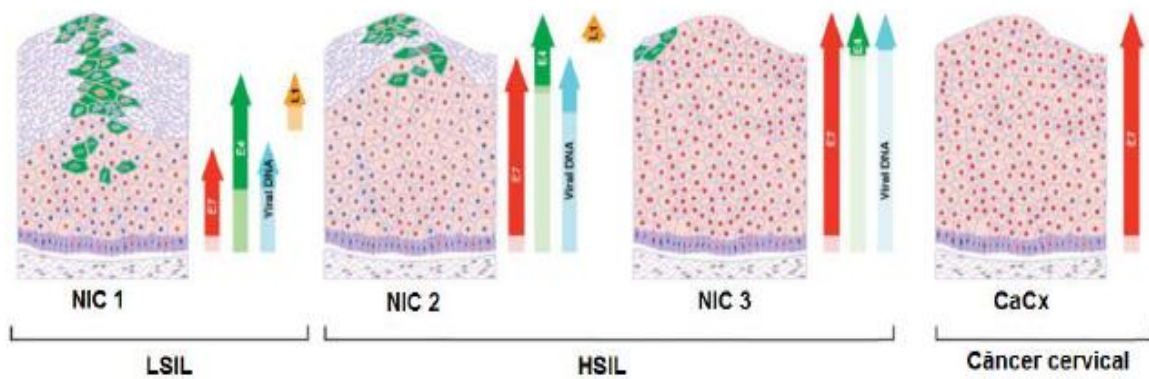


Figura 1. Desenho esquemático exemplificando os tipos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em grau 1, 2 e 3 e câncer cervical (CaCx). A lesão de NIC1 é denominada lesão escamosa de baixo grau (LSIL) e as lesões de NIC 2 e 3 são denominadas lesões escamosas de alto grau. As setas vermelhas, verdes e azuis, indicam, respectivamente, a expressão das proteínas E7, E4 e DNA viral do HPV na carcinogênese (adaptado de Doorbar, 2006).

1.1.2 Ciclo replicativo do HPV e Infecção

O HPV replica-se exclusivamente nas células epiteliais e é fortemente associado ao programa de diferenciação celular. Ele infecta os queratinócitos da camada mais basal do epitélio por serem células indiferenciadas e possuírem alta atividade mitótica. O HPV replica seu material genético durante o processo de diferenciação dos queratinócitos, liberando as partículas virais no momento da escamação (Figura 2). O ciclo celular pode durar até três semanas, pois este é o período para a completa diferenciação do queratinócito e sua escamação (Stanley, 2008).

A infecção ocorre quando o vírus penetra, através de microtraumas, na camada mais basal do epitélio escamoso estratificado, onde se encontram os queratinócitos. A entrada dos vírions é realizada por endocitose através da interação com sulfato de heparina e moléculas de clatrina ou caveolina da superfície celular do hospedeiro (Bousarghin et al, 2003; Doorbar, 2006) Contudo, a montagem e a maturação dos virions ocorrem em camadas mais superficiais do epitélio (Stanley, 2009).

Uma vez no interior dos queratinócitos, as proteínas do capsídeo viral se desintegram e então o material genético do vírus fica retido em episomas, no interior do núcleo, o que é caracterizado pelo baixo número de cópias virais

(Schiller et al, 2010). A síntese de proteínas virais ocorre nos queratinócitos das camadas supra-basais, enquanto que a formação dos virions ocorre nas camadas mais superficiais, portanto, somente esses tipos celulares são capazes de sustentar a replicação do episoma viral (Bhat et al, 2010).

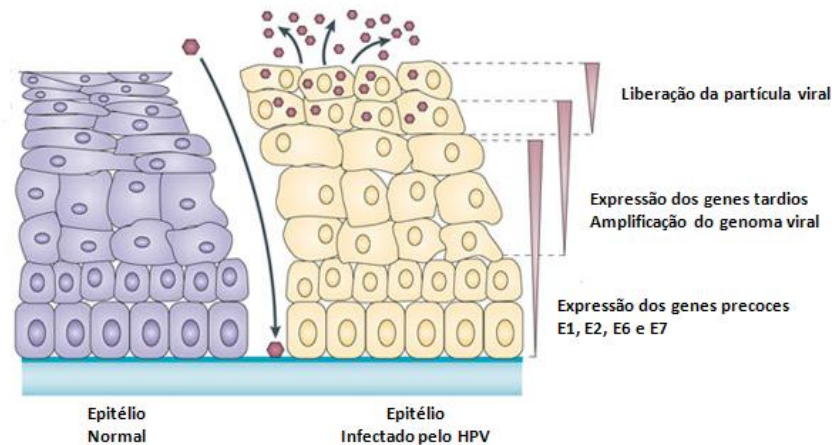


Figura 2. Modelo esquemático da infecção por HPV (Moody & Laimins, 2010)

Para a replicação do genoma viral é necessária uma proteína iniciadora, a E1, que interage com diversos fatores de replicação do hospedeiro, e uma proteína viral multifuncional, a E2, cuja expressão está associada com a regulação da expressão de E6 e E7 (Hebner e Laimins, 2006). A transformação maligna dos queratinócitos envolve a integração do genoma do HPV no genoma da célula hospedeira. Quando ocorre essa integração, a proteína E2 é rompida causando a interrupção da síntese de proteínas virais. Conseqüentemente, os genes que codificam E6 e E7 deixam de ser inibidos pela E2 e passam a ser expressos em maior quantidade, aumentando a concentração de proteínas E6 e E7 no citoplasma e no núcleo. A expressão dessas impede o término da diferenciação dos queratinócitos infectados, mantendo a célula em um estado proliferativo necessária para a síntese de DNA, dessa maneira, contribuindo com o processo de imortalização celular. Originalmente, a E2 não possui atividade transformante, porém é fundamental na imortalização de queratinócitos infectados com HPVs de alto risco (Franco et al, 2002; Camara et al, 2003 *apud* Mansur, 2001). Finalmente, ocorre o

empacotamento do genoma viral e a formação das partículas virais (vírions) através da ação das proteínas L1 e L2 do capsídeo viral e liberadas por meio da descamação natural dos queratinócitos (Doorbar, 2006).

Algumas oncoproteínas do HPV de alto risco são capazes de reativar a síntese de DNA em células fora do ciclo celular, retardar a diferenciação e inibir a apoptose, favorecendo assim a replicação do vírus. Estudos indicam que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV de alto risco possuem importante papel neste processo, por serem produzidas na fase inicial da infecção (Stanley, 2008).

Durante o ciclo celular, a célula sofre algumas interrupções em momentos específicos (G0/G1, G1/S e G2/Mitose) para verificação de possíveis mutações no DNA e seu reparo, quando necessário. A proteína supressora de tumor p53 está intimamente envolvida neste processo, transcrevendo genes de reparo e checando se há algum dano no DNA. Em células que não se encontram em divisão, a p53 é mantida em um estado estacionário. Alguns fatores como lesão no DNA e expressão de oncogenes levam a desregulação da proliferação induzindo a acumulação de p53 (May & May, 1999), o que pode resultar em uma ativação de vias moleculares que conduzem a parada do ciclo celular, apoptose ou senescência (Bernard et al, 2011).

Alguns oncovírus possuem como estratégia a degradação da p53 (Soria et al, 2010), como por exemplo a oncoproteína E6 de HPV de alto risco, que se liga e inibe a p53 através de complexo E6-AP (Gagnon et al, 2009), possuindo, assim, efeito anti-apoptótico. Uma vez a p53 inativada por essa oncoproteína, não há mais o reparo de células alteradas/danificadas durante o ciclo celular, e assim, a célula permanece no ciclo, passando os danos às células-filhas colaborando com a transformação maligna e desenvolvimento de câncer (zur Hausen, 2000). Além de inibir a apoptose via p53, a E6 pode se ligar à região terminal do receptor de TNF (TNF-R1), inibindo a ligação com TNF- α e a formação do complexo funcional de sinalização para morte celular, resultando, então, em um bloqueio de sinais apoptóticos em queratinócitos infectados, facilitando a replicação viral e formação de lesões associadas a oncogenicidade do HPV (Eck et al, 1989). A oncoproteína E7 tem como primeiro alvo a proteína supressora de tumor, chamada retinoblastoma (pRb),

que possui um importante papel no ciclo celular, pois se une ao fator de transcrição E2F, impedindo assim a replicação do DNA celular continuamente. A E7 inibe a pRb, e com isso, há a liberação do E2F, ocasionando então a replicação celular. De fato, tanto a p53 como a pRb são proteínas supressoras de tumor, e sua desestabilização através de degradação ou inativação, levam a uma instabilidade genética favorecendo o aumento exacerbado do número de células e inibição da apoptose (Carter et al, 2011).

1.1.3 Epidemiologia

Atualmente, a infecção pelo HPV é uma das principais doenças sexualmente transmissíveis (DST), envolvendo tanto a população feminina como também a masculina no mundo todo, embora a prevalência seja maior em mulheres jovens e sexualmente ativas, onde a infecção do HPV é muito freqüente, porém, assintomática, latente e subclínica. O HPV é encontrado facilmente em verrugas e displasias anogenitais, sendo na maioria dos casos sob a forma subclínica. São categorizados como “baixo risco” e “alto risco” de acordo com seu potencial de causar lesões benignas, pré-cancerosas ou cancerosas (zur Hause, 1996). Após a primeira relação sexual, o risco cumulativo de aquisição e desenvolvimento de uma infecção causada por HPV em três anos é de 45%. Um declínio na prevalência de infecção por HPV ocorre após os 30 anos de idade, para cerca de 5% (Grunbaum et al, 2003; Eaton et al, 2004; Brener et al, 2004). De acordo com o Ministério da Saúde (2011), no Brasil, há 137 mil novos casos por ano, e segundo estudos, cerca de 50 a 75% das mulheres sexualmente ativas terão contato com o HPV, em algum momento (Sociedade Brasileira de Infectologia, 2011). Nos Estados Unidos estima-se que cerca de 6,2 milhões de pessoas são infectadas anualmente pelo vírus (Wheeler, 2008).

Em infecções por HPV de alto risco, principalmente causado pelo HPV16, a resolução da infecção leva em média de 8 a 16 meses. Em contraste, em infecções por HPV de baixo risco, o tempo médio é de 4 a 8 meses (Trottier & Franco, 2006). Sendo assim pode-se afirmar que a maioria das infecções se cura espontaneamente, persistindo apenas em um pequeno

número de indivíduos infectados e podendo levar ao desenvolvimento de neoplasias.

Em um estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2011) em Goiânia, foi observado uma prevalência de 86% de infecção por HPV em esfregaços cervicais anormais. De 76 lesões de NIC2/3, o HPV16 foi observado em 40 casos (52%), sendo ainda o mais prevalente em carcinoma invasivo (88,8%). Infecções únicas e de múltiplos tipos envolvendo o HPV16 foram associadas com o diagnóstico de NIC2. Outro estudo, realizado por Roteli-Martins e colaboradores (2011), buscou avaliar a prevalência de HPV em 3204 mulheres saudáveis no Brasil, Canadá e Estados Unidos. Pelo menos um tipo de HPV foi detectado em 26,6% das mulheres. A prevalência de tipos oncogênicos foi de 21,7% (25% no Brasil, 16,9% no Canadá e 19,1% nos Estados Unidos). A prevalência de infecções pelos HPV16 e 18 foi de 24,8%. Esses dados corroboram com os achados de Queiroz e colaboradores (2005), que avaliaram a prevalência da presença do HPV em pacientes com lesões pré-malignas e malignas na Bahia onde foi observado que o subtipo HPV16 era o mais freqüente (30%), seguido dos subtipos HPV52, HPV58, HPV53, HPV33, HPV51 e HPV54.

Segundo Boccardo e colaboradores (2010), em países desenvolvidos, cerca de 20% dos cânceres em mulheres, é consequência de infecções, onde uma proporção considerável destes está associada ao HPV.

1.1.4 Câncer Cervical e Fatores de Risco

O câncer cervical é a segunda maior causa de morte entre mulheres em todo mundo, ficando atrás apenas do câncer de mama. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é diagnosticado cerca de 500 mil novos casos de câncer cervical por ano, e desses, 250 mil resulta em morte (Faridi et al, 2011). No Brasil, ele ocupa o 4º lugar entre os cânceres que mais matam mulheres.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde, para o ano de 2012 no Brasil, estima-se 17.540 novos casos de câncer de colo de útero (17/100 mil mulheres). A incidência de câncer cervical em países menos

desenvolvidos é duas vezes maior que em países mais desenvolvidos, podendo este fato estar relacionado com a falta ou ausência de programas de rastreamento desse câncer nesses países. O câncer cervical infecta mais comumente mulheres na faixa etária entre 20 e 29 anos podendo atingir a faixa de 50 e 60 anos. O teste de Papanicolau é o mais conhecido entre as estratégias para rastrear e controlar o câncer cervical.

O HPV é detectado em 99,7% dos casos de câncer de colo uterino. Adicionalmente, também pode ser identificado em grande proporção em câncer anal, sendo o HPV 16 o maior responsável pela maioria dos casos (Frisch et al, 1999). Dentre outros cânceres que podem ser causados por HPV estão o câncer vulvovaginal, de pênis e o câncer de cabeça e pescoço.

As lesões cervicais (NIC) causadas pelo HPV, podem em sua maioria regredir espontaneamente. Para que ocorra o processo de transformação maligna dessas lesões, existem vários fatores envolvidos: fatores virais (tipos específicos, co-infecção com outros tipos de HPV, carga viral e integração viral), fatores comportamentais (uso de tabaco e contraceptivos orais) e fatores do hospedeiro (hormônios endógenos, fatores genéticos e relacionados à resposta imune).

Para que ocorra o desenvolvimento do câncer cervical, é necessário, porém não suficiente, que haja uma infecção persistente por um subtipo de HPV de alto risco/oncogênico (Carter et al, 2011). Essa relação das infecções por HPV com a oncogênese é, de acordo com a literatura, uma consequência indireta da manutenção de células infectadas em um estado proliferativo. A integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro aumenta a instabilidade genômica e a aquisição de mudanças genéticas e epigenéticas. O tempo dessa integração viral está associado ao desenvolvimento de neoplasias de alto grau com a participação das oncoproteínas E6 e E7.

Além dos fatores virais envolvidos na carcinogênese, há descrição de que fatores do hospedeiro, como polimorfismos em alguns genes, como por exemplo, *Bax*, *Bcl2*, *p53*, *TNF* e *TNFR1* e *TNFR2*, que podem estar envolvidos no desenvolvimento de carcinoma cervical, assim como falhas da resposta imune. É descrito que o HPV possui diversas estratégias que o permite escapar de vigilância do sistema imune do hospedeiro, tópico que será abordado

posteriormente. Adicionalmente, fatores epigenéticos como hábito de fumar, uso de contraceptivos orais por tempo prolongado e outros hormônios sexuais, número de parceiros e início precoce da vida sexual estão fortemente ligados a esse processo.

O consumo de tabaco é um dos principais co-fatores ambientais para a progressão da infecção, uma vez que suprime o sistema imune e afeta o metabolismo dos hormônios femininos. Quando inalada nicotina, a mesma é convertida em cotinina, a qual é depositada na cérvix, e afeta a apresentação de antígeno pelas células de Langerhans, retardando a eliminação do vírus pelo sistema imune (Carter et al, 2011). De acordo com Fonseca-Moutinho (2011) em um estudo de meta-análise, o hábito de fumar não está relacionado com a aquisição da infecção, mas sim com a progressão para uma lesão grave ou câncer e com a resolução das lesões cervicais. Foi visto neste estudo que a regressão de lesões LSIL (*Low Squamous Intraepithelial Lesions*/lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) dentro de dois anos é significativamente menor em fumantes do que em pessoas que nunca fumaram.

O muco cervical de fumantes também contém grandes quantidades de componentes do cigarro e seus metabólitos (Fonseca-Moutinho 2011 *apud* Melikian et al, 1999). Neste mesmo trabalho de meta-análise de Fonseca-Moutinho (2011) foi destacado que o processo de carcinogênese também pode ser associado a um sistema imune sistêmico e periférico com função desregulada, com produção alterada de citocinas pró e anti-inflamatórias, elevado número de linfócitos T citotóxicos associado a suas atividades diminuídas, decréscimo no número de linfócitos TCD4 e NK, e baixos níveis de imunoglobulinas.

Hormônios endógenos e exógenos também exercem um papel na carcinogênese. O uso prolongado de contraceptivos orais (CO) é dito aumentar o risco de desenvolvimento de câncer cervical. Em um estudo conduzido na Tailândia, foi comparado o risco de desenvolver câncer cervical em um grupo de mulheres que nunca fizeram uso de contraceptivo oral e outro grupo de mulheres que usavam com frequência. Esse último apresentou um aumento no risco, porém, sem significância estatística. Contudo, quando comparados o tempo de uso dentro do grupo de mulheres que faziam uso do CO, foi

observado um *odds ratio* maior em mulheres que fizeram uso por mais de três anos (Vanakankovit & Taneepanichskul, 2008). Esse aumento tem sido associado ao hormônio feminino estrogênio juntamente com a alta paridade devido a repetidas exposições a níveis elevados desse hormônio durante a gravidez. Um estudo com camundongos transgênicos para as oncoproteínas E6 e E7 do HPV mostrou uma contribuição do estrogênio para desenvolvimento e persistência do câncer cervical (Brake & Lambert, 2005). Alguns estudos sugerem que o estrogênio e seus genes responsivos podem ser fatores de risco não apenas na iniciação, mas também no desenvolvimento do câncer cervical em conjunto com as oncoproteínas E6 e E7. Mulheres com co-infecção pelo HIV também possuem um risco consideravelmente aumentado para transformação maligna das lesões cervicais e desenvolvimento de câncer, uma vez que o HIV debilita o sistema imune do hospedeiro pela queda de linfócitos TCD4+.

1.2 RESPOSTA IMUNE AO HPV

1.2.1 Evasão Imune

O HPV possui mecanismos de evasão do sistema imunológico. A replicação e a produção de novas partículas virais ocorrem em células já destinadas à descamação, conseqüentemente não ocorrendo a formação de um ambiente pró-inflamatório e sem sinais de perigos que alertem o sistema imune. Oncoproteínas provenientes de subtipos de alto risco de HPV, principalmente HPV16 e 18, podem estar associadas a esses mecanismos de evasão. Foi descrito na literatura que as oncoproteínas E6 e E7 podem inibir o efeito imunoregulatório do IFN- γ reduzindo a expressão desta citocina e interferindo nas suas vias de sinalização. A E6 interage com o fator regulatório de interferon-3 (IRF-3) e inibe sua habilidade de ativação transcricional e, portanto, bloqueia a expressão de IFN- β , enquanto que a E7 inibe IRF-1 e a formação do ISGF-3 (Ronco et al., 1998; Barnard et al., 2000). Além disso, foi também descrito que a E5 interfere com a apresentação de antígeno mediada

por MHC de classe I através da desregulação da acidificação endossômica e desregulação do tráfico dessa molécula, prevenindo o reconhecimento imune (Ashrafi et al., 2005).

Algumas evidências sugerem que essas oncoproteínas também inibem a expressão de moléculas de sinalização capazes de reconhecer o HPV. Os PAMPS – do inglês *Pathogen-associated molecular pattern* (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) -, são moléculas que reconhecem componentes bacterianos e virais e iniciam uma resposta inflamatória a qual dirigem a mecanismos efetores adaptativos ou inatos para eliminar a infecção. Essas moléculas incluem os receptores tipo Toll (TLR – *Toll-Like Receptors*) (Bhat et al., 2010). Há mais de 13 tipos descritos, contudo, foi visto que a transcrição do gene *TLR-9* em células epiteliais primárias *in vitro* possuem sua regulação diminuída pela E6 e E7 do HPV16 (Khunamornpong et al., 2009).

A maioria das infecções por HPV e grande proporção das lesões neoplásicas causadas por este vírus são eliminadas por uma resposta imune efetiva em um curto período de tempo. Entretanto, além dos mecanismos de evasão do sistema imune exercido pelo HPV, falhas na eliminação de células infectadas podem levar a persistência da infecção, o que tem sido ligado a um processo de inflamação crônica e, portanto, aumentando o risco de desenvolvimento de neoplasias e câncer cervical.

1.2.2 Resposta Imune inata na infecção por HPV

De maneira geral, a resposta imune inata age como primeira linha de defesa, detectando o patógeno e eliminando-o (em até 90%) do organismo sem formar uma memória imunológica específica. Contudo, a resposta imune inata ativa uma resposta imune adaptativa capaz de gerar respostas efetoras letais e células de memórias. A resposta humoral mediada por anticorpos elimina partículas virais livres do fluido corporal e previne uma reinfecção (Stanley., 2009).

A resposta imune inata a infecções é caracterizada por uma infiltração de células inflamatórias e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no local da infecção (Bhat et al., 2010), porém, como a infecção pelo HPV é não-lítica, em infecções persistentes, o epitélio cervical é caracterizado por infiltrados modestos de macrófagos e linfócitos, embora um aumento seja evidenciado durante a progressão de uma lesão persistente para um câncer invasivo (Davidson et al., 1997).

Os TLR's, como já mencionado anteriormente, podem reconhecer o DNA do HPV de alto risco, principalmente o TLR-9. Em um epitélio cervical normal, a expressão de TLR-9 é baixa, porém, um aumento dessa expressão pode ser verificado em epitélios infectados por HPV em progressão para um câncer cervical, sugerindo um importante papel para o TLR-9 na progressão da neoplasia cervical, podendo ser utilizado também como marcador de transformação maligna das células do epitélio escamoso cervical, como descrito por Lee e colaboradores (2007). Em contraste, um estudo recente realizado por Daud e equipe (2011) buscou comparar a expressão de TLR em amostras cervicais exibindo uma depuração da infecção por HPV16 durante acompanhamento, e em amostras cervicais com infecção persistente. Os autores encontraram um aumento na expressão de TLR (entre os mais encontrados, o TLR-9) nas amostras exibindo depuração da infecção e perda desse aumento em amostras com infecção persistente, sugerindo que o aumento da expressão de TLR é necessário para a depuração da infecção e uma resposta imune inata bem sucedida. Esses dados sugerem que a expressão de TLR está mais associada a doença cervical inflamatória do que com a infecção por HPV, sugerindo que a infecção por HPV de um tecido já inflamado está associado com o aumento no risco de persistência enquanto que o desenvolvimento da inflamação durante a infecção é útil para a depuração da infecção (Bhat et al., 2010).

As células *Natural Killer* (NK) são importantes componentes da resposta imune inata contra infecções virais. Elas podem ser encontradas tanto no sangue periférico como também em tecidos, inclusive na cérvix uterina (Renoux et al., 2011 *apud* King et al., 1996). Possuem grande atividade citotóxica através da liberação de grânulos de perforina e granzima.

É descrito na literatura que a citocina IL-18 induz a produção de IFN- α estimulando a atividade lítica de células NK. Um estudo investigou se as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 poderiam afetar essa indução e estimulação em células mononucleares de sangue periférico (do inglês, *Peripheral blood mononuclear cell* - PBMC) de pacientes com neoplasia HPV16+. Os autores viram que PBMCs dessas pacientes possuíam reduzida atividade de NK contra queratinócitos infectados (Lee et al., 2001). Em contrapartida, um estudo recente realizado por Renoux e colaboradores (2011), no qual investigaram o papel da NK na resposta imune contra infecções por HPV e cânceres relacionados, mostraram pela primeira vez que células NK interagem com HPV e podem participar da resposta imune nessas infecções. De maneira mais detalhada, foi demonstrado que as células NK estão relacionadas com a alta taxa de regressão espontânea de lesões pré-neoplásicas HPV+ e podem ser ativadas pela proteína L1 de partículas virais, destruindo células infectadas por HPV. Além disso, podem ajudar na resposta imune adaptativa através da secreção de citocinas.

Alguns produtos de genes virais podem interferir na imunidade inata durante uma infecção promovendo a expressão de algumas proteínas mediadoras de inflamação (Bhat et al., 2010). O regulador de diferenciação celular, o NF κ B, é super regulado em células epiteliais de câncer cervical pelas oncoproteínas E6 e E7, induzindo o reconhecimento de células cancerígenas cervicais pelas NK, ajudando na proteção contra o câncer cervical (Textor et al., 2010).

1.2.3 HPV e Inflamação

Após a resposta imune inata ser iniciada por uma injúria tecidual, *stress* ou morte celular, os quais ativam sensores, como receptores tipo Toll (TLR) e os inflamasomas, inicia-se um processo inflamatório. Nesse processo, efetores imunes inatos e celulares são recrutados e então, células parenquimais e fagócitos são ativados para secretar citocinas e outras moléculas que atraem outros efetores citotóxicos ao local inflamatório. As células dendríticas, que são

células apresentadoras de antígenos profissionais localizadas na periferia, são ativadas e dão início a uma resposta imune adaptativa através da apresentação de antígeno a células T *náive*, nos linfonodos (Stanley, 2009).

Infecções por HPV implicam na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias por queratinócitos e demais componentes da resposta imune inata e adaptativa, como macrófagos, células NK e linfócitos. A importância dessa resposta para a infecção é observado pela secreção de citocinas como TNF- α , IL-1, IFN- α e IFN- β , que inibem a transcrição de oncogenes do HPV *in vitro* e inibem também o crescimento de linhagens celulares contendo o genoma viral (Boccardo et al., 2010).

A resposta inflamatória pode contribuir para uma progressão de lesões associadas ao HPV pela indução de danos ao DNA em tecidos infectados. Locais inflamatórios e infecciosos possuem alto nível de produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROI), produzidas por células inflamatórias, os quais podem modificar as bases de DNA causando quebra de cadeias duplas e únicas (Ohsima et al., 2003). Em células normais, alto nível de danos por radicais livres podem ser genotóxicos levando a morte celular através da apoptose ou necrose (Marnett et al., 2003). Essa acumulação de lesões mutagênicas no DNA tem sido observada em lesões cervicais de alto grau (Hiraku et al., 2007). De acordo com Wei e colaboradores (2009), em um estudo utilizando doadores de óxido nítrico (dietilenotriamina/óxido nítrico – DETA/NO) para modelos de exposição ao NO no epitélio cervical, foi observado um aumento na transcrição dos genes *E6* e *E7* do HPV, mas não uma replicação viral, em uma via dependente de doses de NO. A super regulação de *E6* relacionada à produção de NO resultou na diminuição dos níveis de p53 e sua atividade, além da diminuição de pRb pela indução da transcrição de *E7*. Com a perda da atividade da p53, foi observada, conseqüentemente, quebras da dupla-fita do DNA nessas células infectadas por HPV. Esses resultados sugerem que doses fisiológicas de NO podem promover a progressão maligna de células HPV+. Contudo, outro estudo mostrou uma diminuição da oxido nítrico sintase induzida (iNOS) ou NOS2 conforme a lesão cervical progrediu de baixo para alto grau. Essa baixa expressão de iNOS pode modificar a função de macrófagos infiltrantes de

tumor para um fenótipo maligno, promovendo a progressão do tumor ao invés de uma resposta anti-tumoral (Mazibrada et al., 2008). Embora alguns estudos demonstrem uma associação da produção do NO e o desenvolvimento de câncer cervical causado por HPV, o efeito direto do NO na replicação do HPV ainda não foi descrito.

Evidências também sugerem uma queda no número de células de Langerhans, uma sub-população de células apresentadoras de antígeno, em lesões associadas ao HPV, estando associada a baixa regulação na expressão de E-caderina em queratinócitos mediada por E6 (Matthews et al., 2003; Leong et al., 2010).

A infecção por HPV pode exercer efeitos diretos na expressão de genes pró-inflamatórios, contribuindo para uma supressão da resposta imune contra células infectadas, favorecendo a persistência viral (Boccardo et al., 2010).

1.2.4 Imunidade Adaptativa na infecção pelo HPV

Uma resposta mediada por célula T antígeno-específica ajuda na depuração de uma infecção através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que reforçam a imunidade inata, e também através da liberação de moléculas citotóxicas e pró-apoptóticas que matam células infectadas (Frazer, 2009).

A importância do sistema imune adaptativo na proteção contra lesões induzidas por HPV é notada através do aumento da incidência de infecções persistentes e posterior malignidade em indivíduos imunossuprimidos e através da observação de que somente uma pequena fração de indivíduos imunocompetentes desenvolve lesões intraepiteliais escamosas ou câncer (Arends et al., 1997; zur Hausen, 2002).

Evidências indicam que a infecção pelo HPV invoca uma resposta imune celular e que a regressão de infecções causadas por HPV são consequência dessa resposta. A regressão de verrugas genitais e cutâneas, assim como displasias, é marcada por um infiltrado de linfócitos T e macrófagos. No sangue, uma resposta TCD4⁺ contra oncoproteínas E2, E6 e E7 está associada

com infecção por HPV16 e 18 em doenças precoce e em regressão, e menos associada em doenças persistentes (Bhat et al., 2010 *apud* Coleman et al., 1994). Em contrapartida, em indivíduos imunossuprimidos, como no caso de indivíduos HIV-positivos, há uma alta prevalência de lesões induzidas pelo HPV e estes possuem um risco maior de desenvolver tumores (Palefsky et al., 2003), uma vez que o HIV leva a perda gradativa das células TCD4⁺, comprometendo o sistema imune do paciente. Portanto, o aumento na incidência e na progressão da infecção pelo HPV em imunossuprimidos demonstra o importante papel das células TCD4⁺ no controle e/ou resolução das infecções causadas pelo HPV (Stetson et al., 2002; Ahaich-Grant et al., 2004; Fakhry et al., 2006). O fato de haver uma elevada incidência de infecções persistentes pelo HPV e displasias em indivíduos imunossuprimidos, serve como prova de que o sistema imune adaptativo é de grande importância na proteção contra lesões induzidas pelo HPV.

Nos casos das lesões verrucosas genitais, essas regressam espontaneamente e apresentam infiltrado de células TCD8⁺ citotóxicas, TCD4⁺ e macrófagos (Coleman et al., 1994). Da mesma forma, Kobayashi e colaboradores (2004) demonstraram que lesões cervicais pré-cancerígenas (NIC2/3) associadas ao HPV possuem uma resposta imune na mucosa caracterizada por infiltrados de células imunes tanto da resposta inata (macrófagos, células NK e neutrófilos), quanto da resposta adaptativa (TCD4⁺, TCD8⁺ e células B). Nesse estudo, os autores observaram que neutrófilos estavam restritos ao estroma e macrófagos e NK foram vistos tanto no estroma quanto no epitélio. Esse conjunto de células estava significativamente aumentado em NIC2/3 quando comparados a cérvix normal. Já os linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e B foram significativamente aumentados no estroma, porém, apenas os linfócitos TCD4⁺ foram aumentados no epitélio dessas lesões, quando comparados a cérvix normal. Em contrapartida, segundo um trabalho de revisão de Jayshree e colaboradores (2009), o estroma é caracterizado por um infiltrado predominante de linfócitos TCD4⁺, e o epitélio, por um infiltrado de linfócitos TCD8⁺. Contudo, essas últimas células são consideradas anérgicas, contribuindo assim para a persistência e progressão de lesões causadas por HPV.

Uma resposta imune TCD4⁺ para as oncoproteínas E2, E6 e E7, do HPV16 e 18 é mais vista no início e na regressão da doença, e menos em sua persistência (Bhat et al., 2010). Respostas TCD8⁺ para epítomos de E7 foram encontradas em pacientes com câncer cervical, embora, essa seja incapaz de eliminar a doença (Oerke et al., 2005). Foi visto também que em lesões de NIC1 a taxa de células TCD4⁺/TCD8⁺ foi alta quando comparada com NIC3 e carcinoma. Já em lesões em regressão, houve um predomínio de células TCD8⁺, fortemente positivas para granzimas (Monnier-Benoit et al., 2006). Em contraste, um estudo longitudinal observou a ocorrência de infiltrado similar em lesões de NIC de baixo e alto grau, porém, essa densidade aumenta de acordo com o avanço da doença, com células TCD4⁺/FoxP3⁺ vistas em grande número estando associado com a persistência do HPV e aumento do grau da displasia cervical (Jaafar et al., 2009; Ovestad et al., 2010).

Tanto os linfócitos TCD4⁺ como os TCD8⁺, estão envolvidos em respostas a infecções pelo HPV. O estudo de Nakagawa e colaboradores (2000) encontrou uma perda de resposta citotóxica para E6 (mas não para E7) em infecções persistentes por HPV16, concluindo que uma resposta baseada na citotoxicidade a oncoproteína E6 do HPV 16 é importante para a eliminação viral e progressão da neoplasia.

Em culturas de PBMC de indivíduos saudáveis, podem ser detectadas respostas TCD4⁺ do tipo Th1 e Th2 específicas para E2 e E6 do HPV16 e respostas citotóxicas específicas para E6 e E7 do HPV16 (de Jong et al., 2004). Contudo, essas células TCD4⁺ e TCD8⁺ podem migrar para o epitélio nesses mesmos indivíduos saudáveis (van der Hende et al., 2008). Ao contrário, pacientes com lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) ou câncer, revelaram que a ocorrência de câncer induzida pelo HPV, geralmente está intimamente associada com a falha ao montar uma resposta citotóxica e Th1 fortes específicas para HPV16, indicada por uma perda de migração de células TCD8⁺ e o influxo de células T regulatórias dentro da lesão.

Em um outro estudo longitudinal feito por Woo e colaboradores (2010) em mulheres com lesões cervicais, os autores observaram que a resposta das células TCD4⁺ contra a oncoproteína E2 era eficiente em neoplasias em regressão, o que não era visto nas lesões em progressão para NIC2/3. Essas

observações reforçam mais uma vez a importância das populações de células TCD4⁺ específicas para E2 em um controle imune efetivo nas infecções por HPV16 (Stanley, 2009).

De maneira geral, esses estudos mostram que uma resposta de células T efectoras contra antígenos virais E2, E6 e E7 do HPV16 bem conduzida, leva a uma defesa bem sucedida contra infecções por HPV16.

1.2.5 Perfil de Citocinas na infecção por HPV

Citocinas são proteínas secretadas por diversos tipos celulares, como macrófagos, outros leucócitos e células NK e produzidas durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade e que participam da mediação e regulação da resposta imune e inflamatória. Podem agir de forma autócrina, parácrina e endócrina.

As células TCD4⁺ são subdivididas em duas populações efectoras de acordo com o perfil de citocinas que produzem em Th1 e Th2. A população Th1 produz interleucina (IL)-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-3, IL-12 entre outras, e estão relacionadas à imunidade celular. Já a população Th2, produz IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 entre outras e estas possuem uma associação com a resposta humoral e alérgica (Guimarães et al., 2011).

Diversas citocinas estão envolvidas na mediação da inflamação da mucosa e pele. Em infecções virais, os queratinócitos desempenham papel fundamental na produção de citocinas, que, no entanto, possuem efeitos diversos dependendo da via de secreção. Quando produzidas de forma autócrina ajudam na proliferação e diferenciação celular, e quando produzidas de forma parácrina influenciam outros tipos celulares e induzem a migração celular para o local da inflamação (Gröne, 2002). As principais citocinas produzidas nesse processo são a IL-10, o fator de crescimento tumoral-beta (TGF- β), o IFN- γ e o TNF- α .

Indivíduos imunocompetentes que possuem uma infecção persistente por HPV, apresentam uma falha na resposta imune contra esse vírus, e essa falha tem sido atribuída também devido à alteração na produção de citocinas

presentes no local da lesão, com aumento na produção de IL-10 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, o IFN- γ . (El-Sherif et al., 2001).

A IL-10 possui efeito pleiotrópico tanto na imuno-regulação como na inflamação, tendo efeitos tanto na promoção do tumor quanto na inibição; além de diminuir a regulação da expressão de citocinas Th1, antígenos de MHC de classe II e moléculas estimulatórias em macrófagos (Bhat et al., 2010; Barbisan et al., 2012). Tanto a IL-10 como o TGF- β são capazes de contribuir para um ambiente imunossupressivo em uma infecção persistente por HPV, de maneira que, sua indução é considerada um mecanismo pelo qual células infectadas pelo HPV podem evitar a eliminação pelo sistema imune (Bhat et al., 2010).

Uma associação entre produção de IL-10 em nível de proteína e RNAm e a progressão de um câncer cervical tem sido confirmado pela literatura. Alguns estudos apontam um aumento significativo de IL-10 na camada sub-epitelial de lesões NIC 2 e 3 (El-Sherif et al., 2001); outros demonstram um duplo papel dessa citocina no aumento da patogênese viral e na supressão da resposta imune ao observarem um aumento na regulação da expressão do RNA mensageiro da oncoproteína E7 em células de carcinoma *in vitro* (Arany et al., 2002).

O TGF- β é uma proteína pleiotrópica que atua como um fator antiproliferativo de células epiteliais normais e nos estágios iniciais da oncogênese; além disso, está envolvida na regulação do crescimento celular, proliferação, diferenciação, progressão do tumor e angiogênese (Spellberg & Edward, 2001). Foi visto que algumas oncoproteínas do HPV16 conseguem inibir a expressão da isoforma TGF- β 2, porém, a isoforma TGF- β 1 promove a instabilidade cromossômica em células expressando E6 e E7 (Deng et al., 2008).

Outra citocina de importante papel na infecção por HPV é o TNF- α , atuando como mediador da inflamação na pele e mucosas. Essa citocina possui ação citostática em queratinócitos, ativando fatores de transcrição como o NF- κ B e diminuindo a regulação de proteínas mitóticas. Existem diversos relatos do envolvimento do TNF na resposta imune ao HPV e em sua história natural (Revisto por Boccardo et al., 2010). Em nossos estudos prévios

(Nicol et al., 2005), identificamos a presença abundante de células produtoras de TNF- α na cérvix uterina durante a infecção pelo HPV, distribuídas preferencialmente no estroma, com morfologia característica de macrófagos. A correlação entre essa citocina e a infecção por HPV será abordada detalhadamente em tópicos posteriores.

Estudos sugerem que uma infecção por HPV desencadeia uma resposta Th1, e conforme a lesão progride ocorre uma mudança no padrão de citocina Th1 para Th2 (Kanodia et al., 2007). Foi demonstrado por Tsukui e colaboradores (1996) que linfócitos do sangue periférico produzem IL-2 em resposta a peptídeos do HPV16, em mulheres com LSIL e câncer cervical, e em mulheres com citologia normal, porém, com história de infecção por HPV. A perda dessa resposta Th1 foi relacionada à persistência da infecção e no desenvolvimento de neoplasia relacionada ao HPV. Um recente estudo objetivou determinar o envolvimento de citocinas (IL-2, -4, -10, -12, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 e TGF- β 2) em pacientes com vários graus de lesão causadas por HPV, onde demonstraram significantes reduções de RNAm para IL-2, IL-12 e TNF- α e um significativo aumento de RNAm para TGF- β durante a progressão da lesão. Esse aumento em conjunto com a expressão de IL-4 (Th2), caracterizou um perfil Treg (de Peghini et al., 2012). De acordo com outros estudos, na transição de uma infecção causada por HPV para um câncer invasivo, foi observada uma mudança na distribuição (*in situ*) das Tregs de uma predominância intraepitelial para o estroma, demonstrando uma relevância para a história natural da infecção por HPV, uma vez que as Tregs podem estar exercendo uma forma predominante de imunotolerância em muitos tipos celulares, como as células NK e TCD8. (Nakamura et al., 2007, Adurthi et al., 2008).

Biópsias de tecido cervical apresentaram níveis de RNAm de IFN- γ diminuído em mulheres com lesão intraepitelial escamosa (LIS) ou câncer cervical quando comparadas com tecidos cervicais normais de mulheres negativas para os tipos HPV16 e 18 (Pao et al., 1995). Um grupo, ao avaliar a produção de citocinas estimuladas por antígenos/mitógenos, encontrou mudanças no perfil de citocinas Th1 para Th2 em PBMC de mulheres com LIS

onde a infecção se estendeu além da cérvix para outros locais do trato genital baixo (Clereci et al., 1997).

Com relação à co-infecção por HIV, a mudança de um perfil Th1 para Th2 foi descrita em mulheres ou com citologia cervical anormal ou com LSIL comparadas com controles saudáveis. Essa mudança ocorre em mulheres com e sem infecção por HIV, porém, a diminuição de células Th1 do sangue periférico é maior em mulheres co-infectadas (Lee et al., 1999).

Em concordância com o já exposto acima, Jong e co-autores (2002) observaram a presença de células TCD4⁺ de memória específicas para E2 e E6 do HPV16 em frações de sangue periférico na maioria das mulheres saudáveis participantes, e essas, por sua vez, produziam IFN- γ , sugerindo um perfil Th1. Porém, não puderam afirmar se essa resposta específica nessa população era de apenas citocinas de origem Th1 ou se outros perfis celulares também estavam presentes.

Esses estudos sugerem que a infecção por HPV induz um perfil de resposta Th1 e, portanto, a mudança para um perfil Th2 está associada com o desenvolvimento de lesões (de alto grau e câncer) cervicais associadas ao HPV. Com isso, podemos afirmar que o desequilíbrio de produção de citocinas pode ser o fator chave para a progressão do tumor, uma vez que contribui para a evasão das células tumorais da vigilância imunológica.

1.3 FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALFA (TNF- α)

1.3.1 Aspectos Gerais

O TNF é uma citocina descoberta no final dos anos 70 como um produto de ativação imune que possuía a capacidade de suprimir a proliferação de células tumorais e induzia a regressão de tumores (Green et al., 1982). É uma proteína que consiste de 157 aminoácidos, sintetizada como uma proteína transmembrana tipo II de 26 kDa, a qual é clivada por uma enzima, a TACE (enzima conversora de TNF), que a converte em 17kDa. O TNF- α é produzido

por diversos tipos celulares, como: macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos e fibroblastos em resposta a inflamação, injúria e infecção. Desde 1984, diversas pesquisas têm mostrado variados papéis do TNF- α em diversas condições, tais como, na imunidade, inflamação, crescimento tumoral, rejeição, artrite reumatóide e choque séptico (Aggarwal, 2003) Esta citocina exerce seu papel biológico através de seus receptores, TNFR1 e TNFR2, que ativam diferentes vias de sinalização regulando a morte celular, sobrevivência e proliferação (Wajant et al, 2003).

O TNF- α tem um importante papel na promoção da resposta imune agindo principalmente na resposta inflamatória, estando envolvido no recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais da infecção, uma vez que, leva as células endoteliais vasculares a expressarem moléculas de adesão (Wajant & Scheurich, 2011). Além disso, estimula a secreção de quimiocinas pelas células endoteliais e também por macrófagos, ativando uma cascata de citocinas com funções biológicas complementares. Entretanto, o TNF- α quando produzido em altas quantidades pode prejudicar o controle das infecções, pois entra na corrente sanguínea e age em locais distantes. Nessas condições, o TNF- α pode agir na indução da febre, aumento da síntese de proteínas séricas nos hepatócitos e levar ao choque séptico (Abbas, 2008).

O TNF- α é importante para a compreensão da infecção e imunopatologia conseqüentes de uma resposta imune celular. Uma das maiores ações biológicas do TNF- α é sua atuação na defesa contra infecções bacterianas (Kassa et al., 2012), virais (Nicol et al., 2005) e parasitárias (Rocha Rodrigues et al., 2012).

O TNF- α também possui uma importante influência no câncer, possuindo propriedades tumorícidas, como indução da morte celular em células cancerígenas, embora possa exercer papel na estimulação da proliferação, sobrevivência, migração e angiogênese, através da indução de IL-8 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em muitas células cancerosas (Wang & Lin, 2008).

O papel do TNF- α no câncer ainda é pouco conhecido, porém, já foi observado que a expressão de TNF dentro do microambiente tumoral parece favorecer a invasão de células tumorais, migração e formação de metástase.

Contudo, algumas evidências demonstram que o TNF- α promove o desenvolvimento e disseminação do câncer. Experimentos realizados em camundongos *knockout* para TNF- α demonstraram que os mesmos foram resistentes ao desenvolvimento de tumores de pele benignos e malignos, fornecendo um suporte para o papel do TNF- α na promoção do tumor (revisto por Wang et al., 2012). Segundo Mocellin e colaboradores (2008), a modulação de TNF pode ainda contribuir para a regulação de células inflamatórias e desenvolvimento de doenças malignas.

1.3.2 TNF na Inflamação e Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo geneticamente programado que resulta na fragmentação do DNA e morte celular. É observado no desenvolvimento embrionário e durante a vida adulta, desempenhando papel importante em vários processos fisiológicos, tais como remodelagem dos tecidos, e execução e manutenção do sistema imune (Grivicich et al., 2007). Dependendo da origem do estímulo, a apoptose pode ser desencadeada por uma via *intrínseca* (envolvendo membros da família Bcl-2) ou por uma via *extrínseca* (interação receptor-ligante), e na maioria das vezes é dependente de caspases (Herreweghe et al, 2010). Os receptores de TNF desencadeiam a apoptose pela via *extrínseca*, através da interação intracelular do domínio de morte (DD) e o TRAF, iniciando uma cascata de sinalização (Locksley et al, 2001), descrita em maiores detalhes posteriormente

O TNF- α é capaz de desencadear dois efeitos opostos, a indução da apoptose e está envolvido fortemente na resposta inflamatória. É uma das primeiras citocinas liberadas após uma infecção, trauma e exposição ao LPS derivados de bactérias. O TNF- α é considerado como o principal regulador da resposta inflamatória, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão no epitélio durante um processo infeccioso (Feldmann et al, 1994; Maini et al, 1995).

Os macrófagos são uma das principais células envolvidas na resposta inflamatória, fazendo parte da primeira linha de defesa contra patógenos

invasores. São capazes de secretar uma gama de citocinas e quimiocinas intensificando a resposta inflamatória (Ross et al, 2002). Dentre essas citocinas está o TNF- α , o qual sua produção é induzida através dos receptores *Toll-Like*, que juntamente com outros fatores, ativam macrófagos. Contudo, TNF- α e IFN- γ exercem uma ligação cruzada ao nível de TNFR1 para ativar os macrófagos. Uma vez ativados, essas células produzem espécies tóxicas de oxigênio e óxido nítrico (NO), migrando para o local da inflamação e combatendo os patógenos (Wesemann et al, 2003).

A apoptose de células inflamatórias e, conseqüentemente, sua eliminação por macrófagos, fenômeno conhecido como eferocitose, é considerada um mecanismo importante na resolução da inflamação. Um estudo demonstrou que o LPS e o TNF- α , poderosos agentes pró-inflamatórios, são capazes de inibir a eferocitose de neutrófilos por macrófagos. A inibição da eferocitose por LPS foi positivamente associada com a produção de TNF- α por macrófagos. A importância da produção desta citocina nesse processo foi comprovada ao utilizarem TNFR1 solúvel para reverter a inibição da eferocitose por LPS, uma vez que esse receptor nestas condições inibem a atividade de TNF- α . Neste mesmo estudo, foi observado também que a produção exógena de IL-10 reverteu os efeitos inibitórios de LPS na eferocitose através da supressão da produção de TNF- α (Michlewska et al., 2009).

1.3.3 Receptores de TNF e Vias de Sinalização

Para que o TNF- α possa exercer suas atividades biológicas em nível celular, é necessário que haja uma ligação com seus receptores transmembrana, o TNFR1 e o TNFR2. O TNFR1 (55kDa) é expresso em quase todos os tipos celulares e possui um efeito pleiotrópico, atuando tanto na ativação do fator de transcrição NF- κ B como na indução da apoptose; e o TNFR2 (75kDa) é expresso em células hematopoiéticas e sua função ainda não se encontra totalmente estabelecida. Contudo, evidências sugerem que esse receptor atua sinalizando efeitos opostos e compartilhados ao TNFR1, além de mediar sinais promotores de reparo e angiogênese (Choi et al, 2005;

Bradley, 2008; Herreweghe et al, 2010). Ambos os domínios extracelulares são compostos de subdomínios ricos em cisteína, o qual é uma característica de membros da família de receptores de TNF; entretanto, não apresentam homologia em relação ao domínio intracelular (Ledgerwood et al, 1999).

O TNFR1 é conhecido como o principal mediador das vias de sinalização do TNF- α . Em células em repouso, esse receptor é isolado no aparato de Golgi de onde é levado para a superfície celular. Acredita-se que esta organela atua como um reservatório para aumentar a expressão do receptor na superfície, facilitando a sensibilização celular para as ações do TNF- α (Bennett et al, 1998; Wang, 2001; Bradley, 2008;).

O TNFR1 consiste de uma proteína transmembrana tipo I possuindo uma porção extracelular, uma porção transmembrana e uma intracelular. Sua porção intracelular é caracterizada pela presença de uma região chamada de domínio de morte (DD). A sinalização deste receptor pode ocorrer tanto pela ligação da citocina TNF- α ligada à membrana quanto pela forma solúvel, e essa ligação é considerada um mecanismo irreversível (Tartaglia et al, 1993; Tuma et al, 1995).

Quando ocorre a ligação do TNF- α na porção extracelular do TNFR1, um silenciador de domínio de morte (SODD) é liberado da porção intracelular (DD) desse receptor e uma proteína adaptadora, TRADD é, então, recrutada para se ligar nesse domínio de morte. TRADD recruta outras proteínas, como o fator 2 associado ao receptor (TRAF-2), que por sua vez interagem com inibidores celulares de morte (cIAP) e proteínas de interação ao receptor (RIP). Essa sinalização faz parte do Complexo 1, o qual resulta em uma cascata de sinalização levando a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e JNK. Ao final deste processo, NF- κ B é translocado para o núcleo onde inicia a transcrição de genes anti-apoptóticos, como cIAP1, cIAP2, cFLIP, TRAF1 e TRAF2. Entretanto, TRADD/RIP podem também interagir com uma proteína de domínio de morte associado ao Fas (FADD) e com a Caspase-8, onde formam um complexo citoplasmático, o Complexo 2, que levam a ativação de uma cascata de caspases, e conseqüentemente, a apoptose (Revisto por Naudé et al, 2011) (Figura 3).

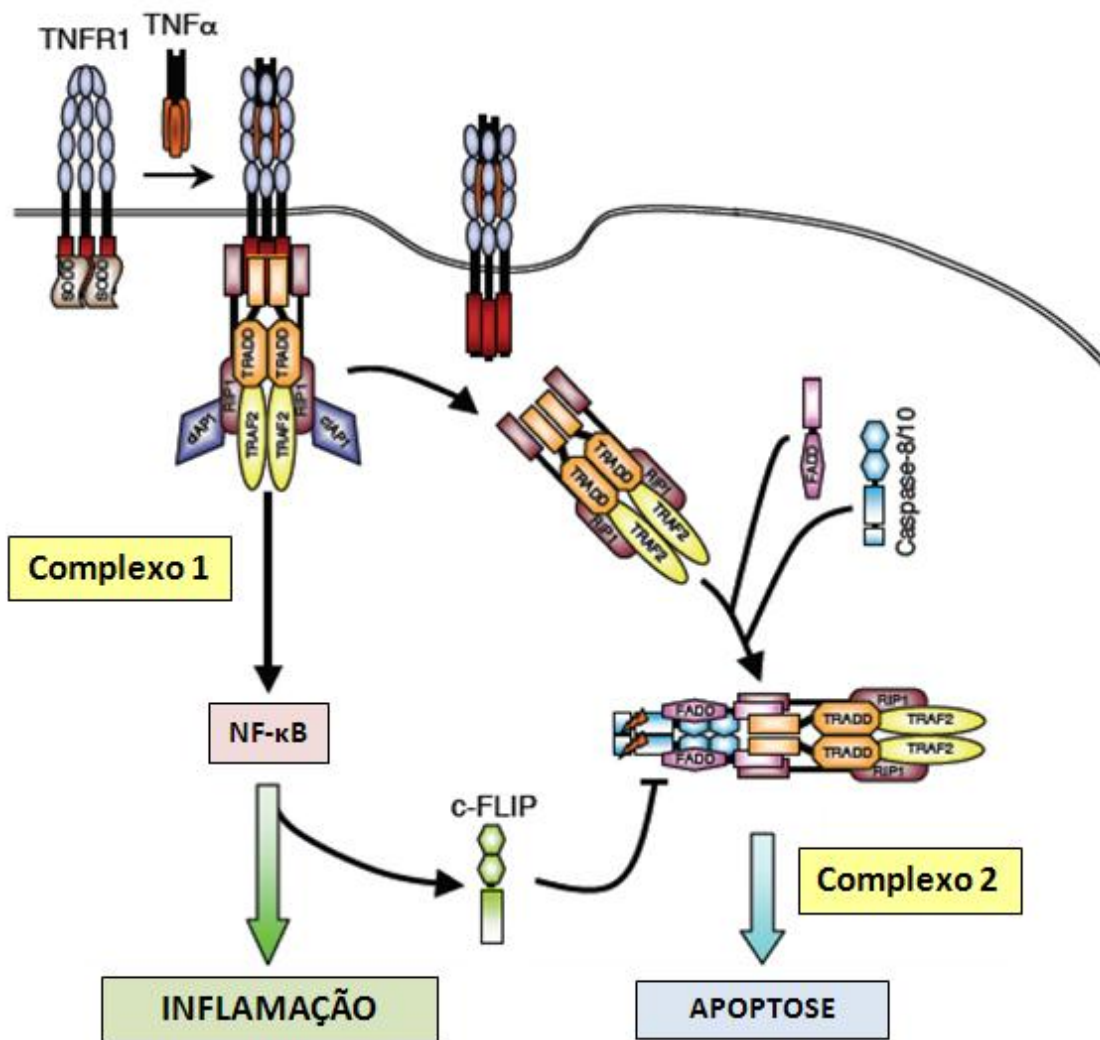


Figura 3. Vias de sinalização do receptor TNFR-1 (adaptado de Kimberley et al., 2007)

Em células normais, a ativação da via clássica (canônica) de NF- κ B leva à prevenção da apoptose induzida por TNF; porém, em casos de deficiência de proteínas inibitórias como c-IAP e FLICE, a caspase-8 é ativada pelo Complexo II e a célula é levada a morte por apoptose (Liu et al, 1996; Muppid et al, 2004).

O TNFR1 possui importância na formação de granulomas, os quais retêm patógenos intracelulares, como micobactérias. Em estudos utilizando camundongos, foi visto que a formação desses granulomas é dependente de TNFR1 (Jacobs et al., 2000). De acordo com Solovic e colaboradores (2010), evidências clínicas mostraram que a contenção de micobactérias é dependente de sinais derivados de TNFR1 e pacientes que receberam bloqueadores de TNF apresentaram reativação de tuberculosa latente. A importância do TNFR1

já foi investigada também em outras infecções bacterianas como, *Corynebacterium parvum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus* (Schluter & Deckert, 2000).

Estudos relacionando TNFR1 a infecção por HPV demonstram que as oncoproteínas do HPV de alto risco podem exercer influência sobre a apoptose induzida por TNF- α (Thompson et al., 2001; Tungteakkhun, 2008), como será visto posteriormente com mais detalhes.

O TNFR2, diferentemente do TNFR1, não possui um domínio de morte e é ativado apenas pelo TNF- α ligado a membrana, e essa ligação possui uma cinética rápida e algumas vezes ausente. Pouco é conhecido a respeito desse receptor, e isso deve, em parte, ao fato de muitos experimentos serem realizados usando TNF solúvel, o qual não ativa TNFR2 (Blüml et al., 2012). Porém, estudos sugerem que TNFR2 atua como um “ligante de passagem” para TNFR1 em alguns tipos celulares, aumentando a concentração de TNF- α na superfície de células através de uma ligação e dissociação rápida (Tartaglia et al, 1993) (Figura 4).

Os dois receptores podem ser clivados na superfície da célula por uma enzima da família das metaloproteinases, em resposta a um estímulo inflamatório; porém, essa clivagem na porção extracelular dos receptores leva a uma incapacidade de ligação do TNF- α , logo, funcionando como um inibidor endógeno de TNF- α (Van Zee et al, 1992).

Em contraste com o TNFR1, o TNFR2 é ativado somente pelo TNF- α associado à membrana. Após esse estímulo, ocorre a trimerização do TNFR2 e o recrutamento de TRAF-2 e proteínas associadas, como TRAF-1, c-IAP1 e c-IAP2. De acordo com Rothe e colaboradores (1995), um TRAF-2 mutante é capaz de bloquear a ativação de NF- κ B, considerando que a superexpressão de TRAF-2 leva a ativação desse fator de transcrição, levando a acreditar que o TRAF-2 possui um importante papel na ativação do NF- κ B mediado por TNF- α .

A ativação de NF- κ B por esse receptor é duradoura e pode ser realizada tanto pela via clássica (canônica) como pela via alternativa (não-canônica). Contudo, estudos mostram que diversas linhagens celulares estimuladas por

TNF ligado à membrana conduzem a uma via alternativa de NF- κ B através da estimulação de TNFR2 (Rauert et al., 2010).

O envolvimento direto do TNFR2 no controle de doenças infecciosas é raro. Foi visto que camundongos deficientes para TNFR2 apresentaram inflamação pulmonar após serem desafiados com bactérias, enquanto que camundongos deficientes para TNFR1 desenvolveram a doença de forma atenuada (Peschon et al., 1998). Em um modelo de choque séptico polimicrobiano, foi observado que a deleção de TNFR1 atenuou a doença, enquanto que a deleção de TNFR2 levou a um aumento dos sintomas e diminuição da sobrevivência (Ebach et al., 2005). Isso sugere que ambos os receptores estão envolvidos em diferentes situações de defesa, sendo o TNFR1 atuando principalmente em respostas antivirais e bacterianas, e o TNFR2 em infecções virais e sepse (Blüml et al., 2012).

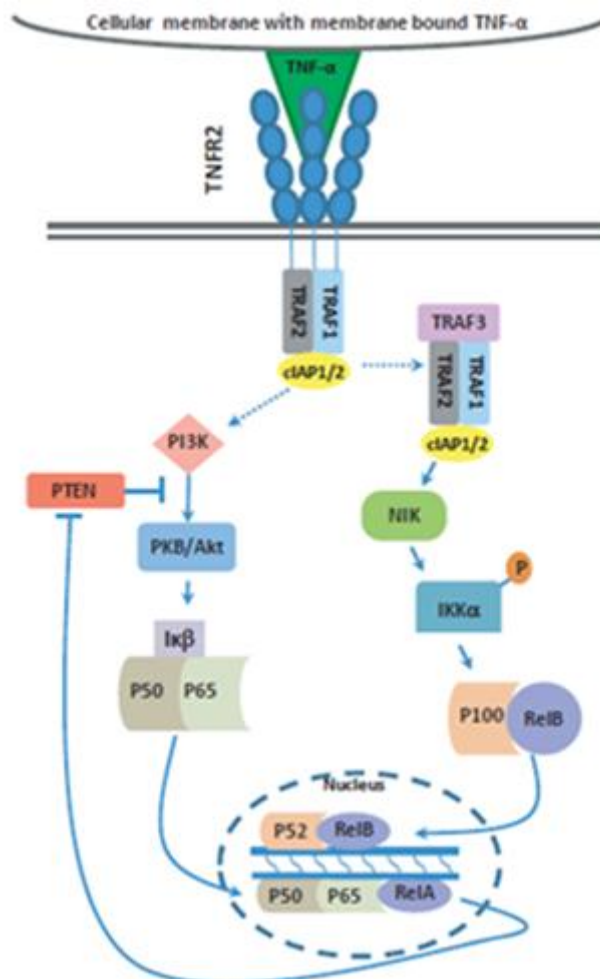


Figura 4. Vias de sinalização dos receptores TNFR2 (Naudé et al, 2011).

1.3.4 TNF e Carcinogênese

De acordo com dados epidemiológicos e clínicos, o processo inflamatório crônico está associado com o desenvolvimento e promoção do tumor. O TNF- α , por ser uma importante citocina pró-inflamatória, está intimamente ligado a esse processo, pois atua como um promotor de tumor endógeno, formando uma ponte entre a inflamação e a carcinogênese, estando envolvido na transformação celular, proliferação, sobrevivência, invasão, angiogênese e metástase (Wang & Lin, 2008).

Foi demonstrado que pacientes com diferentes tipos de câncer possuem níveis aumentados de TNF- α no soro; e esses níveis foram altamente expressos em vários tecidos tumorais e pré-neoplásicos (Ahmed et al, 2001; Szlosarek et al, 2006). Além disso, o TNF- α pode também ser utilizado como marcador prognóstico em pacientes com câncer e indicador de risco e resposta a terapias, uma vez que, uma diminuição significativa de TNF foi evidenciado no câncer de mama e próstata após o tratamento por quimioterapia (Berberoglu et al, 2004; Michalaki et al, 2004;).

Concentrações patofisiológicas de TNF- α endógeno promovem o crescimento e a gênese do tumor. Por exemplo, a ativação de NF- κ B possui um papel chave na promoção do tumor induzida por TNF- α . O NF- κ B induzido por TNF- α inibe a citotoxicidade induzida por um carcinógeno, colaborando para um aumento de células com mutações e, portanto, suscetíveis à transformação maligna (Yang et al, 2006). O TNF- α , por sua vez, também possui envolvimento na angiogênese, invasão e metástase de tumores (Wang & Lin, 2008).

1.3.5 TNF- α e HPV

O TNF- α possui um importante papel como mediador da imunidade antiviral, podendo ser evidenciado através de estudos que mostram que alguns tratamentos para doenças inflamatórias crônicas, utilizando bloqueadores de TNF, podem contribuir para o risco ou ativação de infecções virais (Kim & Solomon, 2010). A reativação viral, com aumento do grau da displasia cervical,

persistência da infecção por HPV, e câncer cervical, pode ser visto em pacientes que sofreram transplantes de rim, pulmão e medula óssea e que fizeram uso de terapia imunossupressora com bloqueadores de TNF- α (Veroux et al., 2009).

A resposta inflamatória é um processo importante na infecção por HPV podendo colaborar tanto para o desenvolvimento como para a regressão das lesões, tendo o TNF- α como uma das principais citocinas envolvidas nesse processo. Contudo, um estudo observou uma diminuição dos níveis de TNF- α no soro de mulheres com carcinoma invasivo em relação a mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (NIC), demonstrando uma associação entre a diminuição da resposta inflamatória e a progressão da lesão para um câncer (Lages et al., 2011).

Diversos estudos vêm apontando a relação do TNF- α na resposta imune contra células infectadas pelo HPV e doenças associadas (Boccardo et al, 2010). Em queratinócitos humanos normais, o TNF- α possui um efeito citostático, através da ativação do NF- κ B, que por sua vez leva a super-regulação da p21 (inibidor de quinase dependente de ciclina), diminuindo a regulação de proteínas mitóticas (Basile et al, 2003). De uma maneira geral, células mononucleares expressando TNF- α foram associadas à regressão espontânea de papilomavírus (Hagari et al, 1995). Porém, resultados controversos podem ser observados em diversos estudos, como visto por Boccardo e colaboradores (2010), o qual mostrou que linhagens celulares de câncer cervical HPV positivas foram resistentes ao efeito anti-proliferativo do TNF- α . Em contrapartida, alguns estudos observaram que queratinócitos imortalizados por HPV 16 foram sensíveis aos efeitos do TNF- α , enquanto que, por HPV 18, se tornaram resistentes. Essa diferença pode ser explicada pelo fato do subtipo 18 estar relacionado à grande atividade de transformação *in vitro* e associado com cânceres mais agressivos (Villa et al, 1992). Além disso, a resposta ao tratamento com TNF- α , pode estar relacionada à diferença de perfis de expressão do gene e níveis de ativação de NF- κ B exibidas por essas linhagens sob efeito do TNF- α (Termini et al, 2008).

O TNF- α enquanto agente anti-proliferativo, pode ainda ter sua ação inibida pelas oncoproteínas do HPV. Já foi visto que a oncoproteína E6 está

relacionada à resistência da apoptose mediada por TNF- α . Essa oncoproteína E6 pode inibir a apoptose através da ligação ao TNFR1, ao domínio de morte associado ao Faz (FADD) e a pro-caspase 8. A E6 ao se ligar ao FADD e a procaspase 8 medeia a degradação de ambos, tornando essas proteínas incapazes de transmitir sinais apoptóticos (Tungteakkhun, 2008). O mesmo ocorre quando a mesma se liga a porção citoplasmática do TNFR1, impedindo que o domínio intracelular desse receptor interaja com o TRADD, bloqueando a sinalização para a morte celular, inibindo, assim, a ativação da cascata de caspase (Lagunas-Martínez et al, 2009).

Uma das defesas do organismo em uma infecção viral é a parada do ciclo celular. O HPV, contudo, só consegue se reproduzir nas células em que a síntese de DNA esteja ativa, e para isso, ela utiliza mecanismos que conseguem superar essa defesa, através de suas oncoproteínas, que anulam as funções da pRb e p53, proteínas que regulam o ciclo celular (Basile et al, 2001). A presença da E7 tem sido associada à resistência ao efeito anti-proliferativo do TNF- α . De acordo com um estudo realizado por Basile e colaboradores (2001), a E7 atenua a parada do ciclo e a diferenciação celular em queratinócitos humanos, através da ligação e estabilização da proteína p21^{Cip1/Waf1}, anulando sua função durante a diferenciação induzida por Ca²⁺. De acordo com Thompson e colaboradores (2001), foi visto que células expressando E7 do HPV16 podem conter baixos níveis de TNFR1, conseqüentemente resultando em uma diminuição da resposta celular ao TNF- α , e que a E7 do HPV16 é também capaz de inibir a apoptose mediada por TNF- α em fibroblastos humanos normais. Eles observaram que em células expressando E7 tratadas com doses de TNF- α (1-30ng/ml) junto com cicloheximida apresentaram mais que 50% de diminuição da tendência de sofrer apoptose em resposta ao TNF- α , quando comparadas com células infectadas com um controle retrovírus. Em contrapartida, eles observaram que o TNFR1 permaneceu funcional nessas células expressando E7 do HPV16, após avaliarem a ativação de JNK e p38 (quinases implicadas na citotoxicidade mediada por TNF- α) induzidas por TNF- α nesses fibroblastos, as quais a E7 não obteve influência sobre a ativação dessas quinases. Também não foi observado interação direta da E7 com o complexo TRADD/FADD e nem com a

caspase-8, sugerindo que o efeito desta oncoproteína na apoptose mediada por TNF provavelmente ocorre de maneira indireta.

1.3.6 Polimorfismo em *TNF* e seus receptores (*TNFR1* e *TNFR2*)

Estudos demonstram que a transcrição de TNF- α é diretamente afetada por polimorfismos encontrados na posição -308G/A da região promotora do gene *TNFR*, onde a transição do alelo selvagem G pelo alelo mutante A induz um aumento na transcrição desse gene, fazendo com que a produção desta citocina seja superior em indivíduos portadores do alelo A em comparação ao alelo G (Wilson et al, 1997; Kroeger et al, 1997, Fei et al, 2010; Zhang et al, 2010). Este polimorfismo foi estudado em câncer cervical em diferentes populações. Duarte e colaboradores (2005) avaliaram a associação entre esse polimorfismo e o risco de desenvolver carcinoma cervical invasivo em um estudo caso-controle na população portuguesa, onde mulheres portadoras do alelo A apresentavam risco duas vezes maior de progressão da lesão. Segundo estudo de meta-análise realizado por Ding e colaboradores (2012), o alelo A nesse polimorfismo estava associado ao risco de desenvolvimento de câncer cervical entre mulheres brancas e asiáticas, porém, nenhuma associação foi encontrada para a população africana. Contudo, relatos contraditórios não demonstraram correlação deste polimorfismo com o carcinoma (Stanczuk et al, 2003; Govan et al, 2003; Wang et al., 2012, Barbisan et al., 2012). O polimorfismo de TNF- α na posição -238G/A está associada a várias doenças, incluindo carcinoma de endométrio (Jang et al., 2001). Embora esse polimorfismo não tenha sido associado diretamente com a mudança nos níveis de expressão do gene, Liu e colaboradores (2012) encontraram uma associação do genótipo heterozigoto com o baixo risco para o desenvolvimento do câncer cervical, em uma população Argentina.

Vale ressaltar que esses achados são provenientes de diferentes grupos populacionais e, portanto, indicam que o perfil genético de diversos grupos pode contribuir na patogênese da infecção por HPV.

Considerando que o TNF- α exerce suas funções biológicas através de uma interação com seus receptores (TNFR1 e TNFR2), diversos estudos vêm associando o polimorfismo desses receptores a várias doenças infecciosas e em alguns tipos de câncer. Polimorfismos genéticos podem desencadear uma modificação conformacional na molécula de TNFR1, consequentemente levando a alterações na sinalização induzida por TNF- α (Glossop et al., 2003). Os genes que codificam os receptores de TNF- α possuem múltiplos polimorfismos (Pitts et al, 1998; Pantelidis et al 1999), onde em *TNFR1*, SNPs foram encontrados nas posições (+36, -303, -383, -609) do exon 1 e introns 2, 4, 6, e 8, enquanto que no *TNFR2* foram observados em 4 éxons (4, 6, 9 e 10). Foi visto que polimorfismos em genes relacionados a apoptose, como *Bax* (pró-apoptótico) e *Bcl2* (anti-apoptótico), podem afetar tanto a expressão quanto a atividade de proteínas, podendo, no entanto, estarem associados ao risco de desenvolvimento de vários cânceres humanos (Chen et al., 2009). Ainda não há relatos na literatura associando o polimorfismo destes genes à infecção por HPV. Contudo, um estudo prévio de nosso grupo (Fernandes et al., 2013 não publicado), ao avaliar o polimorfismo do gene *Bax* -248G/A, demonstrou que mulheres com LSIL ao serem comparadas ao grupo controle (sem lesões), apresentaram um leve aumento no fator de risco ($p < 0.001$, OR = 4.28 [2.36-7.83]), indicando que o genótipo GG pode influenciar no risco de NIC, mas não na severidade da lesão.

Um estudo descrevendo associações em *TNFR1* (-609G/T) e *TNFR2* exon 9 (-1176G/A) e exon 10 (1663G/A, 1668T/G e 1690C/T) em carcinoma oral relacionado ao consumo de tabaco foi realizado em uma população indiana. Neste estudo, foi demonstrado que pacientes com carcinoma oral apresentaram menor frequência de genótipo TT em *TNFR1* (-609) e CT em *TNFR2* (-1690), e maior frequência do haplótipo AATT em *TNFR2*, quando comparados com controles. Esses resultados sugerem que o haplótipo AATT pode estar relacionado ao aumento da susceptibilidade ao carcinoma oral, e o genótipo -609T/T do *TNFR1*, relacionado a um caráter protetor, na população Indiana (Gupta et al, 2008). Por outro lado, Lee e colaboradores (2010) estudaram o polimorfismo de *TNFR1* na posição -329G/T em carcinoma de pulmão de células não-pequenas, onde encontraram uma associação do alelo

T com a menor sobrevida em pacientes, e que esse polimorfismo afeta a expressão desse receptor em tumores.

Outros polimorfismos em *TNFR1* são estudados em diversas doenças além de câncer. Dentre os mais investigados na literatura, estão os polimorfismos +36A/G, -383A/C e -609G/T, envolvidos em doenças inflamatórias como artrite reumatóide, doença de Crohn, aspergilose pulmonar, entre outras. Um estudo realizado por Sainz e colaboradores (2009) avaliou o polimorfismo de *TNFR1* na posição -609G/T em aspergilose pulmonar invasiva (API) em pacientes com doenças hematológicas. Foi observada uma diferença significativa na distribuição dos genótipos de *TNFR1*-609G/T em relação à pacientes com aspergilose e controles. A presença de API foi significativamente mais freqüente em portadores do alelo G e menos freqüente em pacientes portadores do genótipo TT. Ao avaliarem a regulação de *TNFR1* na infecção por *Aspergillus* através de PCR quantitativo o grupo observou expressão significativamente baixa de RNAm *TNFR1* em pacientes em relação aos controles e uma associação aos portadores do alelo G, concluindo, assim, que o polimorfismo nessa região promotora está envolvido na susceptibilidade a API, influenciando nos níveis de expressão de RNAm *TNFR1*, levando a um defeito na resposta Th1 contra o *Aspergillus*.

A associação do polimorfismo de *TNFR1* +36A/G e a persistência de reumatismo palindrômico, foi investigado em população de Taiwan, onde o alelo G e o genótipo AG foram significativamente associados com a persistência da doença (Lu et al., 2007). Waschke e colaboradores (2005) investigaram esse polimorfismo na Doença de Crohn, demonstrando uma associação significante entre o alelo mutante de *TNFR1*+36 em pacientes com DC, sendo o alelo G mais freqüente nos pacientes em relação aos controles. Porém, ao avaliarem associação desse genótipo com as manifestações clínicas da doença, não encontraram associação.

Diante do exposto e considerando que não há relatos de SNPs em *TNFR1* em infecções causadas pelo HPV, nossa hipótese é que na população brasileira, os polimorfismos para os receptores de TNF- α possam estar associados às lesões cervicais causadas pelo HPV, podendo ser utilizado como marcador de prognóstico para o câncer cervical.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos indutores da carcinogênese cervical induzida pela infecção pelo HPV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar o polimorfismo no receptor para TNF- α (*TNR1* posição +36A/G) em mulheres infectadas pelo HPV.
2. Associar a frequência deste polimorfismo com a presença das lesões cervicais associadas à infecção pelo HPV.
3. Caracterizar a expressão deste receptor em lesões de colo uterino de mulheres infectadas pelo HPV.
4. Comparar se os diferentes genótipos para o gene em questão se correlaciona com a expressão fenotípica *in situ*.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA

A presente proposta trata-se de um estudo caso-controle prospectivo e retrospectivo em relação a inclusão das voluntárias e a obtenção das amostras cervicais, respectivamente. Para realizar este estudo, duas coortes de pessoas de sexo feminino foram recrutadas. A primeira proveniente do Serviço de Patologia Cervical do Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), sob responsabilidade do Dr. Fabio Russomano, onde foram incluídos as voluntárias do grupo caso e a segunda do Serviço de Ginecologia do Ambulatório Piquet Carneiro/UERJ e na Disciplina de Ginecologia do Hospital Pedro Ernesto/UERJ, sob a responsabilidade do Dr. Evandro Mendes Klumb e da Dra Jacyara Maria Brito Macedo, onde foram incluídos as voluntárias do grupo controle.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IPEC-FIOCRUZ (CEP nº 0001.0.009.000-05) e do IFF (CEP 0051.0.008.008-08); no projeto intitulado “Identificação da prevalência de infecção e doença causada por subtipos do HPV indutores de câncer cervical e sua correlação com fatores de prognósticos genéticos - ligados a indução da carcinogênese - e ambientais em coorte de mulheres HIV-1 positivas”. Todas as voluntárias incluídas assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Esta proposta não interveio com o método diagnóstico e a conduta médica. Todas as pacientes foram atendidas pelos médicos ginecologistas que indicaram e fizeram, quando necessário, a devida intervenção clínica. As pacientes que apresentaram citologia anormal do colo uterino foram encaminhadas ao Setor de Patologia Cervical do Departamento de Ginecologia do IFF-Fiocruz, onde foi realizado a colposcopia. Caso houvesse suspeita de

lesão, um fragmento era retirado e encaminhado para o Departamento de Anatomia Patológica do IFF, responsável pelo diagnóstico histopatológico das amostras coletadas.

Inicialmente, a seleção e inclusão das pacientes foram realizadas a partir da história prévia de diagnóstico de lesões cervicais através da citologia presente nos prontuários dessas mulheres e com posterior, colposcopia alterada com biópsias. Neste momento, todas as mulheres foram convidadas a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e uma amostra de sangue foi coletada para a avaliação da genotipagem do *TNFR1*. Para a avaliação da expressão de TNFR1 nas lesões cervicais, foram selecionadas amostras de lesões cervicais confirmadas por histopatologia, e classificadas como lesões de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) no Departamento de Anatomia Patológica do IFF.

3.1.2 Critérios de inclusão

Neste estudo, foram incluídas mulheres maiores de 18 anos e que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, após serem informadas dos objetivos do estudo. Todas as voluntárias apresentaram, ou não, histórico de lesão cervical (NIC), sendo subdividas em:

- Grupo LSIL = mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de baixo grau;
- Grupo HSIL = mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de alto grau;
- Grupo Controle = mulheres com citologia negativa no momento da coleta e sem história prévia de lesão cervical.

3.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas pacientes que estavam grávidas no momento do estudo, HIV positivas, e que se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.1.4 Questionário sócio-econômico e identificadores de fatores de risco ambiental para o HPV

Questionário padronizado foi respondido por todas as pacientes para levantar dados referentes a: raça, idade, número de parceiros no último ano, início da vida sexual, tabagismo, consumo de cigarros por dia, etilismo, uso de drogas lícitas e ilícitas, histórico de câncer cervical na família, caso de lesões recorrentes pelo HPV, histórico de outras DSTs no período de 1 a 5 anos, número de gestações, número de filhos, abortos espontâneos e uso de drogas/produtos carcinogênicos. Todas as informações obtidas em questionário são confidenciais. Somente os colaboradores citados no início do termo de consentimento (Anexo 1), tiveram acesso a estes dados, que poderiam ser discutidos com pesquisadores de outras Instituições sem fornecer nenhuma identificação da voluntária.

3.2 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE TNF- α (*TNFR1*)

3.2.1 Obtenção de amostras biológicas

A extração do DNA genômico foi feita logo após a coleta do 5 ml de sangue em tubo de EDTA, utilizando o kit comercial da Qiagen® (Hilden, Germany), seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi

verificada através da preparação de gel de agarose a 1% onde foi visualizada uma única banda em luz ultra-violeta.

3.2.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico, foram utilizados 200 µL da alíquota do sangue total em EDTA previamente descongelado. Utilizou-se o QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen®). A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico seguiu o protocolo descrito pelo fabricante: 20 µL da proteinase Qiagen foi adicionada a um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*, previamente rotulado com o número da amostra. Adicionou-se a estes tubos, 200 µL de cada amostra de sangue, seguido de 200 µL do tampão AL, do próprio Kit. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos. A amostra foi incubada a 56°C por 10 minutos e centrifugada rapidamente a 10.000 rotações por minuto (rpm), o processo foi repetido por 3 vezes, para remover os possíveis resíduos da tampa. Foram adicionados 200 µL de etanol (96 a 100%, Merck) e homogeneizados em vortex por 15 segundos. A amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm, rapidamente. A seguir, a amostra foi cuidadosamente transferida para a coluna QIAmp e a mesma centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi novamente transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit), e o filtrado foi descartado. Adicionou-se 500 µL do tampão AW1 (incluso no kit) e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500 µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna QIAmp foi transferida para um microtubo de 1,5 mL (sem tampa) e o filtrado descartado. Adicionou-se 100 µL do tampão AE (do Kit), incubando-se a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e então centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi descartada. O filtrado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e o DNA genômico foi acondicionado em freezer – 70°C.

Seis microlitros (µL) de cada amostra de DNA foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, em tampão TBE 1X,

a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen). O DNA genômico foi corado em uma solução de Brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em luz ultravioleta através do transiluminador (UVP).

3.2.3 Amplificação por PCR e RFLP

3.2.3.1 Determinação do polimorfismo de *TNFR1* +36A/G

Os polimorfismos foram determinados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e RFLP. Os polimorfismos localizados no gene *TNFR1* resultante da atividade da endonuclease *MspA1I* (BioLabs, Inglaterra) foram identificados através da utilização dos *primers* específicos (Cereda *et al.*, 2008), como descrito a seguir:

Primer Foward: 5'-GAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGG-3'

Primer Reverse: 5'-ACCAGGCCCGGGCAGGAGAG-3'

O fragmento alvo do DNA genômico foi amplificado por PCR utilizando-se termociclador GeneAmp 9700 Applied Biosystem de acordo com o protocolo já estabelecido no laboratório.

Para cada amostra foi preparado um mix contendo: 3,2 µL (40,8 nmol) de *primer TNFR1 (forward)* (Invitrogen®), 3,2 µL (44,4 µM) de *primer TNFR1 (reverse)*, 0,3 µL (100mM) de dNTP(Applied Biosystem®), 1,5 µL de MgCl₂ (25mM, Promega), 2,5 µL de Tampão (5X, Promega), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen®), 12 µL de H₂O MiliQ estéril. O volume final do mix foi de 23 µL sendo adicionado 2µL DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 25µL. A PCR foi realizada no Termociclador (Applied Biosystems). Os ciclos utilizados foram os seguintes:

95°C (5 minutos), 35 ciclos de 95°C (1 minuto), 73°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto) seguidos por 72°C (5 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 2%, utilizando TBE 1X. Foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen). O DNA foi corado em uma solução de brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta em transluminador.

As imagens foram capturadas usando um sistema de captura de imagem com o aparelho Loccus, usando o programa LPIX.

3.2.4 Digestão com enzimas de restrição

Para determinar o genótipo de cada indivíduo, no *locus* estudado, foi realizada digestão por enzima de restrição específica. Assim, o produto do PCR amplificado para o *loci* do *TNFR1* foi submetido à digestão com a enzima de restrição *MspaA1I*. O protocolo adotado foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada amostra foi preparado um mix da enzima de restrição *MspaA1 I* contendo: 7,3 µL de água pura (MilliQ), 0,5 µL (10000 U/ml) *MspaA1 I* (Biolabs) e 2 µL de Tampão (10 X, Biolabs) e 0,2 µL (10mg/ml, Biolabs) de BSA. Para cada amostra, a digestão com a enzima de restrição *MspaA I* foi feita utilizando 10 µl do mix da enzima específica adicionados a 10 µl do produto da PCR para *TNFR1*, e em seguida foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

3.2.5 Eletroforese em gel de agarose

Após a incubação, os produtos da digestão foram visualizados através da corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 3%, utilizando TBE 1X. O produto da digestão foi corado com brometo de etídeo em corrente de 60 volts

em tempo médio de três horas, utilizando 20 µl do produto da digestão +1 µl de corante (solução de azul de bromo fenol, Invitrogen). Como marcador de peso molecular foi usado 1,5 µl do peso molecular padrão (50bp) + 1,5 µl de corante.

Ao término da corrida eletroforética o produto da digestão pode ser visualizado sob luz ultravioleta. A visualização do padrão de bandas do polimorfismo no gel de agarose a 3% ocorre de acordo com a figura 4.

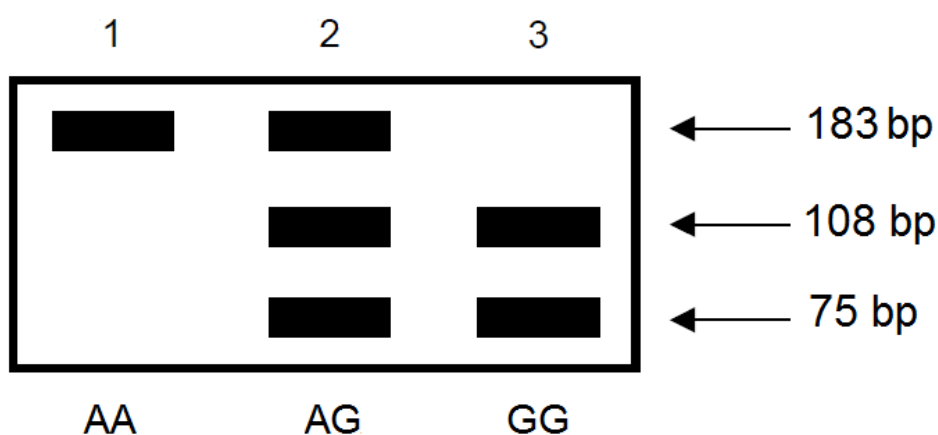


Figura 5: Esquema da eletroforese em gel mostrando os genótipos do *loci TNFR1* digeridos pela enzima de restrição *MspaA1I*. 1. genótipo AA apresentando banda única de 183bp; 2. genótipo AG apresentando três bandas de 183bp, 108bp e 77bp. 3. genótipo GG apresentando duas bandas de 108bp e 75bp.

3.3 EXPRESSÃO *IN SITU* DE TNFR1 EM LESÕES DE COLO UTERINO

Para determinar a expressão *in situ* de TNFR1 foi realizada a técnica da imunoperoxidase indireta em fragmentos de lesões cervicais parafinizados.

Inicialmente, foi realizada a desparafinização fria com 2 banhos de xilol frio, 2 banhos de álcool (5 minutos cada) e água destilada. Após essa etapa, foi feita a recuperação Antigênica com o *DakoCytomation Target Retrieval* (Dako, Glostrup, Dinamarca) em banho maria à 95°C. Após 40 minutos, a cuba foi retirada e esfriada por 20 minutos na própria solução de recuperação em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas diversas vezes em água destilada. As etapas subseqüentes seguiram o protocolo do kit LSAB (Dako).

A inibição da peroxidase dos cortes foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio (LSAB, Dako) por 15 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente, sendo a última lavagem feita em TBST (TBS a 0,05% de Tween 20). As lâminas foram incubadas com *DakoCytomation Protein Block Serum-free* (Dako), com o objetivo de diminuir as ligações inespecíficas, e colocadas em câmara úmida. Após 30 minutos, o excesso do reagente foi removido e as lâminas foram incubadas *overnight* com o anticorpo policlonal anti-TNFR1 humano (Santa Cruz, Texas, USA) e no corte de controle negativo com TBST. Após a incubação, os cortes foram lavados em TBST (3 banhos de 5 minutos), e incubados com o anticorpo secundário biotilado anti-coelho (LSAB, Dako). As lâminas foram novamente lavadas em TBST (3 banhos de 5 minutos) e incubadas com o complexo streptavidina-HRP (LSAB, Dako). Após a lavagem em TBST (3 banhos de 5 minutos), as lâminas foram reveladas com 3'3 diaminobenzidina (DAB, LSAB, Dako). Ao apresentar precipitados de coloração castanha, finaliza-se a reação colocando as lâminas em água destilada e logo após lavamos em água corrente abundantemente. Após essa lavagem, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por 2 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente. Logo após, as lâminas foram desidratadas em 3 lavagens com álcool gradativo (10 minutos cada) e diafinizadas em 2 lavagens em xilol (10 minutos cada). E finalizamos, montando as lâminas com bálsamo do Canadá e lamínulas.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS POSITIVAS

Foi avaliada a presença de positividade das células existentes no epitélio, camada basal do mesmo, córion e na região perivascular do material parafinado em até 20 campos por área. Foi utilizado microscópio óptico composto por uma objetiva com aumento de 40 vezes e uma ocular gradeada com aumento de 10 vezes. Em cada campo foi registrado o número total de células positivas para o marcador TNFR1. Todos os casos foram fotografados para permitir futuras avaliações e servirem como forma de ilustração para este trabalho.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O banco de dados foi construído em SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 16.0. As frequências genótípicas e alélicas foram determinadas em casos e controles utilizando esta ferramenta. Para definirmos a importância dos SNPs de *TNFR1* na indução de lesões cervicais foi utilizada as diferenças na distribuição genotípica e alélica em casos (portadores de lesões cervicais causadas pelo HPV) e controles; da mesma forma para identificarmos o papel deste gene na indução de lesões cervicais, o grupo caso foi estratificado em dois subgrupos (LSIL e HSIL). As análises foram realizadas empregando programa Epi-Info pelo método de Qui-Quadrado. Em caso de se encontrar amostras menores de 5, o método de Fisher foi empregado. Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado para verificarmos a distribuição dos genótipos na população caso e controle.

Associações entre os dados epigenéticos e as frequências de genótipos e alelos foram empregados utilizando o pacote estatístico do SPSS. As análises genótípicas foram ajustadas pelos fatores: idade, etnia, fumo, álcool, sexarca, menarca, número de gestações e número de parceiros.

Como não dispomos de dados publicados em relação à frequência dos genótipos e alelos do *TNFR1* na população brasileira, nossos dados foram comparados à frequência descrita em outras populações analisadas para este polimorfismo em doença auto-imunes e infecciosas. Com isso, o cálculo amostral foi baseado na menor frequência gênica do polimorfismo do gene estudado, 11% para o genótipo GG (Cereda *et al*, 2008). Foi adotado 95% de confiança e uma proporção 1:1 entre casos e controles. O tamanho amostral foi então calculado em 97 mulheres no grupo controle e 97 no grupo de casos (Epi-Info 6).

Para a avaliação da expressão de *TNFR1*, foram utilizados o teste Mann-Whitney para comparar médias de células expressando o marcador nas áreas estudadas. Para todas as análises estatísticas foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Trezentas e sessenta e cinco voluntárias foram incluídas para a genotipagem para *TNFR1+36 A/G*. Cento e oitenta e três casos (50,1%) mostraram histórico de lesões cervicais e foram classificadas como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL, n=79, 43,2%) e lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL, n= 104, 56,8%), determinadas por análise histopatológica. Cento e oitenta e duas mulheres (49,9%) foram incluídas como voluntárias e não apresentaram lesão cervical sob análise ginecológica ou relato prévio desta e foram incluídas no grupo controle. A tabela 1 descreve dados comportamentais e clínicos de cada grupo. A faixa etária variou entre 18 a 65 ($37,6\pm 10,33$) anos nas mulheres com lesões cervicais. Nos subgrupos LSIL e HSIL, a média de idade foi $36,24\pm 10,82$ e $38,43\pm 10,39$ anos, respectivamente, sem diferença estatística. A média de idade no grupo controle foi $37,73\pm 10,10$ anos. Não houve diferença estatística na idade entre os grupos (Tabela 1). Ao avaliar as demais variáveis (sexarca, menarca, número de filhos, gestações, fumo e álcool), não foi encontrada diferença estatística entre os grupos analisados.

Tabela 1. Dados Clínicos e Comportamentais

	CONTROLES (n=182)	NIC	
		LSIL* (n=79)	HSIL*(n=104)
Idade (Média ± DP)	37,73 ± 10,10	36,24 ± 10,82	38,43 ± 10,39
Etnia (n,%)			
Branca	47 (25,8)	31(39,2)	30 (29)
Amarela	0 (0)	0 (0)	3 (3)
Indígena	2 (1,1)	1 (1,3)	1 (1)
Parda	60 (3,3)	29 (36,7)	51 (49)
Negra	55 (30,2)	18 (22,8)	19 (18)
Não determinada	18 (9,9)	0 (0)	0 (0)
Fumo (n,%)			
Sim	79 (43,4)	37 (47)	66 (63,5)
Não	80 (44)	42 (53)	38 (36,5)
Desconhecida	23 (12,6)	0 (0)	0 (0)
Álcool (n)			
Sim	2 (1,1)	56 (71)	80 (77)
Não	0 (0)	23 (29)	24 (23)
Desconhecida	180 (98,9)	0 (0)	0 (0)
Sexarca (Média ± DP)	17,66 ± 3,94	17,72 ± 4,06	16,92 ± 3,35
Menarca (Média ± DP)	12,97 ± 1,86	12,63 ± 1,79	12,63 ± 1,50
Gestações (Média ± DP)	2,66 ± 1,21	2,28 ± 1,98	2,77 ± 1,87

*LSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

*HSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

4.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA O GENE *TNFR1* +36 A/G

4.2.1 Distribuição genotípica e alélica *TNFR1*+36 A/G e sua associação com a presença de lesões cervicais (baixo e alto graus)

Para a análise do polimorfismo para o gene *TNFR1* na posição +36A/G, 348 amostras foram submetidas ao PCR-RFLP, seguindo o protocolo de Cereda *et al*, 2008. A frequência de genótipo observada desse SNP estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de casos e controles ($p= 0,521$ e $0,757$, respectivamente).

A figura 5 apresenta o gel de agarose mostrando os produtos de RFLP, digeridos pela enzima de restrição *MspA1I*, e a tabela 2, a comparação entre casos e controles. Através da avaliação do polimorfismo de *TNFR1* +36A/G, foi possível identificar que no grupo de casos, 80 (43,71%) destas apresentaram o genótipo AA, 79 (43,16%) o genótipo AG e 24 (13,11%) apresentaram o genótipo GG. Em relação ao grupo controle, este apresentou 93 AA (51,1%), 73 AG (40,1%) e 6 GG (8,8%). Quando os genótipos foram comparados entre os dois grupos, não foi observada diferença estatística entre estes, tanto no modelo de dominância como no modelo de co-dominância. A frequência do alelo A foi ligeiramente maior no grupo controle 259 (71%) do que no grupo de pacientes 237 (65,3%), porém, sem diferença estatística ($p= 0,089$). A frequência do alelo G foi menor no grupo controle (29%) do que nas pacientes (34,7%), contudo, sem diferença estatística (Tabela 2).

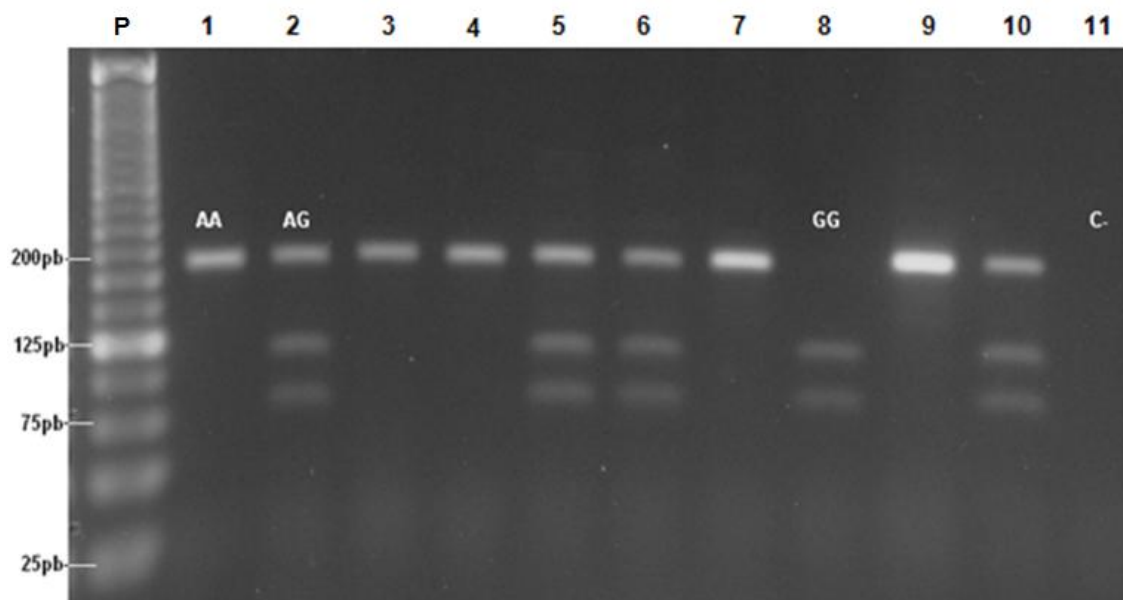


Figura 6: Gel de agarose à 3% mostrando os produtos de RFLP, digeridos pela enzima de restrição *MspA1I*, corados com brometo de etídio. P, marcador de peso molecular de 25bp DNA Ladder; genótipo AA (1, 3, 4, 7 e 9); genótipo AG (2, 5, 6 e 10); genótipos GG (8), controle negativo (11).

Tabela 2. Análise genotípica e alélica do polimorfismo do gene *TNFR1+36A/G* em mulheres com e sem lesão de colo uterino

Genótipos	Casos n= 183 (%)	Controles n=182 (%)	OR*	χ^2	p
AA	80 (43,71)	93 (51,1)	1	2,76	0,096
AG	79 (43, 16)	73 (40,1)	1,26		
GG	24 (13, 11)	16 (8,8)	1,74		
AA	80 (43,7)	93 (51,1)	0,74 [0,48-1,15]	1,99	0,157
AG+GG	103 (56,3)	89 (48,9)			
GG	24 (13,1)	16 (8,8)	1,57 [0,77-3,22]	1,75	0,186
AG+ AA	159 (86,9)	166 (91,2)			
Alelo A	239 (65,3)	259 (71)	0,76 [0,55-1,06]	2,88	0,089
Alelo G	127 (34,7)	105 (29)			

OR. Odds ratio (razão de chance);

A frequência dos genótipos e alelos das pacientes quando estes foram divididos de acordo com o grau de lesão intraepitelial cervical em dois subgrupos (LSIL vs HSIL) está descrita na Tabela 3. Foi possível observar que 29 (36,70%) pacientes com LSIL apresentaram genótipo AA, 41 (51,9%) AG e 9 (11,4%) apresentaram genótipo GG. Já nas pacientes com HSIL, observamos que 51 (49,03%) apresentaram genótipo AA, 38 (36,53%) AG e 15 (14,42%) apresentaram genótipo GG. Quando os genótipos de ambos os grupos foram comparados com o grupo controle, não foi observada diferença estatística entre HSIL e controles. Da mesma forma, não foi observada diferença estatística entre a frequência de alelos de ambos os grupos ($p=0,33$). Porém, uma significância estatística foi observada entre os grupos LSIL e controle quando analisados por co-dominância (LSIL vs Controle $p=0,05$) e dominância (LSIL vs Controle $p=0,03$ [AA]). Ao comparar a frequência do alelo A de ambos os grupos, foi observado que a frequência do alelo A foi maior no grupo controle 259 (71%) do que no grupo de LSIL 99 (62,7%) ($p=0,05$), indicando que o genótipo AA possui um caráter protetor diante do desenvolvimento de lesões cervicais.

Ao analisarmos os dados comportamentais e a distribuição dos genótipos, por análises univariada, não foi encontrada diferença estatística para nenhuma das variáveis estudadas.

Tabela 3. Análise genotípica e alélica do polimorfismo do gene *TNFR1* (+36A/G) em mulheres com lesões de alto e baixo grau comparadas com grupo controle

Genótipo	HSIL	Controle	OR	χ^2	p	LSIL	Controle	OR	χ^2	p
	N= 104 (%)	n= 182 (%)				n= 79 (%)	n= 182 (%)			
AA	51 (49,03)	93 (51,1)	1	0,856	0,354	29 (36,70)	93 (51,1)	1	3,727	0,053
AG	38 (36,53)	73 (40,1)	0,95			41 (51,9)	73 (40,1)	1,80		
GG	15 (14,42)	16 (8,8)	1,71			9 (11,4)	16 (8,8)	1,80		
AA	51 (49,03)	93 (51,1)	0,92 [0,55-1,53]	0,11	0,737	29 (36,7)	93 (51,1)	0,56 [0,31-0,99]	4,58	0,032
AG+GG	53 (50,96)	89 (48,9)				50 (63,3)	89 (48,9)			
GG	15 (14,42)	16 (8,8)	1,75 [0,78-3,94]	2,17	0,14	9 (11,4)	16 (8,8)	1,33 [0,52-3,39]	0,43	0,511
AG+AA	89 (85,57)	166 (91,2)				70 (88,6)	166 (91,2)			
Alelo A	140 (67,30)	259 (71)	0,83 [0,57-1,23]	0,93	0,335	99 (62,7)	259 (71)	0,68 [0,45-1,03]	3,69	0,054
Alelo G	68 (32,7)	105 (29)				59 (37,3)	105 (29)			

Ao comparar os grupos HSIL e LSIL entre si, não foi observada diferença nas frequências de genótipos e alelos do polimorfismo, como mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Análise genotípica e alélica do polimorfismo do gene *TNFR1* (+ 36 A/G) em mulheres com lesões de alto e baixo graus.

Genótipo	HSIL n= 104 (%)	LSIL n= 79 (%)	OR	χ^2	p
AA	51 (49)	29 (36,7)	1	0,813	0,367
AG	38 (36,5)	41 (51,9)	0,53		
GG	15 (14,4)	9 (11,4)	0,95		
AA	51 (49)	29 (36,7)	1,66 [0,84-3,15]	2,77	0,095
AG+GG	53 (51)	50 (63,3)			
GG	15 (14,4)	9 (11,4)	1,31 [0,50-3,47]	0,36	0,547
AG+AA	89 (85,6)	70 (88,96)			
Alelo A	140 (67,3)	99 (62,7)	1,23 [0,78-1,94]	0,86	0,354
Alelo G	68 (32,7)	59 (37,3)			

LSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
 HSIL = Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

4.3 EXPRESSÃO DO TNFR1 EM LESÕES CERVICAIS

Após a avaliação genotípica do *TNFR1*, foi avaliada a expressão da proteína em fragmentos cervicais de mulheres apresentando ou não lesões cervicais.

A expressão de TNFR1 no epitélio foi observada de forma insignificante em raros queratinócitos (menos de 1 célula/mm²), apesar de ser estatisticamente diferente entre os grupos controle e LSIL ($p= 0,015$), e entre LSIL e HSIL ($p=0,04$). Da mesma forma, na camada basal do epitélio, apesar do número de queratinócitos expressando TNFR1 ser muito reduzido, houve uma diminuição significativa na

expressão de TNFR1 conforme a progressão entre as lesões de baixo ($p=0,006$) e alto ($p<0,001$) grau quando comparados ao grupo controle (tabela 5, figura 6).

A análise realizada no corion mostrou um aumento na expressão deste marcador em células inflamatórias presentes nas amostras de mulheres do grupo HSIL quando comparado com o grupo controle (2,6 vezes, $p<0,001$) e LSIL (2,5 vezes, $p<0,001$). Ao avaliarmos a expressão de TNFR1 em células presentes na região perivascular, não foi encontrada nenhuma diferença significativa (tabela 5, figura 6).

Tabela 5. Distribuição das células expressando TNFR1 em lesões cervicais

	Controle* (n=17)	LSIL* (n= 14)	HSIL* (n= 15)
TNFR1/mm²			
Epitélio	0,19 ± 0,10	0,13 ± 0,21	0,17 ± 0,11
Camada basal do epitélio	0,78 ± 0,31	0,41 ± 0,34	0,21 ± 0,10
Corion	1,83 ± 0,72	1,93 ± 1,20	4,83 ± 1,65
Perivascular	0,35 ± 0,25	0,4 ± 0,36	0,49 ± 0,75

*Média ± Desvio Padrão

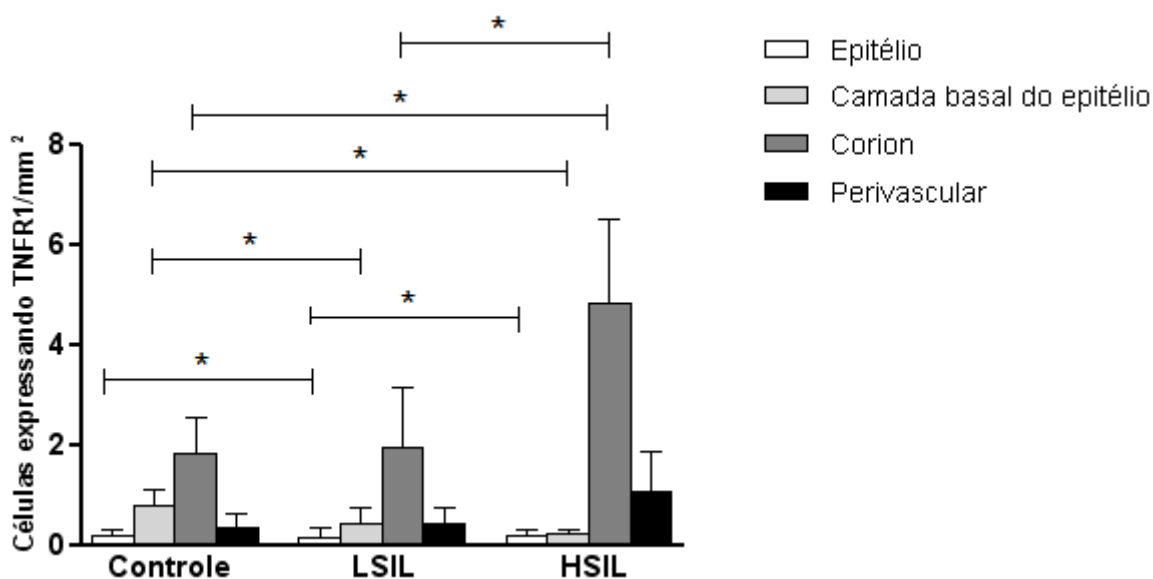


Figura 7. Distribuição de células que expressaram TNFR1 nas lesões cervicais em mulheres do grupo controle, LSIL e HSIL

Além disso, foi avaliada a expressão de TNFR1 nos grupos de acordo com os genótipos. Assim como anteriormente observado, o número de células expressando a proteína foi insignificante (<1 célula/mm²) no epitélio e camada basal do mesmo em todos os genótipos estudados, impossibilitando que haja alguma significância biológica nestas áreas (figura 7).

Em relação ao corion, observou-se que as mulheres portadoras do genótipo AG, apresentaram um aumento na expressão deste receptor em células inflamatórias, quando comparados os grupos HSIL e controle (3 vezes, $p=0,001$) e LSIL (5 vezes, $p=0,001$), indicando que a progressão para lesões pré-malignas induz um aumento na expressão de TNFR1 em células inflamatórias. Quando analisada no genótipo GG, o aumento da expressão de TNFR1 foi 2,7 vezes maior em HSIL quando comparado com o grupo controle ($p=0,02$) e de 2,4 vezes quando comparado com LSIL ($p=0,02$). No entanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada naquelas que apresentavam genótipo AA.

Avaliamos se a expressão dos genótipos em *TNFR1+36AG* poderia induzir alterações na expressão de TNFR1 intra-grupos. Contudo, somente foi observada diferença significativa no grupo de HSIL, onde as portadoras do genótipo AG apresentaram 1,9 vezes maior expressão em relação ao genótipo AA ($p= 0,008$) e 1,2 vez maior em GG ($p= 0,03$). Quando as portadoras do genótipo AG foram comparadas as portadoras de GG ($p= 0,016$), uma maior expressão de TNFR1 foi observada no genótipo AG (1,5 vezes).

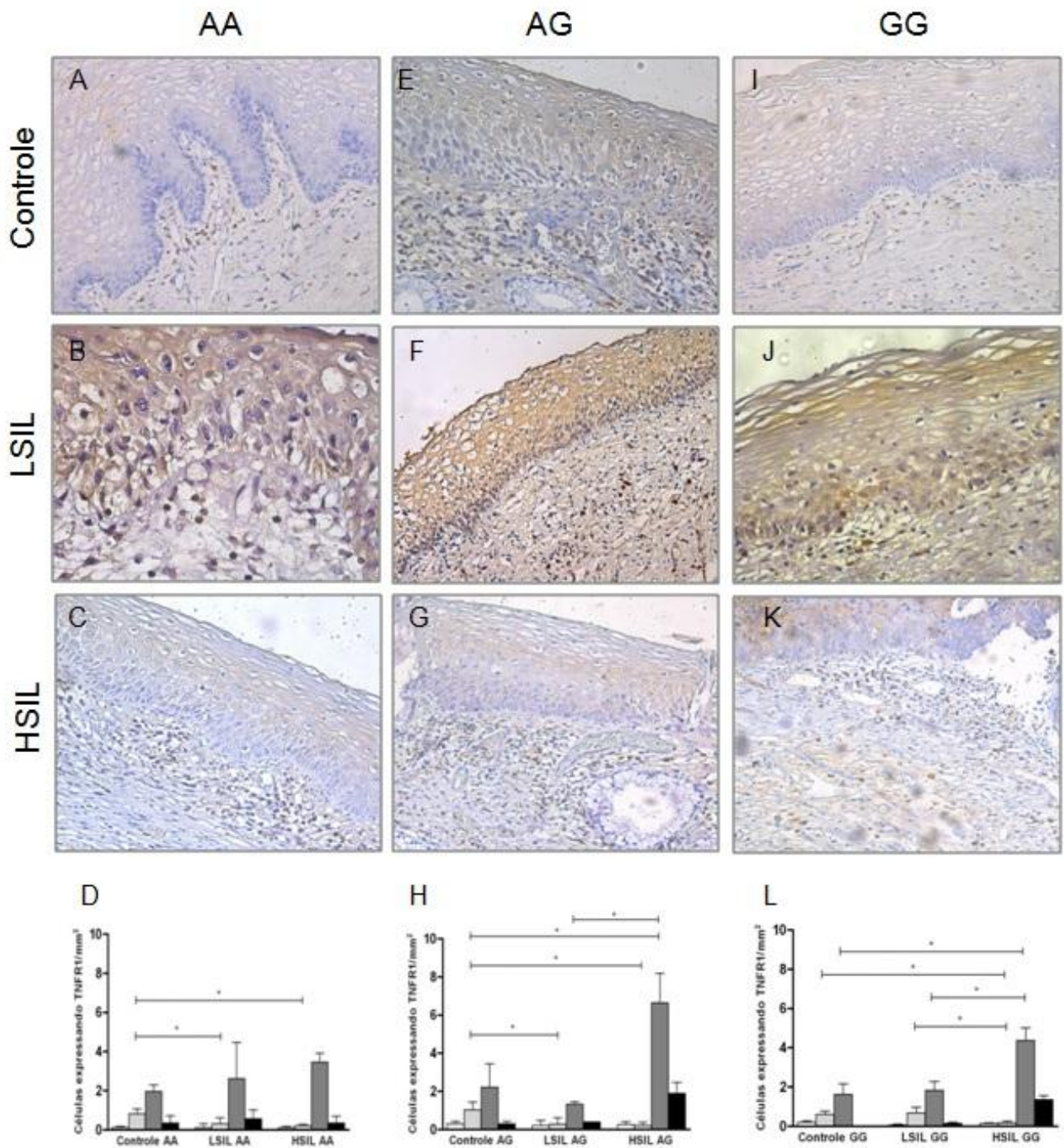


Figure 8: Distribuição de células expressando TNFR1 na cérvix uterina de mulheres sem lesão cervical, grupo controle (A, E, I) e mulheres com lesões cervicais, divididas em LSIL (B, F, J) e HSIL (C, G, K). As análises entre a expressão de TNFR1 e os genótipo AA (A, B, C, D), AG (E, F, G, H) e GG (I, J, K, L). O número de células positivas foi demonstrado no epitélio , camada basal do epitélio , corion , perivascular . (Aumento de 200x; exceto B e H 400x, *p<0,05).

5 DISCUSSÃO

O câncer cervical é um problema de Saúde Pública em todo mundo e sua associação com o HPV tem sido estabelecida pela detecção do DNA viral em 90% a 100% das lesões cervicais (Bosch et. al., 2008). A carcinogênese é um processo complexo, sendo influenciada tanto pela presença do HPV quanto por fatores ambientais, comportamentais e genéticos. Dentre os fatores genéticos podemos incluir aqueles relacionados as alterações no gene da citocina TNF- α .

As atividades celulares induzidas pelo TNF- α são mediadas através da interação com seus receptores TNFR1 e R2, membros da superfamília de receptores TNF- α . Uma vez que não existe na literatura estudos que avaliem o polimorfismo destes receptores em câncer cervical, o presente estudo buscou identificar a frequência genotípica do SNP +36A/G de *TNFR1* em mulheres com histórico de lesão cervical e a expressão de TNFR1 em lesões cervicais.

Pelo nosso conhecimento até o momento, não há relatos na literatura relacionando esse polimorfismo com o câncer cervical e/ou infecção causada pelo HPV. Contudo, há artigos que o descrevem em doenças inflamatórias como artrite reumatoide (Diudè et al, 2004), artrite psoriática (Morales-Lara et al., 2012), espondilite anquilosante (Chatzikyriakidou et al, 2009), doença de Crohn (Waschke et al, 2005), assim como em outras desordens como aspergilose pulmonar (Sainz et al, 2009), glaucoma (Razeghinejad et al, 2009) endometriose (Chae et al, 2008) e resposta a tratamentos com anti-TNF- α , (Matsukura et al, 2008) apesar de apresentarem resultados contraditórios.

No presente estudo, o genótipo *TNF+36AA* conferiu caráter protetor ao desenvolvimento de lesões cervicais de baixo grau, tanto no modelo de co-dominância ($p= 0,05$) quanto no de dominância ($p=0,03$). Pacientes com genótipo AA tem 4,58 vezes de chance de não desenvolver LSIL se comparados com aquelas portadoras dos genótipos AG e GG. Enquanto que aquelas portadoras do genótipo GG no modelo recessivo tem 0,43 ($p= 0,51$) vezes de chance para desenvolver

LSIL. Não observamos diferença entre os grupos LSIL e HSIL, indicando que o papel protetor do genótipo *TNF+36AA* pode estar somente relacionado ao desenvolvimento de lesões de baixo grau, uma vez instalada lesões pré-malignas este genótipo não possui papel protetor. O genótipo *TNF+36AA* possui caráter protetor em outras doenças. Dieudè e colaboradores (2004) encontraram numa população francesa e caucasiana, associação protetora entre o genótipo *TNF+36AA* e a artrite reumatóide (AR), sendo a frequência significativamente reduzida (24%) nos pacientes. Essa associação negativa com respeito ao genótipo *TNF+36AA*, pode ser vista por Waschke e colaboradores (2005) em uma população canadense, ao associarem esse polimorfismo com a susceptibilidade a Doença de Crohn (DC), onde observaram uma baixa frequência desse genótipo nos casos (32,2%). Além disso, o genótipo *TNF+36AA* pode estar relacionado com uma melhor resposta a tratamentos de indivíduos com artrite psoriática (AA 88%), em uma população espanhola (Morales-Lara et al., 2012). Contudo, na literatura, ainda é controverso o papel deste polimorfismo quanto a susceptibilidade e resistência a diversas doenças, visto que este SNP não foi associado a outras doenças, tais como artrite reumatóide (Bayley et al., 2003).

Uma associação entre o genótipo *TNF+36AG* e um reduzido efeito ao tratamento com infliximab (IFX – anti-TNF) em pacientes com doença de Crohn foi observada pelo grupo de Matsukura (2008). Em contrapartida, um estudo realizado em uma população alemã, não observou qualquer associação do polimorfismo *TNFR1+36A/G* com a resposta ao tratamento (Mascheretti et al., 2002). Vale ressaltar que todos esses estudos são provenientes de diferentes grupos populacionais e, portanto, essa discordância pode indicar que o perfil genético de diversos grupos pode influenciar na etiologia de diversas doenças inflamatórias.

Ao nosso conhecimento não existem relatos quanto ao papel deste SNP na carcinogênese induzida pelo HPV ou o desenvolvimento de lesões cervicais.

Embora estudos tenham associado o polimorfismo de *TNFR1+36A/G* com algumas doenças inflamatórias, ainda existem dúvidas a respeito da sua funcionalidade. Trata-se de uma mutação silenciosa, ou seja, não causa mudança no aminoácido (P12P), não tendo efeito funcional na estrutura da proteína (Bayley et al., 2003). A modificação no códon 12 nesse SNP de *TNFR1+36A/G* provavelmente

estaria em desequilíbrio de ligação com um outro polimorfismo funcional próximo e ainda não identificado (Tabor et al., 2002; Waschke et al., 2005).

Como citado anteriormente, é visto que a funcionalidade observada nesses estudos provém de outro polimorfismo que se encontra em desequilíbrio de ligação com o *TNFR1+36 A/G*. Isto pode ser demonstrado por Lu e colaboradores (2007) ao encontrar uma associação com o alelo G, juntamente com o genótipo AG, com a susceptibilidade ao reumatismo palindrômico persistente. Como esse polimorfismo não é funcional e devido às características clínicas autoinflamatórias entre o reumatismo palindrômico e TRAPS (Síndrome Periódica Associada ao Receptor de TNF), os autores sugeriram que o polimorfismo *TNFR1+36A/G* possa estar em desequilíbrio de ligação com a mutação causadora de TRAPS ou possa estar exercendo influência próximo a polimorfismos funcionais na região codificante de *TNFR1*. Glossop e colaboradores (2009) ao encontrarem associação entre anticorpos antinucleares e artrite reumatóide também sugeriram desequilíbrio de ligação com mutações associadas ao TRAPS, uma vez que essas têm sido associadas com a modulação da ligação do TNF- α e/ou liberação de TNFR solúvel, indicando que alterações em *TNFR1* podem ter conseqüências funcionais para a sinalização TNF- α / TNFR.

Em relação a associação do polimorfismo *TNFR1 +36 A/G* com lesões de colo uterino e câncer cervical é interessante que seja realizado um estudo de ligação para a procura de genes responsáveis por certas características e/ou doenças, como, utilizando-se uma varredura genômica a fim de identificar regiões cromossômicas candidatas para abrigar esses genes condicionadores, para posteriormente realizar uma análise nas regiões promissoras utilizando mapas de SNPs (Feitosa & Krieger, 2002).

O presente estudo aponta para uma associação entre o SNP +36A/G e a proteção contra o desenvolvimento de lesões cervicais de baixo grau (LSIL). Mesmo se tratando de um polimorfismo de mutação silenciosa e estando em desequilíbrio de ligação com outro gene ainda não identificado, esse polimorfismo pode ser usado como marcador associado à doença. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar o envolvimento do SNP +36A/G no desenvolvimento de lesões cervicais causadas por HPV, incluindo um maior número de amostras e análises funcionais do

gene estudado. Neste sentido, associamos a expressão de TNFR1 nas lesões cervicais de baixo e alto grau de desenvolvimento de câncer e a presença ou ausência do genótipo protetor AA.

A expressão da molécula TNFR1, em sua forma monomérica é constitutivamente expressa em todos os tecidos humanos e parece não ser alterada por citocinas, pelo menos na epiderme (Arnott et al., 2004). A trimerização desta molécula leva a sua funcionabilidade ao ligar-se ao TNF- α solúvel. Apesar de termos evidenciado diferenças estatísticas em relação a expressão de TNFR1 no epitélio e na camada basal do epitélio entre os grupos estudados, sua expressão foi rara (< 1,0 célula/mm²), incluindo em queratinócitos, indicando que estes receptores possam estar em sua forma não ativada (monomérica), o que não é evidenciada pela marcação com anticorpo.

A infecção pelo HPV pode influenciar a transdução de sinais apoptóticos gerados pela interação de TNF- α e seu receptor. Phillipova e colaboradores (2002) observaram que a oncoproteína E6 do HPV 16 não interfere na expressão da proteína, mas inibe a interação de TNFR1 e TRADD. Da mesma forma, Aguillar-Lemarroy e colaboradores (2001) observaram que esta mesma oncoproteína E6 se liga ao receptor TNFR1, interferindo na transmissão do sinal pro-apoptótico induzido por TNF- α , sugerindo, assim, que esta ligação impeça as interações subseqüentes requeridas para a formação do complexo funcional de sinalização para morte celular (*DISC*, em inglês) como a ativação da cascata de caspase (tais como caspase 8).

A função do receptor 1 de TNF- α está relacionada tanto como receptor de morte celular induzindo apoptose, quanto como indutor de atividade celular (Naudé et al., 2011). Contudo, Shojij et al., (1996) descreveram não haver diferença no número de células apoptóticas ou em ativação durante a carcinogênese induzida por diferentes subtipos de HPV.

Pacientes portadoras de HSIL possuem elevada expressão de TNFR1 em células inflamatórias no córion, indicando que estas células possam estar sendo ativadas conforme a progressão da doença. Assim, podemos sugerir que nas fases iniciais da infecção pelo HPV, onde não há ainda alterações celulares de alto grau, não haja presença de células específicas e ativadas que possam desencadear a fase efetora da resposta imune. Estes resultados corroboram com nossos estudos

prévios que demonstraram numerosas células inflamatórias, tanto TCD4⁺ como CD8⁺ na cérvix uterina, aumentando de acordo com a gravidade da lesão (Nicol et al., 2005). Da mesma forma, Alves e colaboradores (2010) observaram uma quantidade aumentada de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ em amostras de NIC II/III e carcinoma. A expressão de TNFR1 em linfócitos TCD4⁺ é pouco estudada e não reportada na carcinogênese ou em lesões uterinas. Contudo, o envolvimento de células T CD4 e sua relação com TNFR1 pode ser visto em outra condição inflamatória, como a artrite reumatoide (AR). A migração destas células parece estar relacionada com a expressão de TNFR1, uma vez que esse receptor é expresso em uma fração de T CD4⁺ de pacientes com RA, mas não em controles. A migração é dependente do gradiente de concentração de TNF- α *ex vivo* e o bloqueio de TNF- α ou TNFR1 resultou na anulação da migração de células T CD4⁺ no tecido sinovial *in vitro* (Rossol et al., 2013). Em nossos resultados não foi possível identificar a subpopulação linfocitária que expressa TNFR1 no córion no grupo de pacientes com lesões cervicais.

O perfil celular inflamatório identificado em nosso estudo parece ser basicamente composto de células mononucleares, e assim, células de Langerhans, macrófagos teciduais e monócitos recém-chegados a lesão, podem fazer parte deste pool de células inflamatórias e também estarem expressando TNFR1. A expressão de TNFR1 também pode ser vista em subpopulações de monócitos em pacientes com sarcoidose. Tanto pacientes quanto indivíduos saudáveis apresentaram alta expressão nos níveis de TNFR1 em monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺), enquanto que monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) expressaram altos níveis de TNFR2, sugerindo, portanto, a existência de duas subpopulações de monócitos expressando CD16 funcionalmente distintas (Hijdra et al, 2012). Em estudo prévio demonstramos que raros monócitos estavam presentes nas lesões (Nicol et al., 2005), mas podem estar associados a origem de macrófagos intra tumorais.

Mesmo que um polimorfismo na região codificante não cause a mudança de aminoácidos, ou mesmo que se encontre em uma região não codificante, ele pode afetar a função do gene através da alteração da instabilidade do RNA mensageiro, *splicing* ou localização do RNAm (Cartegni et al., 2002). De uma forma geral,

mutações sinônimas não são associadas com doenças e, portanto, dá-se menos prioridade para a genotipagem do que quando se trata de mutações em regiões codificantes, promotoras ou de *splice*. Porém, quando esse polimorfismo possui um potencial efeito na estabilidade do RNAm, é importante dar uma maior prioridade do que polimorfismos que se encontram em regiões de íntrons (Risch, 2000). Desta forma, associamos a expressão *in situ* de TNFR1 ao SNP +36A/G na cérvix uterina, na tentativa de associa-los ao desenvolvimento de lesão cervical.

Identificamos que as portadoras de *TNFR1+36AA* não apresentam alterações na expressão de TNFR1 independente do grau de lesão cervical. Não há relatos na literatura associando *in situ* a expressão de TNFR1 e o SNP *TNFR1+36A/G* na cérvix uterina ou em outro tecido. O dado mais interessante que identificamos foi a gradativa expressão de TNFR1 em portadoras dos genótipos GG e AG, principalmente em pacientes com HSIL. Há um aumento de 2,0 vezes na expressão em relação às portadoras do genótipo AA, visto como protetor em relação a indução de lesões de baixo grau. Desta forma, podemos inferir que a presença de TNFR1 pode estar sendo modulada negativamente pela infecção pelo HPV e este marcador pode ser utilizado como indicador para a progressão de lesões pré-malignas cervicais.

6 CONCLUSÕES

1. Houve uma associação entre o genótipo AA *TNFR1+36A/G* e a proteção para o surgimento de lesões cervicais de baixo grau.
2. Não houve relação entre os genótipos estudados e a progressão das lesões cervicais pré-malignas.
3. Houve um aumento na expressão de TNFR1 nas células inflamatórias no corion, indicando que estas células podem estar sendo ativadas conforme a progressão da doença.
4. Portadoras de *TNFR1+36AA* não apresentam alterações na expressão TNFR1 independente do grau de lesão cervical.
5. Presença de TNFR1 pode estar sendo modulada negativamente pela infecção por HPV e este marcador pode ser utilizado como indicador para a progressão de lesões pré-malignas cervicais.

7 PERSPECTIVAS

- 1- Avaliar polimorfismos funcionais em TNFR1 e TNFR2 em mulheres com histórico de lesão cervical causada por HPV.
- 2- Identificar a expressão de TNFR1 em subpopulações de linfócitos, monócitos e macrófagos intratumorais.
- 3- Avaliar o papel do TNFR1 e TNFR2 em células inflamatórias cervicais como moduladores da carcinogênese.
- 4- Avaliar o papel do TNFR1 em células inflamatórias como indutor de apoptose e/ou ativação celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 60(1):55-65.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(9):745-56.

Aguilar-Lemarroy A, Kirchhoff S, Whitaker N, Gariglio P, zur Hausen H, Krammer PH, Rösl F. Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer*. 2001; 93: 823–831.

Ahmed MI, Salahy EE, Fayed ST, El-Hefnawy NG, Khalifa A. Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: relationship to spontaneous apoptosis and TNF-alpha. *Clin Biochem*. 2001; 34(6):491–8.

Alves DB, Tozetti IA, Gatto FA, Cassandri F, Ferreira AM, Carlos Eurico DSF *et al*. CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected with human papillomavirus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(4):425-9.

Arany I, Grattendick KG, Tyring SK. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res*. 2002 Aug;55(2):331-9.

Arends MJ, Benton EC, McLaren KM, Stark LA, Hunter JA, Bird CC. Renal allograft recipients with high susceptibility to cutaneous malignancy have an increased prevalence of human papillomavirus DNA in skin tumours and a greater risk of anogenital malignancy. *Br J Cancer*. 1997;75(5):722-8.

Arnott AH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR. Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumor development. *Oncogene*. 2004; 23, 1902-1910.

Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10;113(2):276-83.

Barbisan G, Pérez LO, Contreras A, Golijow CD. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. *Tumour Biol.* 2012 Oct;33(5):1549-56.

Barnard P, Payne E, McMillan NA. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology.* 2000 Nov 25;277(2):411-9.

Basile JR, Eichten A, Zacny V, Münger K. NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res.* 2003 Feb;1(4):262-70.

Basile JR, Zacny V, Münger K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22522-8.

Bayley JP, Bakker AM, Kaijzel EL, Huizinga TWJ, Verweij CL. Association of polymorphisms of the tumour necrosis factor receptors I and II and rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2003; 42:969-971.

Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 1998 Oct 9;282(5387):290-3.

Berberoglu U, Yildirim E, Celen O. Serum levels of tumor necrosis factor alpha correlate with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2004;19(2):130-4.

Bernard X, Robinson P, Nomine' Y, Masson M, Charbonnier S, *et al.* Proteasomal Degradation of p53 by Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Relies on the Structural Integrity of p53 Core Domain. *PLoS ONE.* 2011; 6(10):e25981.

Bhat P, Mattarollo SR, Gosmann C, Frazer IH, Leggatt GR. Regulation of immune response to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunological Reviews.* 2010; 239:85-98.

Blüml S, Scheinecker C, Smolen JS, Redlich K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *International Immunology.* 2012; 1 of 7.

Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2010 Nov; 31(11):1905-12.

Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, Sanjose S, Bruni L *et al.* Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008 Aug; 19;26 Suppl 10:K1-16.

Bousarghin L, Touze A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31 and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol*. 2003; 77: 3846-3850.

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):149-60.

Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15;102(7):2490-5. Epub 2005 Feb 7.

Brener ND, Kann K, Kinchen SA *et al*. Methodology of the youth risk behavior, surveillance system. *MMWR Recomm Rep*. 2004; 3 (RR-12):1-13.

Camara GNL, Cerqueira DM, Oliveira APG, Silva EO, Carvalho LGS *et al*. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003 Oct; 98(7): 879-883.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*. 2002; 3, 285-298.

Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: A review. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011; 51:103-108.

Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: a review. *Aust NZJ Obstet Gynaecol*. 2011 Apr;51(2):103-8.

Castellsagué. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2008; 110: S4-S7.

Cereda C, Baiocchi C, Bongioanni P, Cova E, Guareschi S, Metelli MR *et al*. TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *Journal of Neuroimmunology*. 2008; 194:123-131.

Chae SJ, Kim H, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Kim JG. Tumor necrosis factor (TNF)-TNF receptor gene polymorphisms and their serum levels in Korean women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Nov;60(5):432-9.

Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Voulgari PV, Drosos AA. The role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptor polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Jul-Aug;27(4):645-8.

Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W *et al*. Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 2009 Sep;28(9):2008-12. Epub 2007 Aug 11.

Chuang MJ, Sun KH, Tang SJ, Deng MW, Wu YH, Sung JS *et al.* Tumor-derived tumor necrosis factor- α promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2008 May;99(5):905-13.

Clereci M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute.* 1997 Feb 5; vol. 89, No.3.

Coleman N *et al.* Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994; 102:768-774.

Curado MP *et al.* *Cancer Incidence in Five Continents.* Vol. IX Lyon: IARC Scientific Publications. 2010; 160.

Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer.* 2011 Feb 15;128(4):879-86.

Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract.* 1997;193(7):491-5.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR *et al.* Classification of papillomavirus. *Virology* 2004; 324:17-27.

Deng W, Tsao SW, Kwok YK *et al.* Transforming Growth Factor β 1 Promotes Chromosomal Instability in Human Papillomavirus 16 E6E7 -Infected Cervical Epithelial Cells. *Cancer Res.* 2008 September 1; 68: (17).

Ding B, Fu S, Wang M, Yue C, Wang W, Zhou D *et al.* Tumor necrosis factor α -308 G>A polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2012 Feb;22(2):213-9.

Diudè P, Osorio J, Petit-Teixeira E, Moreno S, Garnier S, Cailleau-Moindrault S *et al.* A TNFR1 genotype with a protective role in familial rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2004 vol 50, 2:413-419.

Doobar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006; 110:525-541.

Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A *et al.* G-308A TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334: 588-92.

Eaton DK, Lowry R, Brener ND *et al.* Passive versus active parental permission in school-based survey research: does the type of permission affect prevalence estimates of risk behaviors? *Eval Rev.* 2004; 28(6): 564-577.

Ebach DR, Riehl TE, Stenson WF. Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005 Apr;23(4):311-8.

Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem.* 1989 Oct 15;264(29):17595-605.

El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol.* 2001; Sep;195(2):179-85.

Fakhry C, D'souza G, Sugar E, Weber K, Goshu E, Minkoff H *et al.* Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *J Clin Microbiol.* 2006 Dec;44(12):4479-85. Epub 2006 Oct 4.

Faridi R, Zahra A, Khalida K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal.* 2011; 8:269.

Fei L, Bo L, Yonggang W, Yu M, Lvnan Y, Tianfu W. Tumor necrosis factor-alpha-308 G/A polymorphism and acute liver graft rejection: A meta-analysis. *Transpl Immunol* 2010 Oct;24(1):45-9.

Feitosa MF, Krieger H. O future da epidemiologia genética de características complexas. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2002; 7(1):73-83.

Feldmann M, Brennan FM, Elliott M, Katsikis P, Maini RN. TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Circ Shock.* 1994 Aug;43(4):179-184.

Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21730-9.

Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011;2011:847684.

Frazer IH. Interaction of human papillomavirus with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology.* 2009; 384:410-414.

Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet.* 1999 Oct 23;354(9188):1442-3.

Gagnon D, Joubert S, Sénéchal H, Fradet-Turcotte A, Torre S *et al.* Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol.* 2009 May;83(9):4127-39.

Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Antinuclear antibodies are associated with tumour necrosis factor receptor I gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2011; 29: 000-000.

Glossop JR, Nixon NB, Dawes PT, Hassell AB, Matthey DL. No association of polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor I and receptor II genes with disease severity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003 Jul;30(7):1406-9.

Govan VA, Carrara HRO, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinogenesis* 2003; 2:3.

Green S, Dobrjansky A, Chiasson MA. Murine tumor necrosis-inducing factor: purification and effects on myelomonocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst.* 1982 Jun;68(6):997-1003.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2007; 53(3):335-343.

Grone, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 88, 1–12

Grunbaum JA, Karin L, Kinchen S *et al.* Youth risk behavior surveillance – United States, 2003. *MMWR Surveill Summ.* 2004; 53(2):1-96.

Guimarães MVMB, Michelin MA, Lucena AAS, Lodi CTC, Miranda MIL, Murta EFC *et al.* Resposta imune ao HPV e as neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV: perfil de citocinas. *FEMINA.* 2011; Vol 39 | nº 5.

Gupta R, Sharma SC, Das SN. Association of TNF-a and TNFR1 promoters and 3' UTR region of TNFR2 gene polymorphisms with genetic susceptibility to tobacco-related oral carcinoma in Asian Indians. *Oral Oncology.* 2008. 44, 455-463.

Hagari Y, Budgeon LR, Pickel MD, Kreider JW. Association of tumor necrosis factor-alpha gene expression and apoptotic cell death with regression of Shope papillomas. *J. Invest Dermatol.* 1995; 104, 526-529.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006 Mar-Apr;16(2):83-97.

Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1988;158(4):910–913.

Herreweghe FV, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67:1567-1579.

Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci.* 2007 Jul;98(7):964-72. Epub 2007 May 4.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans/ Human Papillomaviruses. World Health Organization International Agency for Research on Cancer 2007; 90.

Instituto Nacional do Câncer - INCA (Brasil). Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uterio/definicao.

Jaafar F, Righi E, Lindstrom V, Linton C, Nohadani M, Van Noorden S et al. Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. *Am J Pathol.* 2009 Oct;175(4):1525-35.

Jacobs M, Brown N, Allie N, Chetty K, Ryffel B. Tumor necrosis factor receptor 2 plays a minor role for mycobacterial immunity. *Pathobiology.* 2000 Mar-Apr;68(2):68-75.

Jang WH, Yang YI, Yea SS *et al.* The -238 Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett.* 2001; 166:41-6.

Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res.* 2009 Sep;130(3):286-95.

Jong A, Burg SH, Kwappenberg KM, Hulst JM, Franken KL, Geluk A *et al.* Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):472-9.

Jong A, van Poelgeest MI, Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ *et al.* Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5449-55.

Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomavirus to escape the host immune response. *Current Cancer Drug Targets.* 2007; 7, 79-89.

Kassa D, Ran L, Geberemeskel W, Tebeje M, Alemu A, Selase A *et al.* Analysis of immune responses against a wide range of Mycobacterium tuberculosis antigens in active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(12):1907-15

Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Srisomboon J, Ruangvejvorachai P, Thorner PS *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis. *Gynecol Oncol.* 2009 Jan;112(1):241-7.

Kim SY, Solomon DH. Tumor necrosis factor blockade and the risk of viral infection. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Mar;6(3):165-74.

Kimberley FC, Lobito AA, Siegel RM, Screaton GR. Falling into TRAPS--receptor misfolding in the TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):217.

King, A., Burrows, T. and Loke, Y. W., Human uterine natural killer cells. *Nat. Immun.* 1996; 15: 41–52.

Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Young M *et al.* Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res.* 2004 Sep 15;64(18):6766-74.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The 308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391–9.

Lages EL, Belo AV, Andrade SP, Rocha MÂ, Freitas GF, Lamaita RM *et al.* Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomed Pharmacother.* 2011 Oct;65(7):496-9.

Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 11; 4C; 3,4.

Ledgerwood EC, Pober JC, Bradley JR. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest* 1999. 79(9):1041-1050.

Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH *et al.* Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog.* 2007 Nov;46(11):941-7.

Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, *et al.* Both E6 and E7 of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol.* 2001; 167:497-504.

Lee BN, Follen M, Tortolero-Luna G, Eriksen N, Helfgott A, Hammill H *et al.* Synthesis of IFN-gamma by CD8(+) T cells is preserved in HIV-infected women with HPV-related cervical squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 1999 Dec;75(3):379-86.

Lee EB, Jeon HS, Yoo SS, Choi YY, Kang HG, Cho S *et al.* Polymorphisms in apoptosis-related genes and survival of patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010 Oct;17(10):2608-18.

Leong CM et al. Loss of epidermal Langerhans cells occurs in human papillomavirus alpha, gamma, and mu but not beta genus infections. *J Invest Dermatol* 2010; 130, 472-480.

Liu L, Yang X, Chen X, Kan T, Shen Y, Chen Z, et al.. Association between TNF- α polymorphism and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Mol. Biol Rep.* 2012;39:2683-8.

Liu Z-G, Hsu H, Goeddel DV & Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell.* 1996; 87, 565–576.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501.

Lu LY, Keng HM, Chu JJ, Lin XT, Hsu CM, Sung PK. TNF receptor I polymorphism is associated with persistent palindromic rheumatism. *Scand J Rheumatol.* 2007 Jul-Aug;36(4):278-84.

Maini RN, Elliott MJ, Brennan FM, Feldmann M. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA) *Clin Exp Immunol.* 1995 Aug;101(2):207–212.

Mansur CP. Molecular mechanisms of HPV-associated oncogenesis. In JC Sterling, SK Tying (eds), *Human Papillomaviruses Clinical and Scientific Advances*, Arnold, London. 2001; p. 24-32.

Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):583-93.

Mascheretti S, Hampe J, Kühbacher T, Herfarth H, Krawczak M, Fölsch UR *et al.* Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2:127-36.

Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N, Takazoe M, Muramatsu M. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patient with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27,0765-770.

Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT *et al.* Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol.* 2003 Aug;77(15):8378-85.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36.

Mazibrada J, Rittà M, Mondini M, De Andrea M, Azzimonti B, Borgona C *et al.* Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecologic Oncology*, 2008. 108:112-120.

Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. II Cytologic, colposcopic and histopathologic criteria. *Acta Cytol.* 1977; 21,379.

Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B, *et al.* Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Letters.* 1999;146(2):127–134.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(12):2312–6.

Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J.* 2009 Mar;23(3):844–854.

Mocellin S, Nitti D. TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci.* 2008; 13: 2774–2783.

Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Căpîlna M, Félix S *et al.* Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2006 Jul;102(1):22-31. Epub 2006 Jan 20.

Moody CA, Laimins LA. Human oncoproteins: pathways to papillomavirus transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug;10(8):550-60

Morales-Lara MJ, Cañete JD, Torres-Moreno D, Hernández MV, Pedrero F, Celis R *et al.* Effects of polymorphisms in TRAILR1 and TNFR1A on the response to anti-TNF therapies in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis. *Joint Bone Spine.* 2012 Dec;79(6):591-6.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS *et al.* International Agency for Research on Cancer. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002 Mar 30;359(9312):1093-101.

Muppidi JR, Tschopp J & Siegel RM. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity.* 2004; 21, 461–465.

Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK *et al.* Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis.* 2000 Aug;182(2):595-8. Epub 2000 Jul 28.

Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O *et al.* Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 2007 Jun;98(6):874-81. Epub 2007 Apr 13.

Naudé PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.* 2011 Apr;278(6):888-98.

Nicol AF, Fernandes AT, Grinsztejn B, Russomano F, E Silva JR, Tristão A *et al.* Distribution of immune cell subsets and cytokine-producing cells in the uterine cervix of human papillomavirus (HPV)-infected women: influence of HIV-1 coinfection. *Diagn Mol Pathol.* 2005 Mar;14(1):39-47.

Oerke S, Höhn H, Zehbe I, Pilch H, Schicketanz KH, Hitzler WE *et al.* Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer.* 2005 May 1;114(5):766-78.

Ohsima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2003;417:3-11.

Ovestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, Malpica A, Kruse AJ, Janssen EA *et al.* Local immune response in the microenvironment of CIN2-3 with and without spontaneous regression. *Mod Pathol.* 2010 Sep;23(9):1231-40.

Palefsky JM *et al.* Chapter 6: immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst. Monogr* 2003; 21, 41-46.

Pantelidis P, Lympany PA, Foley PJ, Fanning GC, Welsh KI, du Bois RM. Polymorphic analysis of the high-affinity tumor necrosis factor receptor 2. *Tissue Antigens.* 1999 Dec;54(6):585-91.

Pao CC, Lin CY, Yao DS, Tseng CJ. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 25;214(3):1146-51.

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR *et al.* TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):943-52.

Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL. Identification of a rare Bg/II polymorphism in the promoter region of the human TNF receptor type I (p55) gene. *Eur J Immunogenet.* 1998 Apr-Jun;25(2-3):271-2.

Queiroz C, Travassos AG, Studart E, Araújo Filho JB, Sarno CK, Pinheiro CC. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. *Braz J Infect Dis.* 2004 Oct;8(5):356-62. Epub 2005 Mar 17.

Rauert H, Wicovsky A, Müller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J *et al.* Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem.* 2010; 285, 7394–7404.

Razeghinejad MR, Rahat F, Kamali-Sarvestani E. Association of TNFA -308 G/A and TNFR1 +36 A/G gene polymorphisms with glaucoma. *Ophthalmic Res.* 2009;42(3):118-24.

Renoux VM, Bisig B, Langers I, Dortu E, Clémenceau B, Thiry M *et al.* Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. *Eur J Immunol.* 2011 Nov;41(11):3240-52.

Ribeiro AA, Figueiredo Alves RR, Costa MC, Villa LL, Zeferino LC *et al.* Association between HPV types and species groups and cervical neoplasia from a high-risk area for cervical cancer, Goiânia, Brazil. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 May;30(3):288-94.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000; 405: 847-856.

Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S Jr *et al.* In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol.* 2012;36:1730.

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998 Jul 1;12(13):2061-72.

Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzeti MC, Silva FR, Silva BR. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad. Saúde Pública.* 2009 Maio; vol.25 no.5.

Ross JA, Auger MJ. The biology of the macrophage. In: Burke B, Lewis CE, editors. *The macrophage.* 2nd ed. New York (NY): Oxford University Press Inc; 2002.

Roteli-Martins CM, de Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brazil, Canada, and the United States: a multicenter cross-sectional study. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 Mar;30(2):173-84.

Rothe M, Sarma V, Dixit VM & Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-κB by TNF receptor 2 and CD40. *Science.* 1995; 269:1424–1427.

Sainz J, Salas-Alvarado I, López-Fernández E, Olmedo C, Comino A, García F *et al.* TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *International Journal Of Immunopathology and Phamacology.* 2009; 22(3),557-565.

Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol.* 2010; 118:S12-S17.

Schlüter D, Deckert M. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1285-92.

Simons AM, Phillips DH, Coleman DV. Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. *British Medical Journal.* 1993;306(6890):1444–1448.

Sociedade Brasileira de Infectologia. Incidência de HPV é questão de saúde pública. 2011. Disponível em: http://www.sbinfecto.org.br/default.asp?site_Acao=mostraPagina&paginaId=134&moti_Acao=mostraNoticia¬iciaId=24513.

Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ *et al.* The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J.* 2010 Nov;36(5):1185-206.

Soria C, Estermann FE, Espantman KC, O'Shea CC. Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature.* 2010; 466: 1076–1081.

Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32:76-102.

Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2003; 13: 148-53.

Stanley M. Immune Response to human papilloma viruses. *Indian J Med Res.* 2009; 130:266-276.

Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology.* 2008 May;109(2); S15–S21.

Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* 2007; 35 part 6.

Stetson CL, Rapini RP, Tying SK, Kimbrough RC. CD4+ T lymphocytopenia with disseminated HPV. *J Cutan Pathol.* 2002 Sep;29(8):502-5.

Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F *et al.* Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(2):382–90.

Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical consideration. *Nature Reviews Genetics.* 2002; 3.

Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* 1993 Sep 5;268(25):18542–18548.

Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R Jr, Martins WK, Colo AE *et al.* Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized

keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med. Genomics*. 2008;1, 29.

Textor S, Accardi R, Havlova T, Hussain I, Sylla BS, Gissmann L *et al*. NF- κ B-dependent upregulation of ICAM-1 by HPV16-E6/E7 facilitates NK cell/target cell interaction. *Int J Cancer*. 2010 Mar 1;128(5):1104-13. doi: 10.1002/ijc.25442.

Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R *et al*. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene*. 2001 Jun 21;20(28):3629-40.

Trottier H, Franco EL. The Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 24 (Suppl 1): S4-S15.

Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J 3rd, Contois D, Lawler P *et al*. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res*. 1996 Sep 1;56(17):3967-74.

Tuma R, Russell M, Rosendahl M, Thomas GJ Jr. Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: structural effects of an engineered PEG linker. *Biochemistry*. 1995 Nov 21;34(46):15150-6.

Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*. 2008;153(3):397-408. doi: 10.1007/s00705-007-0022-5. Epub 2008 Jan 3.

Van der Hende M, van Poelgeest MI, Hulst JM, Jong J, Drijfhout JW, Fleuren GJ *et al*. Skin reactions to human papillomavirus (HPV) 16 specific antigens intradermally injected in healthy subjects and patients with cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):146-52.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 1;89(11):4845-4849.

Vanakankovit N, Taneepanichskul S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer. *J Med Assoc Thai*. 2008 Jan;91(1):7-12.

Veroux M, Corona D, Scalia G, Garozzo V, Gagliano M, Giuffrida G *et al*. Surveillance of human papilloma virus infection and cervical cancer in kidney transplant recipients: preliminary data. *Transplant Proc*. 2009; 41:1191-4.

Villa LL, Vieira KB, Pei XF, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Mol. Carcinog*. 1992; 6, 5-9.

,,,,, Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal of Cancer*. 2002 Nov; 38 (17): 2229-2242.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003; 10(1): 45-65.

Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS J*. 2011 Apr; 278(6):862-76. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08015.x. Epub 2011 Feb 8.

Wang L & Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(11): 1275-1288.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001;15(22):2922–33.

Wang N, Yin D, Zhang S, Wei H, Wang S, Zhang Y *et al*. TNF- α rs1800629 polymorphism is not associated with HPV infection or cervical cancer in the Chinese population. *PLoS One*. 2012;7(9):e45246.

Waschke KA, Villani A, Vermeire S, Dufresne L, Chen TC, Bitton A *et al*. Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's Disease: association with clinical phenotypes. *American Journal of Gastroenterology*. 2005; 100:1126-1133.

Wei L, Gravitt PE, Song H, Maldonado AM, Ozbun MA. Nitric oxide induces early viral transcription coincident with increased DNA damage and mutation rates in human papillomavirus-infected cells. *Cancer Res.* 2009 Jun 1;69(11):4878-84.

Wesemann DR, Benveniste EN. STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5313-9.

Wheeler CM. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities and cancer. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2008; 519-536.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3195-9.

Woo YL, Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RA, Kwappenberg KM *et al.* A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer.* 2010 Jan 1;126(1):133-41.

Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z *et al.* TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10397-402.

Zhang S, Wang C, Xi B, Li X. Association between the tumour necrosis factor- α -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: An update. *Respirology*, 2010; Jan;16(1):107-15.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 9;1288(2):F55-78.

zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):690-8.

9 ANEXOS

Anexo 1. Termo de consentimento aplicado às voluntárias atendidas no IFF, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IFF e IPEC.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



Instituto Fernandes Figueira

PROCESSO DE CONSENTIMENTO E DOCUMENTAÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PESQUISA

Caracterização da imunidade celular na cérvix uterina de pacientes com lesões causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) e sua correlação com fatores prognósticos genéticos - ligados à indução da carcinogênese - e ambientais em coorte de mulheres HIV-1 positivas ou não

Coordenador: Dra. Maria da Glória Bonceni de Almeida – IPEC

Colaboradores: Ana Teresa Gomes Fernandes, IPEC; Dra Beatriz Grinsztejn, IPEC; Dr José Henrique Pilotto, IPEC; Dra Valdiléa Gonçalves Veloso dos Santos, IPEC; Dra Ângela Cristina Vasconcelos de Andrade, IPEC; Dr Fabio Bastos Russomano, IFF; IPEC; Dra Mariza Gonçalves Morgado, IOC; Dra Ruth Khalili Friedman, IPEC; Dra Aparecida Cristina Sampaio Monteiro, IPEC; Dra Luciana Wernersbach Pinto, IPEC.

PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

Cara Sra./Srta.

Estamos convidando-a a participar de uma pesquisa sobre a infecção pelo HPV em mulheres infectadas ou não pelo HIV. Esta é uma forma de conhecermos melhor esta doença e como tratá-la.

A infecção pelo HPV é muito comum em homens e mulheres e, geralmente, não causa lesões. Algumas vezes, porém, pode causar lesões que, caso não tratadas podem piorar e chegar ao câncer. Para confirmar se você tem uma lesão causada por este vírus, é necessário fazer um exame chamado colposcopia, que é semelhante ao que você fez no exame preventivo para doenças genitais, sendo que mais detalhado. O médico te examinará usando um aparelho que aumenta a imagem do seu colo uterino, possibilitando vê-lo como mais clareza. Caso os médicos encontrem

uma lesão, um pequeno fragmento (biópsia) do seu colo uterino será retirado para saber se é uma lesão pré-câncer e, caso isto seja confirmado pelo exame diagnóstico, poderá ser indicada a retirada da parte doente, evitando que esta lesão piore até chegar ao câncer.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, estou sendo informada que fui encaminhada ao Instituto Fernandes Figueira por apresentar em meu exame ginecológico preventivo de doenças genitais, a suspeita de uma lesão causada pelo HPV. Neste hospital, farei uma colposcopia, exame semelhante ao que eu fiz no exame preventivo, sendo que neste o médico me examinará usando um aparelho que aumenta a imagem do meu colo uterino, possibilitando vê-lo como mais clareza. Caso os médicos encontrem uma lesão, um fragmento do meu colo uterino será retirado para saber se é uma lesão pré-câncer e, caso isto seja confirmado pela biópsia, terei que retirar uma parte maior do colo, que é parte doente, para evitar que a lesão piore até chegar ao câncer. Sei que esta é a rotina para o diagnóstico e tratamento destas lesões para a prevenção do câncer do colo do útero. Sei também que após o tratamento serei acompanhada no Setor de Patologia Cervical do Instituto Fernandes Figueira para ser tratada novamente, caso surjam novas lesões.

PROCEDIMENTOS

1. Procedimentos

Se eu concordar em participar neste estudo, sei que:

- a) Responderei a um questionário sobre minha profissão e quanto ganho por mês. Além disso, terei que informar se bebo bebidas alcoólicas, uso drogas e sobre minhas relações sexuais.
- b) Como provavelmente tenho uma lesão causada pelo HPV, que é normalmente transmitido pelo sexo, posso ter sido contaminada por outros vírus e germes e, por isso, eu permitirei que 30 mL de sangue sejam retirados para a verificação se estou ou não infectado pelo HIV bem como para a contagem de células circulantes no meu sangue, e caso seja portadora do HIV, será realizada a carga viral sistêmica e local. Além disso, será avaliada a presença de fatores que determinam a progressão das lesões cervicais para o câncer (p53, TNF- α , bcl2 e bax) através de testes genéticos que serão realizados com uma amostra de DNA (material genético que fornece as características individuais de cada ser humano, animal e vegetal) extraído nesta coleta. É do meu conhecimento que todos os materiais usados para a coleta de sangue são descartáveis.
- c) Eu concordo que uma pequena parte do pedacinho retirado na biópsia feita para a confirmação de meu diagnóstico seja enviado para o laboratório do IPEC-Fiocruz que faz esta pesquisa.
- d) Se deste estudo, houver novas perguntas que necessitem utilizar o mesmo material coletado, este poderá ser utilizado em projetos futuros relacionados às infecções do HPV e HIV.

2. Tempo

Para participar desta pesquisa apenas terei que perder mais tempo do que seria o normal para ler e assinar este Termo de Consentimento, responder ao questionário e colher a amostra de sangue para o teste do HIV.

3. Local do Estudo

A colposcopia será realizada no Setor de Patologia Cervical do Instituto Fernandes Figueira, e o estudo do material obtido será feito no Laboratório de Imunologia Celular do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas e no Departamento de Anatomia Patológica do Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz.

4. Riscos/Desconfortos

- a. Algumas das questões que constam do questionário podem ser constrangedoras, mas caso eu ache necessário, poderei interromper a entrevista a qualquer momento.
- b. A coleta de sangue para o teste do HIV normalmente não causa problemas locais. Às vezes pode ficar um pouco arroxado, mas isto desaparece em poucos dias.
- c. A biópsia do colo uterino será realizada para diagnosticar qual o grau de lesão que tenho, para que, após seu resultado, os médicos possam decidir qual o melhor tratamento. Apenas a pequena parte que será retirada do material biopsiado é que servirá para a pesquisa e não fará falta para o meu diagnóstico.

5. Tratamento e compensação por danos

Não há risco de qualquer problema para a minha saúde pelo fato de coletar sangue para o Teste do HIV ou ceder uma parte do pedacinho biopsiado para a pesquisa. Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência da minha assistência no Instituto Fernandes Figueira, neste mesmo hospital será resolvido.

6. Alternativas

Se eu decidisse não participar desta pesquisa o tratamento médico a que eu tenho direito não seria prejudicado no Setor de Patologia Cervical do Instituto Fernandes Figueira. A necessidade de fazer biópsias ou tratamentos seria a mesma e o tempo de acompanhamento também seria o mesmo. Também, caso meu diagnóstico seja de uma lesão pré-câncer (NIC II ou III), também seria convidada a fazer o Teste do HIV porque existe um risco baixo de ter este vírus e não saber e a lesão ser uma manifestação da doença causada pelo HIV, sem ser aids ainda. Esta já é uma rotina do Setor há mais de 5 anos. Também poderia recusar fazer o teste, mas neste caso, não poderia participar desta pesquisa.

7. Resultados dos Testes

O resultado do teste de sangue para o HIV será fornecido somente para mim pelo médico na próxima consulta. Nesta consulta, assim como na de hoje, posso fazer todas as perguntas sobre as dúvidas que tenho sobre as infecções pelo HPV e HIV. Caso o teste do HIV seja positivo não quer dizer que tenha AIDS e nem mesmo que tenho o HIV. Terei que colher mais uma amostra para confirmação e, se também for positiva, serei encaminhada ao tratamento médico especializado nesta doença.

8. Custo para os entrevistados

Eu não pagarei nenhuma quantia de dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais serão cobertos pelo estudo.

9. Confidenciabilidade dos dados

Sei que todas as minhas informações são confidenciais e constarão de meu prontuário e nos Questionários da pesquisa. Somente os Drs. Fábio Russomano e Maria da Glória Bonecini de Almeida, e seus assistentes terão acesso a estas informações. As informações obtidas nesta pesquisa poderão ser discutidas com pesquisadores de outras Instituições, mas nenhuma identificação minha será fornecida.

Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo.

Eu consinto em que meu endereço e telefone sejam anotados numa folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário.

Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida, sobre sua participação deste estudo, favor telefonar para 3865 9531 ou 3865 9644 (Dra. Maria da Glória e Ana Teresa Fernandes)

Local e data: _____

Nome do voluntário: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura: _____

Nome de alguma pessoa que possa ser contactada, caso a Sr(a). não possa fornecer o seu endereço ou telefone no momento:

Nome: _____

Endereço: _____

Anexo 2. Carta de autorização do manuseio de materiais coletados de mulheres sem histórico de lesão e/ou infecção causada pelo HPV e HIV-1 atendidas no Serviço de Ginecologia do Ambulatório Piquet Carneiro/UERJ e na Disciplina de Ginecologia do Hospital Pedro Ernesto/UERJ, pelos responsáveis, Dr. Evandro Mendes Klumb e da Dra Jacyara Maria Brito Macedo.



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DISCIPLINA DE REUMATOLOGIA**

Rio de Janeiro, 24 de Outubro de 2009

DE: Evandro Mendes Klumb
Disciplina de Reumatologia

PARA: Dra. Léa Camilo Coura
Comitê de Ética - IPEC

REF.: COLABORAÇÃO EM PESQUISA – PROJETO EM LES –
CANCER DE COLO - HPV.

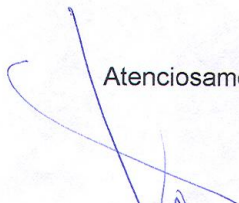
CC: Ana Teresa G. Fernandes
Lab Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas
IPEC-Fiocruz
Tel. 0xx21 3865-9644


Prezada Dra. Léa,

Em referência ao projeto em epígrafe, que apresenta áreas de interesse comum com o desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas - IPEC-Fiocruz-RJ, gostaria de confirmar o nosso maior interesse em colaborar incluindo o compartilhamento do material cervical e soro coletados do grupo controle dos estudos denominados "Análise da frequência de alterações citopatológicas cervicais e de infecção pelo papilomavírus humano em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico" e "Colo de útero: estudo da associação entre tipos de HPV em lesões pré-malignas e malignas", realizados na Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob a responsabilidade de Dr. Evandro Mendes Klumb e Dra. Jacyara Maria Brito de Macedo, ambos com texto integral e termo de consentimento livre e esclarecido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do HUPE – UERJ, sob o nº 1153-CEP/HUPE – CAEE: 0028.0.228.000-05.

Reiteramos ao mesmo tempo, que o compartilhamento do referido material deve manter os mesmos critérios éticos previamente estabelecidos de acordo com os termos assinados pelas mulheres que voluntariamente constituíram o grupo controle.

Atenciosamente,


Evandro Mendes Klumb
HUPE – UERJ
Disciplina de Reumatologia


Jacyara Maria Brito de Macedo
IBRAG - UERJ
Disciplina de Bioquímica

Anexo 3. Questionário aplicado às mulheres atendidas no IFF.

Caracterização da imunidade celular na cérvix uterina de pacientes com lesões causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) e sua correlação com fatores prognósticos genéticos - ligados à indução da carcinogênese - e ambientais em coorte de mulheres HIV-1 positivas ou não

Data: _____

DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Nº Prontuário IFF: _____ Nº Prontuário IPEC: _____

Nº Lab Imunologia/ IPEC: _____

Município de residência: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: _____

Estado Civil Atual: _____

◆ Escolaridade: _____

1. Analfabeta
2. 1º grau incompleto
3. 1º grau completo
4. 2º grau incompleto
5. 2º grau completo
6. > 2º grau

◆ Renda Familiar Mensal: _____

1. Sem renda
2. Até 1 salário
3. Até 2 salários
4. Até 3 salários
5. Até 4 salários
6. Até 5 salários
7. > 5 salários

Inclui: Auxílio doença, pensão alimentícia, renda decorrente de trabalho informal, etc.

◆ Etnia/cor: _____

1. branca
2. negra
3. parda
4. indígena
5. ignorada

HÁBITOS

1. Fumo

◆ Possui o hábito de fumar? _____
Em caso afirmativo:

1. Há quanto tempo? _____
2. Quantos maços fuma por dia? _____
3. Nos últimos 2 anos, aumentou o número de cigarros por dia? _____

2. Etilismo

◆ Possui o hábito de beber? _____
Em caso afirmativo:

1. Há quanto tempo? _____
2. Quais bebidas? Destiladas () Fermentadas ()
3. Quantas vezes por semana? _____
4. Quanto copos costuma beber? _____

3. Uso de drogas

◆ É usuário de drogas ilícitas? _____
Em caso afirmativo:

1. Quais? _____
2. Quantas vezes por semana? _____

◆ É usuário de alguma medicação? _____
Em caso afirmativo:

1. Qual? _____
2. Com que frequência? _____
3. Alguma tem efeito teratogênico? _____

HISTÓRICO FAMILIAR

- ◆ Há histórico em sua família de câncer? _____
Em caso afirmativo, qual câncer? _____

VIDA SEXUAL

- ◆ Qual a idade que iniciou a vida sexual? _____
- ◆ Quantos parceiros você teve no último ano? _____
 1. 1 parceiro
 2. 2 parceiros
 3. 3 parceiros
 4. 4 parceiros
 5. > 4 parceiros

- ◆ Tem filhos? _____
Em caso afirmativo:
 1. Quantos? _____
 2. Idade _____

- ◆ Já abortou? _____
Em caso afirmativo,
 1. Quantos? _____
 2. Foi espontâneo ou provocado? _____

- ◆ Alguma vez apresentou lesão de HPV? _____

- ◆ Nestes últimos 5 anos, apresentou alguma DST? _____
Em caso afirmativo:
 1. Quando? _____
 2. Qual? _____