



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA LOMBARDI PEREIRA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO c. -592 C>A (rs1800872)
DA INTERLEUCINA-10 COM O CÂNCER CERVICAL**

Londrina
2019

ANA PAULA LOMBARDI PEREIRA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO c. -592 C>A (rs1800872)
DA INTERLEUCINA-10 COM O CÂNCER CERVICAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado da Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira.

Londrina
2019

ANA PAULA LOMBARDI PEREIRA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO c. -592 C>A (rs1800872) DA
INTERLEUCINA-10 COM O CÂNCER CERVICAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado da Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Lígia Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos, supostamente a parte mais tranquila na escrita de um trabalho com o intuito de um texto simples e despretensioso visando agradecer os colaboradores de determinado projeto. Porém, neste caso, este texto é muito mais do que um simples agradecimento. A finalização deste trabalho marca o fim de um ciclo muito importante em minha vida. Neste momento, as palavras me escapam e dificultam expressar os diversos sentimentos que compõem meus pensamentos e coração.

O mestrado marcou uma das fases mais difíceis da minha vida, não acreditava que era capaz e que chegaria neste dia. Mas aqui estou, sentada na bancada do laboratório lembrando das dores e angústias com outra perspectiva. Aprendi, dia após dia, a apaziguar o coração e elencar prioridades em minha vida. Aprendi a não ser tão exigente comigo mesma e não me julgar tanto. Aprendi que cada um tem seu tempo e seu ritmo. E esse tempo é único. Lindo de se viver, recordar, de olhar lá pra trás e ver o tanto de coisa que aprendi e amadureci ao longo desses anos.

Decido então iniciar os agradecimentos pela instituição no qual me formei e continuo trilhando meu caminho, a Universidade Estadual de Londrina. Aqui fiz grandes amizades, meninas HUEHUE da biomedicina pra vida, conheci professores exemplares e me formei biomédica. Obrigada UEL por cada flor em seu caminho, pelo ar fresco, pelas paisagens lindas e por toda sabedoria que oferece.

Agradeço minha família, minha base, minha estrutura, minha casa. Mamãe e cia (Pai, Déia, Mari e Shoyu) obrigada pelo apoio mesmo não entendendo nada sobre o trabalho que faço rrsrrsrsrs, amo vocês! Minha vó querida e amada, te amo com toda a minha força, não sei o que seria de mim sem você, muito obrigada por estar presente no meu dia a dia e em todos momentos especiais da minha vida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, dos mais antigos até o momento, obrigada pela companhia, paciência e ajuda nos experimentos. Agradeço especialmente os Mestres Nádia Okuyama e Kleber Trugilo que sempre tiveram a maior paciência do mundo pra me ajudar, explicar todas as dúvidas, me ensinar escrever e organizar os pensamentos, ouvir meus desabafos e inseguranças e por estarem sempre disponíveis para qualquer coisa e a qualquer momento.

Obrigada Professora Karen Brajão de Oliveira pela oportunidade

desde o segundo ano da graduação, encontrei a força que precisava para continuar a biomedicina quando entrei para o Laboratório de Imunologia e Genética Molecular. No laboratório eu cresci, desenvolvi e amadureci intelectualmente e pessoalmente. Muito obrigada pela confiança, paciência e todos os ensinamentos. Sua orientação foi essencial para meu desenvolvimento.

Meus agradecimentos a banca, Prof^a. Marla Amarante e Prof^a. Lígia Galhardi, por aceitarem o convite em participar da minha qualificação e de defesa, disporem de seu tempo e contribuir com seus conhecimentos para o trabalho. Vocês são exemplos de docentes e pesquisadoras, espero um dia conseguir ser pelo menos um pouquinho igual a vocês.

Por fim, agradeço a Deus por nunca me deixar sozinha e por seu amor infinito!

*“Fique firme enquanto dói
Faça flores com a dor
Voce me ajudou
A fazer flores com a minha
Então floresça de um jeito lindo
Perigoso
Escandaloso
Floresça suave
Do jeito que voce preferir
Apenas floresça”*

- Rupi Kaur

PEREIRA, Ana Paula Lombardi. **Associação do polimorfismo c. -592C>A (rs1800872) da interleucina-10 com o câncer cervical.** 2019. 69 páginas. Dissertação do mestrado da Pós-graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O câncer cervical (CC) é a quarta neoplasia mais incidente mundialmente em mulheres. Sua estimativa e mortalidade variam de acordo com a região avaliada sendo que no Brasil o CC ocupa o terceiro lugar. Sua progressão é considerada lenta, pois resulta de lesões no epitélio escamoso do colo uterino a partir da infecção pelo Papilomavírus humano. Essas lesões são classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LIEBG) ou de alto grau (LIEAG). Quando não corretamente diagnosticadas e tratadas podem evoluir para carcinoma ou adenocarcinoma, de acordo com sua origem epitelial. Neste contexto, a resposta imunológica no microambiente cervical é essencial para determinar o desenvolvimento tumoral ou resolução das lesões. A resposta imunológica antitumoral envolve a ativação de linfócitos que expressam citocinas de perfil Th1 para eliminação de células transformadas, quando há o predomínio de expressão de citocinas de perfil Th2 a evasão tumoral é favorecida pelo seu efeito imunossupressor. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina imunoregulatória com papel ambíguo pela função anti-inflamatória e imunossupressora. O polimorfismo da IL-10 c.-592C>A está associado ao aumento de concentração sérica e no muco cervical da IL-10. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre este polimorfismo e o diagnóstico de CC, assim como sua possível associação com características sócio demográficas, comportamento sexual e reprodutivo. Amostras de sangue periférico e biópsia de tumor cervical foram coletadas e o DNA genômico foi extraído para amplificação de um fragmento de 154 pares de base da IL-10 pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o qual foi submetido posteriormente à técnica de restrição enzimática RFLP (Polimorfismo de Restrição do Comprimento de Fragmento) para análise do polimorfismo. O questionário sócio demográfico, de comportamento sexual e características reprodutivas foi aplicado a todas as pacientes. Mulheres negativas para lesões cervicais foram determinadas como grupo controle (n=146) e mulheres com diagnóstico de CC como grupo caso (n=85). Foi observado que pacientes com 55 anos ou mais de idade (p=0,001), de escolaridade até o ensino fundamental (p=0,001), hábito tabagista (p=0,001) e uso de anticoncepcional (p=0,007) estiveram associados com o CC pela análise de χ -quadrado e regressão logística binária. O presente estudo demonstrou a associação independente do polimorfismo c.-592C>A da IL-10 com o CC. Na análise do polimorfismo, o modelo codominante (C/A, p=0,028; A/A, p=0,182), dominante (C/A + A/A; p=0,020) e alelo (A, p=0,003) mostraram estar independentemente associados ao CC. Portadoras do alelo variante A no genótipo C/A mostraram maior associação no modelo codominante (OR_{adj}= 2,15; IC_{95%}= 1,02 – 4,56) e no modelo dominante (OR_{adj}= 2,71; IC_{95%}= 1,05 – 4,47) em relação ao diagnóstico de CC. Portanto, podemos concluir que a avaliação de um perfil de risco e susceptibilidade incluindo os dados acima mencionados e o genótipo para o polimorfismo c.-592C>A da IL-10 poderiam ser utilizadas como marcadores de susceptibilidade para o CC.

Palavras-chave: Cancer cervical. Interleucina-10. Polimorfismo. rs1800872.

PEREIRA, Ana Paula Lombardi. **Association of Interleukin-10 c. -592C>A (rs1800872) polymorphism with cervical cancer.** 2019. 69 pages. Master's degree dissertation (Post-graduation Program of Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the fourth most incident neoplasia among women worldwide. Its estimation and mortality rates varies according to the region, in Brazil it occupies the third position. Its development is considered slow because its results from lesions in the squamous epithelium of the uterine cervix caused by Human papillomavirus infection. These lesions are classified as low squamous intraepithelial lesions (LSIL) or high squamous intraepithelial lesions (HSIL). When not properly detected and treated these lesions progress to carcinoma *in situ* or adenocarcinoma *in situ*, accordingly to the epithelial origin. A small percentage of women with lesions will evolve to CC. In this context, the immune response in the tumoral microenvironment is crucial to determine lesion regression or progression. Antitumoral response involves activation of lymphocytes inducing Th1 cytokines to eliminate transformed cells, when there is a predomination of Th2 profile cytokines tumor evasion is favored by its immunosuppressive role. Interleukine-10 (IL-10) is a immunoregulatory cytokine that plays both roles, anti inflammatory and immunosuppressive. The IL-10 c. -592C>A polymorphism is associated with increased serum and cervical concentrations of IL-10 protein. Therefore, the aim of this study was to evaluate CC diagnoses with the polymorphism as well to evaluate the possible association with sociodemographic data, sexual behavior and reproductive characteristics. Peripheral blood samples and tumor biopsy were collected and genomic DNA was extracted for amplification of IL-10 fragment with 154 pair of bases, using PCR-RFLP technique. Questionnaire of sociodemographic data, sexual behavior and reproductive characteristics was applied in all patients. Women negative for cervical lesions were determined as control group (n=146) and women with CC diagnose, case group (n=85). It was observed that patients with 55 years age or older (p=0.001), educational level up to elementary school (p=0.001), smoking habit (p=0.001) and oral contraceptive intake (p=0.007) were associated with CC by χ -square and binary logistic regression analysis (p<0.05). The current study demonstrate independent association of the IL-10 c. -592C>A polymorphism with CC. Analysis of the polymorphism using co-dominant model (C/A, p=0.028; A/A, p= 0.182), dominant model (C/A + A/A; p= 0.020) and allele (A; p=0.03) showed to be independently associated with CC. Allele A carriers in C/A genotype have more association in codominant (OR_{adj}= 2.15; IC_{95%}= 1.02 – 4.56) and dominant (OR_{adj}= 2.71; IC_{95%}= 1.05 – 4.47) models. It can be concluded that is necessary to evaluate a risk profile and susceptibility for CC including data above mentioned and the c. -592 C>A polymorphism that is a good candidate for CC marker.

Key words: Cervical cancer. Interleukyne-10. Polymorphism. rs1800872.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática da evolução da infecção pelo HPV23
- Figura 2** – Representação esquemática da vida de sinalização da IL-1031

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais classificações citológicas, histológicas e molecular utilizadas para auxiliar no diagnóstico patológico de lesões cervicais	24
Quadro 2 – Descrição dos estadiamentos do sistema TNM e FIGO.....	27
Quadro 3 – Estudos encontrados que correlacionam o polimorfismo c. -592 C>A da IL-10 com CC	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/A	Genótipo AA do polimorfismo c. -592 C>A da IL-10
AD	Adenocarcinoma
AGC	Células Glandulares Atípicas (<i>Atypical Glandular Cells</i>)
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ASC	Células Escamosas Atípicas (<i>Atypical Aquamous Cells</i>)
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-XL	Célula-B de linfoma extra largo (<i>B-cell lymphoma extra large</i>)
C/A	Genótipo CA do polimorfismo c. -592 C>A da IL-10
C/C	Genótipo CC do polimorfismo c. -592 C>A da IL-10
CC	Câncer Cervical (<i>Cervical Cancer</i>)
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CD4	Agrupamento de Diferenciação 4 (<i>Cluster of differentiation 4</i>)
CD8	Agrupamento de Diferenciação 8 (<i>Cluster of differentiation 8</i>)
CD80	Agrupamento de Diferenciação 80 (<i>Cluster of differentiation 80</i>)
CD86	Agrupamento de Diferenciação 86 (<i>Cluster of differentiation 86</i>)
CSIF	Citocina Inibitória do Fator de Síntese (<i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>)
CTLA-4	Antígeno do Linfócito T Citotóxico 4 (<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>)
DC	Células Dendríticas (<i>Dendritic Cell</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
E2F	Fator E2 (<i>E2 factor</i>)
ER	Região Precoce (<i>Early Region</i>)
EUA	Estados Unidos das Américas
EZT	Excisão da Zona de Transformação
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HEG	Hospital Erasto Gaertner
HPB-BR	HPV de Baixo Risco
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human papillomavirus</i>)
HPV-AR	HPV de Alto Risco
HPV-RI	HPV de Risco Intermediário

IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
INCA	Instituto Nacional de Combate ao Câncer
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
Jak1	Janus Quinase 1 (<i>Janus Kinase 1</i>)
JEC	Junção Escamo Colunar
LAST	Terminologia Escamosa Anogenital Baixa (<i>Low Anogenital Squamous Terminology</i>)
LIE	Lesão Intraepitelial Escamosa
LIEAG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
LIEBG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
LR	Região Tardia (<i>Late Region</i>)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Assassinas naturais (<i>Natural Killer</i>)
NLIE	Negativo para Lesões Intraepiteliais Escamosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Região de Leitura Aberta (<i>Open Reading Frames</i>)
pb	Pares de base
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD-1	Proteína da Morte Celulas Programada 1 (<i>Programmed Cell Death 1</i>)
pRb	Proteína do Retinoblastoma
RFLP	Polimorfismo de Restrição do Comprimento de Fragmento (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SBE	Elemento ligador de STAT (<i>STAT Binding Elements</i>)
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SOCS3	Supressor da Sinalização de Citocinas (<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>)

STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
Treg	Linfócito T Regulatório
Tyk2	Tirosina Quinase 2 (<i>Tyrosine Kinase 2</i>)
UICC	União Internacional Contra o Câncer
URR	Região Reguladora (<i>Upstream Regulatory Region</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	CÂNCER CERVICAL (CC)	17
2.1	EPIDEMIOLOGIA.....	17
2.2	ETIOLOGIA	18
2.3	CARCINOGENESE	20
2.4	DIAGNÓSTICO	23
2.5	FATORES DE RISCO	24
2.6	ESTADIAMENTO.....	25
2.7	TRATAMENTO.....	27
2.8	RESPOSTA ANTITUMORAL	27
3	INTERLEUCINA-10	28
3.1	DESCRIÇÃO	28
3.2	IL-10 E CÂNCER CERVICAL	31
3.3	POLIMORFISMO NO GENE DA <i>IL-10</i>	32
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	38
6	CONCLUSÃO	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	67
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	67
	APÊNDICE B – Questionário Sociodemográfico de Comportamento Sexual e de Características Reprodutivas.....	68
	ANEXOS	69
	ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL	69

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a primeira causa de morte do mundo, sua incidência e mortalidade em países em desenvolvimento chegam a ser duas vezes maior que países desenvolvidos, constituindo um problema socioeconômico mundial. A evolução técnica e científica na área da saúde ao longo dos anos, possibilitou o aprimoramento de rastreamento, diagnóstico e tratamento de diversos tipos de câncer (TORRE et al., 2015).

Espera-se que a incidência de câncer aumente, resultado do diagnóstico precoce e mais preciso, envelhecimento e aumento da população. Esse aumento também está relacionado a fatores diversos como perfil genético, estilo de vida adotado incluindo prática de atividades físicas, dieta, hábito tabagista, estresse, comportamento sexual e características reprodutivas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

Aproximadamente 1 a cada 5 casos de câncer diagnosticados estão associados a infecções virais, sabe-se que diversos vírus são capazes de induzir alterações malignas celulares e estão envolvidos em desenvolvimento tumoral. São as chamadas infecções oncogênicas, em que a resposta imunológica do hospedeiro é essencial para o controle da replicação viral e resolução da infecção, onde situações de imunossupressão levam a maior chance de progressão tumoral (ARROYO MÜHR et al., 2017; MOORE; CHANG, 2010).

Dentro deste contexto, a infecção pelo *Papilomavírus humano* (HPV) está fortemente relacionada ao aparecimento de lesões intraepiteliais escamosas (LIE) no colo do útero da mulher. Essas lesões podem sofrer malignização induzidas pelas proteínas virais, resultando no carcinoma ou adenocarcinoma uterino (SCHIFFMAN; SOLOMON, 2013).

O HPV é o agente etiológico da infecção sexualmente transmissível (IST) com o aparecimento de lesões clínicas como verrugas e condilomas na região genital. Além do câncer de colo de útero também está presente em outros tipos de tumores como orofaríngeo, vulvar, peniano e colo-retal (SCHIFFMAN et al., 2007).

Mais de 200 tipos de HPV já foram descritos, sendo o HPV-16 e 18 os mais encontrados no câncer. Atualmente a detecção molecular de DNA-HPV é

utilizada em países desenvolvidos como Estados Unidos das Américas e Austrália, para auxiliar no prognóstico de mulheres com LIE evitando o desenvolvimento e desfecho em câncer de colo de útero (STANLEY, 2012).

2 CÂNCER CERVICAL (CC)

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de colo do útero, também conhecido como câncer cervical (CC), é a quarta neoplasia mais incidente em mulheres mundialmente. A infecção persistente pelo HPV é descrito como o fator mais fortemente associado ao desenvolvimento de lesões na porção inferior do colo uterino, que progridem, quando não tratadas, para lesões malignas (DOORBAR, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2012 foram diagnosticados 528 mil casos de CC dos quais 266 mil resultaram em óbito. No ano de 2018, cerca 569,847 mil novos casos foram diagnosticados, representando 3,2% de todos os casos de câncer e resultando em 311,365 mil mortes. Mundialmente, a taxa de incidência é de 13,1/100 mil mulheres e taxa de mortalidade de 3,5/100 mil. (FERLAY et al., 2015; WHO, 2016; 2018).

O CC é mais incidente em países em desenvolvimento onde o acesso a prevenção, rastreamento e tratamentos são mais restritos (90% das mortes acontecem nesses países). Em países desenvolvidos, onde programas de prevenção e rastreamento foram implantados de forma a diminuir esses índices como nos Estados Unidos das Américas (EUA), o CC ocupa o 13º lugar com cerca de 13 mil novos casos estimados para o ano de 2018 (7,4/100 mil) e de 4 mil mortes (66,2% de sobrevida) (NIH, 2018). A África ocidental apresenta a maior taxa de mortalidade 16/100 mil (incidência de 21/100 mil), a Austrália e Nova Zelândia apresentam a menor taxa de mortalidade 0,86/100 mil (incidência de 6/100 mil), já os países da América do Sul apresentam taxa de mortalidade de 3,8/100 mil (incidência 15,2/100 mil) (IARC, 2018).

No Brasil, de acordo com a estimativa para o biênio 2018/2019 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CC se destaca em terceiro lugar dentre os cânceres de maior incidência na população feminina, perdendo somente para o câncer de mama e de cólon e reto, com cerca de 16.370 novos casos estimados para

o ano de 2018, ou seja, a cada 100 mil mulheres 16 serão diagnosticadas com CC (INCA, 2017).

A incidência se altera conforme são avaliadas diferentes regiões brasileiras, sendo o mais frequente na região norte (25,62/100 mil), o segundo mais frequente no nordeste e centro-oeste (20,47/100 mil e 18,32/100 mil), e quarto no sudeste e sul (9,97/100 mil e 14,07/100 mil). No estado do Paraná, o CC ocupa o quarto lugar com cerca de 820 novos casos (12/100 mil) no ano de 2018. Esta estimativa é semelhante aos dados do ano de 2016 onde foram registrados 860 novos casos com 340 óbitos registrados (INCA, 2017).

Os dados atuais disponíveis sobre taxa de mortalidade no Brasil pelo INCA são referentes ao ano de 2015 com cerca de 6 mil óbitos, estando o CC em quarto lugar como o câncer de maior mortalidade em mulheres (6% das mortes relacionadas ao câncer) (INCA, 2015).

2.2 ETIOLOGIA

A infecção pelo HPV é o fator essencial para o desenvolvimento das LIE, a infecção persistente de tipos de HPV oncogênicos leva ao desenvolvimento de lesões iniciais que acometem o colo uterino e antecedem o câncer (SCHIFFMAN et al., 2005).

O HPV foi descrito por Harold zur Hausen na Alemanha em 1984. Pertence a família *Papillomaviridae* que é composta por pequenos vírus não envelopados que infectam vertebrados de sangue quente. São vírus epiteliotrópicos e evoluíram de forma a se adaptarem a diferentes tecidos animais, e diferem quanto ao tropismo, especificidade celular e potencial patogênico (VILLIERS et al., 2004).

De forma geral, a maioria dos tipos de HPV é responsável por infecções assintomáticas, e podem ser detectados por meio do diagnóstico molecular pela coleta de *swabs* de pele e mucosa. Porém, em alguns casos a infecção pelo HPV pode levar a manifestação clínica pelo aparecimento de verrugas planas, papilomas ou condilomas e também aparecimento de lesões neoplásicas em pele e mucosa (AMADOR-MOLINA et al., 2013; SCHIFFMAN; SOLOMON, 2013).

A família do HPV é distribuída em cinco gêneros de acordo com sua variação genotípica: *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Mu* e *Nu*. Os gêneros *Beta* e *Gama* estão associados a infecções subclínicas na pele, adquiridas durante a infância e que

podem regredir espontaneamente ou continuar a produzir cópias virais ao longo dos anos. O gênero *Mu* infecta região palmar e plantar com o aparecimento de verrugas que também podem ser eliminadas espontaneamente pelo sistema imunológico (BURK; HARARI; CHEN, 2013).

O gênero *Alfa* agrupa os tipos de HPV que levam a manifestações clínicas relevantes em humanos e são responsáveis por lesões neoplásicas na pele e/ou mucosa. HPV-*Alfa* infecta queratinócitos indiferenciados da camada basal do epitélio escamoso estratificado, podendo desta forma, infectar superfície mucocutânea da região anogenital e do trato aerodigestivo superior (VILLIERS et al., 2004).

Sua transmissão acontece pelo contato direto entre a pele e/ou mucosa com a região infectada, podendo ser caracterizada uma IST. Atualmente esta infecção se destaca por ser a mais disseminada em nível global, estimando-se que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas serão expostas ao vírus na primeira década da sua vida sexual ativa (BRAATEN; LAUFER, 2008). As infecções da região genital pelo HPV-*Alfa* podem ser subclínicas (sem alterações na mucosa ou epitélio escamoso) e podem ser eliminadas pelo sistema imunológico dentro de 24 meses. Manifestações clínicas incluem o aparecimento de verrugas planas, papilomas e lesões que podem seguir o quadro de infecção transitória com regressão espontânea ou infecção crônica que leva ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; RODRIGUEZ et al., 2008).

O HPV é um vírus não envelopado de DNA circular dupla fita com um capsídeo icosaédrico, de 52 a 55 nm de diâmetro e seu genoma contém cerca de 8 mil pares de bases (pb). Seu material genético é dividido em três regiões: região reguladora (URR), região precoce (ER) e região tardia (LR) (MOSMANN et al., 2015).

A URR, região não codificante, apresenta sítios de ligação para fatores de transcrição, desempenhando funções regulatórias através do controle da expressão gênica. A ER contém regiões de leitura aberta (ORF), com sequências codificantes das proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Por fim, a LR com duas ORF's codificando as proteínas L1 e L2 formadoras do capsídeo (BRAVO e FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; DE LIMA et al., 2013).

Essas proteínas apresentam diferentes funções e são expressas em diferentes fases da infecção. A E5, E6 e E7 são classificadas como proteínas oncogênicas por estarem associadas a alterações que induzem a malignidade celular.

A proteína E6 direciona, para a degradação, as proteínas de supressão tumoral, p53, TAp63 e p73 promovendo imortalização celular. A E7 sequestra a proteína do retinoblastoma (pRb) induzindo instabilidade cromossomal e progressão para a fase S do ciclo celular (MOODY; LAIMINS, 2010). A proteína E5 regula a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), auxilia na evasão da apoptose e induz proliferação celular. De modo geral, as proteínas oncogênicas possuem atividade de estímulo para proliferação celular, alteram e/ou depletam os mecanismos celulares de controle de replicação celular, de detecção e reparo de erro, resultando em acúmulo de mutações predispondo a malignização (WALLACE; GALLOWAY, 2015).

Os tipos de HPV são classificados de acordo com seu potencial carcinogênico. Existem os tipos de HPV de alto risco (HPV-AR), de risco indeterminado (HPV-RI) e de baixo risco (HPV-BR). Alguns fatores são levados em consideração para essa classificação, como o perfil das proteínas E6 e E7 que possuem atividade oncogênica e a epidemiologia do perfil da infecção com o tipo viral. Essa classificação é de grande importância clínica, pois possibilita estimar o risco de desenvolvimento das lesões cervicais e também estudar possíveis mecanismos genéticos e imunológicos envolvidos na infecção (SOUTO et al., 2005).

Os HPV-BR mais frequentes são o 2, 3, 6, 10,11, 53 e 57 responsáveis pelo aparecimento de verrugas epiteliais; o 6 e 11 representam 90% dos casos e estão associados com condilomas genitais. Já entre os HPV-AR destacam-se o 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, e 58. O HPV 16 representa 60% dos casos de CC e 85% do demais tipos de câncer associados ao vírus, o HPV 18 aproximadamente 15% e juntos somam 70% dos casos de CC (GUAN et al., 2012; SCHIFFMAN et al., 2016b).

2.3 CARCINOGENESE

Considerando a infecção pelo HPV como fator primário para o desfecho em CC, os estudos do ciclo biológico viral foram voltados para o HPV 16 por ser o tipo de maior prevalência e associação nestes casos, utilizando assim como modelo para explanação sobre os mecanismos de infecção (SOUTO, 2005).

A partir do contato entre pele e/ou mucosa infectada pelo vírus durante o contato íntimo ou por relação sexual, o vírus atinge as células da camada

basal do epitélio cervical através de microfissuras. Suas células alvo são os queratinócitos indiferenciados presentes na camada basal e células de reserva, por apresentarem atividade mitótica. Os receptores que participam do reconhecimento e internalização do conteúdo genômico viral ainda não são conhecidos (STANLEY, 2012).

Nas células, o genoma viral é mantido na forma de epissoma em LIEBG, em que somente os genes iniciais são expressos. No entanto, nas LIEAG pode ocorrer a integração do DNA viral ao genoma celular passando a expressar os genes tardios E6 e E7, que promovem a continuidade do ciclo celular garantindo a replicação desta célula (LI et al., 2008; PARK et al., 2014).

As células filhas geradas são células diferenciadas que não apresentam atividade mitótica. Essas células carregam baixa contagem de cópias virais que utilizaram a maquinaria celular para a síntese de DNA viral. As proteínas E6 e E7 continuam sendo expressas desregulando o ciclo celular fazendo com que a célula passe novamente para a fase S. Conforme as células sofrem mitose, as cópias virais são produzidas, e atingem então as camadas superiores onde o vírus começa a expressar as proteínas L1 e L2 que compõe o capsídeo, assim novos vírus são liberados na superfície do epitélio podendo ser transmitidos novamente por outro contato com uma região saudável (WALLACE; GALLOWAY, 2015).

O colo cervical é dividido em duas regiões, a endocervice e ectocervice. O endocervice constitui a porção superior mais próximo ao útero sendo formado por um epitélio colunar simples mucosecretor. A ectocervice é a região inferior mais próxima ao canal vaginal formado por epitélio escamoso estratificado. Entre essas duas regiões encontra-se a junção escamo-colunar (JEC), onde a transição do epitélio simples para escamoso acontece com presença de células metaplásicas imaturas que são mais suscetíveis a essa infecção (MOSCICKI et al., 2006).

A infecção pelo HPV pode seguir o curso de resolução, infecção transitória ou persistente. A sua evolução para câncer acontece de forma gradativa com o aparecimento de LIE de baixo grau (LIEBG) e de alto grau (LIEAG). Essas lesões são classificadas de acordo com suas características morfológicas e citológicas, de acordo com o grau de comprometimento e diferenciação do epitélio (ZSEMLYE, 2008).

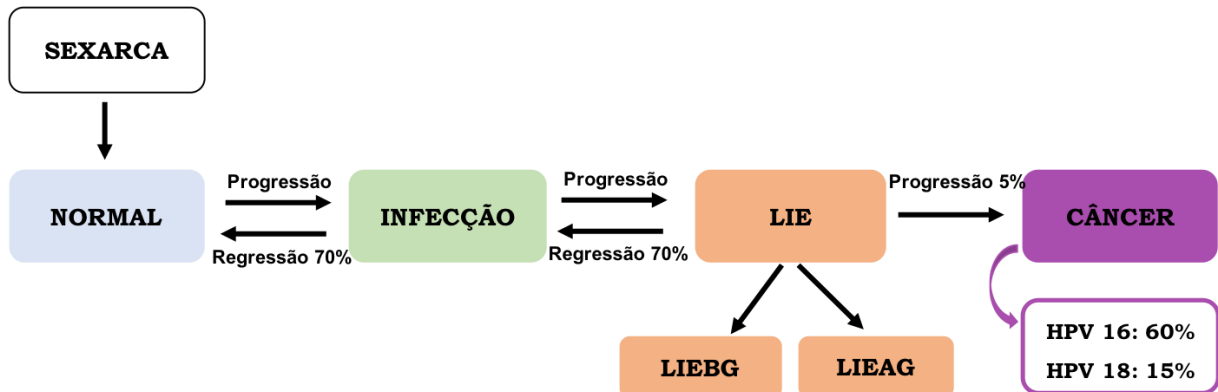
Na LIEBG somente o primeiro terço do epitélio está acometido, podendo-se encontrar atipias nucleares como hipercromasia, tamanho irregular, presença de grânulos grosseiros e halo perinuclear. O halo consiste em vacúolos ao redor do núcleo por consequência da ação citopática da proteína E5 do HPV que altera a estrutura do citoesqueleto. Neste tipo de lesão o vírus se encontra em sua forma episomal e apresenta alta taxa de replicação (WOODMAN et al., 2007).

Conforme acontece progressão gradual para LIEAG a proporção acometida por células displásicas expande para dois terços ou mais do epitélio, sem ultrapassar a camada basal. A característica mais importante para a diferenciação da malignização celular é quando o HPV integra seu DNA ao genoma do hospedeiro, através da clivagem na região do gene E1 e E2, causando ruptura na ORF da E2 e consequente perda de função da mesma (AMADOR-MOLINA et al., 2013; ZUR HAUSEN, 2002).

A E2 é responsável pela regulação negativa da expressão da E6 e E7, dessa forma, ao perder esse gene ocorre a superexpressão da E6 e E7 resultando em maior capacidade de malignização da célula. A alta expressão de E7 acentua a fosforilação de pRb resultando na liberação do E2F e aumento da função de quinases ciclina-dependentes que impulsionam a célula à fase S. Esse evento marca o início da imortalização celular e tumorigênese das LIEAG (KRISHNAPPA et al., 2014; SANO et al., 1998).

As neoplasias cervicais podem ser denominadas carcinoma de células escamosas (CCE) quando de origem celular escamoso ou adenocarcinoma (AD), originada no epitélio colunar glandular, podem também ser de origem de ambos os tecidos, carcinoma adenoescamoso. O carcinoma *in situ* é restrito ao epitélio de origem sem rompimento da membrana basal, quando há rompimento desta e formação de irregularidades é caracterizado carcinoma microinvasor. No carcinoma invasor há comprometimento do estroma e tecidos vizinhos, sendo um estágio avançado da doença (RAMAKRISHNAN; PARTRICIA; MATHAN, 2015).

Figura 1. Representação esquemática da evolução da infecção pelo HPV.



LIE: Lesão Intraepitelial Escamosa; LIEBG: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau; LIEAG: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau.

Autor: Pereira, Ana Paula Lombardi.

2.4 DIAGNÓSTICO

Para a triagem e diagnóstico de lesões no colo uterino é realizado análise citológica do material do colo uterino obtido pelo esfregaço celular através da coleta do material pela escova estéril cervical realizada pelo médica(o) ginecologista ou enfermeira(o). A análise histológica é feita quando há suspeita para confirmação de lesões cervicais através da biópsia do tecido por colposcopia (SASLOW et al., 2013). A idade de cobertura para o exame citopatológico, segundo as Diretrizes Brasileiras para Rastreamento de Câncer de Colo de Útero, é de mulheres a partir dos 25 anos que já iniciaram a vida sexual até os 64 anos, sendo que, o exame deve ser feito anualmente e após 2 exames negativos para qualquer alteração, passa a ser feito a cada 3 anos (INCA, 2016).

George N. Papanicolaou descreveu em 1920 a primeira técnica de citologia avaliativa, que ficou conhecida como exame de Papanicolaou ou preventivo. Sua avaliação levava em consideração somente atipias citológicas como figuras mitóticas anormais e alterações nucleares que sugeriam malignidade, dividindo em classes: I, II, III, IV e V (SCHIFFMAN; SOLOMON, 2013).

Nas décadas de 60 e 70 introduziu-se o termo displasia para denominar os distúrbios de polaridade e diferenciação celular encontrados no epitélio cervical, divididos em displasia leve, moderada e severa. Com o surgimento da avaliação histológica, Ralph Richard utilizou o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para classificar as lesões encontradas: NIC1 (displasia leve), NIC2 (displasia moderada) e NIC3 (displasia severa) (SCHIFFMAN et al., 2016a).

Em 1988 foi realizado o Consenso de Bethesda (EUA) onde foi padronizado a forma de avaliação atual para avaliação citológica passando a utilizar a terminologia de lesão intraepitelial de baixo ou alto grau (SOLOMON et al., 2002). Nos Estados Unidos essa classificação citológica é adicionado a técnica de imunohistoquímica para marcação da p16, importante marcador de progressão tumoral e também a detecção molecular de HPV-AR (NAYAR; WILBUR, 2015).

No Brasil, em 2002, foi realizado o Congresso Brasileiro de Citopatologia onde padronizou-se a utilização do sistema Bethesda com adaptações, se encontra em vigência em todos os laboratórios de patologia conveniados ao Sistema Único de Saúde (SUS). Por motivos de restrição financeira, ainda não é possível realizar o teste molecular e imunohistoquímico de rotina em todas as amostras de rastreamento (INCA, 2016).

Quadro 1. Principais classificações citológicas, histológicas e moleculares utilizadas para auxiliar no diagnóstico patológico de lesões cervicais.

CITOLÓGICO		HISTOLÓGICO		MOLECULAR
Papanicolaou (1941)	Bethesda (2001)	Richard (1967)	Last (2012)	HPV-AR
I	NLIE	-	Normal	Normal
II	ASC/AGC	-	-	Infecção
III	LIEBG	NIC1	LIEBG	Infecção
IV	LIEAG AIS	NIC2/NIC3	LIEAG	Pré-câncer
V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

NLIE: Negativo para lesões intraepiteliais escamosas; ASC: *Atypical Squamous Cells*; AGC: *Atypical Glandular Cells*; LIEBG: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau; LIEAG: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; NIC1/2/3: Neoplasia Intraepitelial Cervical; AIS: Adenocarcinoma *in situ*; Last: *Low Anogenital Squamous Terminology*.

Fonte: Adaptado de (SCHIFFMAN et al., 2016b)

2.5 FATORES DE RISCO

O genótipo do HPV, a resposta imunológica do hospedeiro e as características individuais de comportamento sexual e reprodutivo do hospedeiro são fatores que determinam o perfil da infecção e progressão da doença. Como abordado anteriormente, o HPV é classificado de acordo com seu potencial carcinogênico, logo,

infecções por HPV-AR são consideradas infecções de risco pela sua alta associação com CC (SCHIFFMAN et al., 2016a).

Os fatores de risco associados ao CC incluem principalmente aqueles associados à infecção pelo HPV, já que este é o causador inicial e essencial para a evolução das lesões e câncer. A via mais comum do contágio e transmissão do HPV é através do contato sexual/íntimo. Desta forma, idade precoce do início da vida sexual (sexarca), múltiplos parceiros sexuais e relação desprotegida do uso de preservativo são importantes, pois levam ao aumentando do risco de infecção por HPV por consequência da maior exposição (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2003).

Além disso, outras características de comportamento sexual e hábitos individuais como tabagismo, sedentarismo, etilismo, obesidade, uso de anticoncepcionais orais, paridade e outros fatores que podem alterar o sistema imunológico estão envolvidos na capacidade do organismo em responder a infecção pelo HPV e determinar se esta progredirá para resolução, persistência ou malignização. Neste contexto, qualquer alteração no sistema imunológico que prejudique a resposta contra a infecção poderá resultar em quadro crônico da infecção (DIZ; MEDEIROS, 2009).

Mulheres em estado de imunossupressão estão mais suscetíveis a infecção pelo HPV, como portadoras da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA), de doenças autoimunes, pós-transplantadas, que fazem uso de corticoides sistêmicos a longo prazo e coinfeção com outros patógenos (HEARD et al., 2013; MANAMELA et al., 2018).

2.6 ESTADIAMENTO

O estadiamento do câncer pode ser feito levando em consideração a classificação de tumores malignos sistema TNM, padronizada pela UICC (União Internacional Contra o Câncer) ou classificação da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia). O sistema TNM classifica como T: extensão do tumor primário; N: presença ou ausência de metástase em linfonodos regionais e M: presença ou ausência de metástase em órgãos distantes. Utilizam como base a extensão anatômica do tumor, critério clínicos e histopatológicos (Quadro 2).

Quadro 2. Descrição dos estadiamentos do sistema TNM e FIGO.

TNM	FIGO	DEFINIÇÃO
TX	-	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	-	Sem evidência de tumor primário.
Tis	0	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	I	Carcinoma da cérvix confinado ao útero.
T1a	IA	Carcinoma invasor, diagnosticado somente pela microscopia.
T1a1	IA1	Invasão estromal de até 3 mm em profundidade e ≥ 7 mm de extensão horizontal.
T1a2	IA2	Invasão estromal de até 3 mm em profundidade e < 7 mm de extensão horizontal.
T1b	IB	Lesão clinicamente visível, limitada ao colo, ou lesão microscópica maior que T1a2/IA2.
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível com ≥ 4 cm em sua maior dimensão.
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível com mais de <4 cm em sua maior dimensão.
T2	II	Invade além do útero, mas não atinge a parede pélvica ou o terço inferior da vagina.
T2a	IIA	Sem invasão do paramétrio.
T2b	IIB	Com invasão do paramétrio.
T3	III	Estende à parede pélvica, compromete o terço inferior da vagina.
T3a	IIIA	Tumor que compromete o terço inferior da vagina, sem extensão à parede pélvica.
T3b	IIIB	Tumor que se estende à parede pélvica, ou causa hidronefrose ou exclusão renal.
T4	IVA	Invade a mucosa vesical ou retal, ou que se estende além da pélvis verdadeira.
M1	IVB	Metástase a distância.

Fonte: (UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER (UICC), 2004).

2.7 TRATAMENTO

As lesões cervicais geralmente são assintomáticas, mas em estágios avançados de câncer podem aparecer sintomas como sangramento vaginal, corrimento, dor pélvica e dispareunia (dor durante relações sexuais) (KONG et al., 2019).

A conduta terapêutica escolhida pelo médico responsável será direcionada de acordo com os resultados de exames clínicos e anatomopatológicos. Para diagnósticos precoces (até estadiamento IIA) o método utilizado mais comum é a excisão cervical da zona de transformação (EZT), podendo variar entre 1 e 3 níveis, EZT1: excisão da região ectocervical até 1 cm de profundidade da região endocervical; EZT2: ultrapassa a JEC e 1,5 a 2,0 cm do endocérvice; EZT3: avança até 2,5 cm do endocérvice (INCA, 2016).

Métodos cirúrgicos são recomendados apenas até o estadiamento IIB, onde há apenas uma pequena chance da cirurgia ser curativa. De forma geral, a histerectomia realizada por laparoscopia ou cirurgia aberta é aconselhada até o estágio IB2, para mulheres que não querem preservar sua fertilidade (LANDONI et al., 1997).

Já para estágios mais avançados (IIB-IVA) a recomendação é quimioterapia e radioterapia (Diz, 2009). O protocolo padrão para tratamento nesses casos é a combinação dos medicamentos quimioterápicos cisplatina (inibe seletivamente a síntese de DNA) e gencitabina (efeito sinérgico) administrados por seis semanas e associados a sessões de radioterapia pélvica seguida por braquiterapia, que se utiliza de radiação direcionada intracavital com menores risco de efeitos colaterais e toxicidade de órgãos adjacentes (ALMEIDA et al., 2005; COHEN et al., 2019).

2.8 RESPOSTA ANTITUMORAL

Câncer é o conjunto de doenças que tem como principal característica o crescimento acelerado e desordenado de células malignas em tecidos e órgãos saudáveis, tem a capacidade de se espalhar e acometer órgãos distantes caracterizando a metástase. Apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade sendo a segunda

maior causa de morte no mundo com 8,8 milhões de mortes no ano de 2015 (OMS, 2017).

A resposta imunológica antitumoral ou imunovigilância tumoral envolve essencialmente a resposta de células T CD4⁺ efectoras de perfil Th1, onde a expressão de citocinas Th1, principalmente o IFN- γ e TNF, induzem a ativação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, *natural killers* (NK) e macrófagos para eliminação de células transformadas e/ ou infectadas (EMMERICH et al., 2012; MUMM; OFT, 2013).

A inflamação crônica é descrita como sendo um ambiente pró-tumoral, com diminuição da resposta celular, aumento da resposta humoral e angiogênese, favorecendo assim a evasão tumoral pela troca de perfil Th1 para Th2 (O'GARRA et al., 2008; OKUYAMA et al., 2018). A alteração da resposta imunológica é um mecanismo de evasão tumoral, em que estas secretam e estimulam outras células do sistema imunológica a produzirem citocinas imunossupressoras de perfil Th2, como a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; VINAY et al., 2015).

Estudos anteriores demonstraram o aumento de células T regulatórias (Treg), subtipo de linfócitos T CD4⁺ responsáveis pela tolerância central e periférica de linfócitos, infiltradas em tecido tumoral regulando a expressão de citocinas imunorregulatórias, como o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e a interleucina-10 (IL-10), citocinas que promovem a mudança de resposta imunológica para perfil Th2. Altas concentrações em níveis séricos de IL-10 em pacientes diagnosticadas com CC foram associadas com pior prognóstico, crescimento tumoral e maior chance de metástase, indicando que a concentração de IL-10 poderia ser utilizada como um dos fatores preditores do CC (VINAY et al., 2015; YOU et al., 2018).

3 INTERLEUCINA-10

3.1 DESCRIÇÃO

A interleucina 10 (IL-10) foi descrita por Fiorentino et al., em 1989, utilizando o modelo de hipersensibilidade tardia *in vitro* para análise das respostas Th1 e Th2, observou que existia uma modulação entre elas. O interferon-gama (IFN- γ) diminuía a expressão do perfil Th2, enquanto que a Concanavalina-A, que estimula a resposta Th2, induzia a produção de uma citocina que inibia a resposta Th1. Essa

citocina foi chamada de Citocina Inibitória do Fator de Síntese (CSIF), mais tarde renomeada como IL-10 (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989).

A IL-10 é o principal membro da superfamília IL-10 que inclui as interleucinas (IL) 9, 20, 22, 24, 26 e IFN- γ . Sua estrutura molecular é homodimérica composta por 178 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 37 kDa. O gene se localiza no cromossomo 1 (1q31-1q32), com 5 éxons e 4 íntros (BERTI et al., 2017a; FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989).

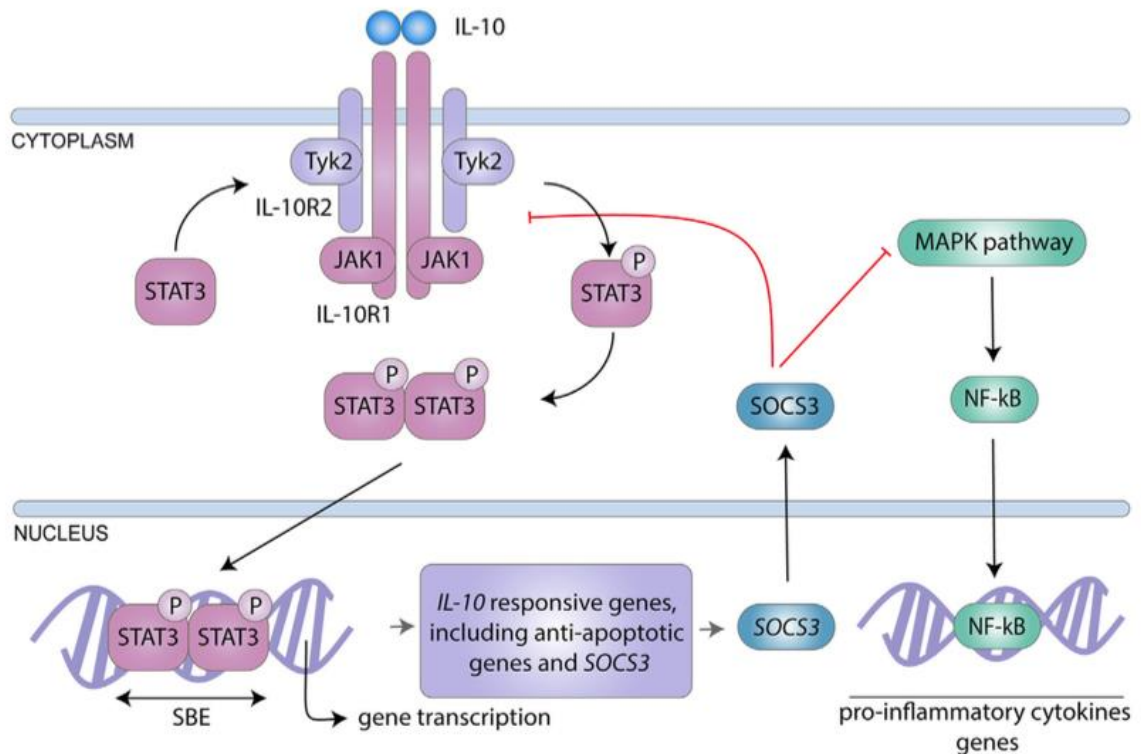
Por ser uma citocina prontamente necessária para diversos locais que demandam resposta rápida acredita-se que sua regulação é feita de maneira transcricional e pós-transcricional, para que seus níveis se mantenham equilibrados garantindo resposta rápida ao estímulo imunológico (MANNINO et al., 2015a).

A principal via de sinalização da IL-10 envolve a *Janus kinase 1* (Jak1), *Tyrosine kinase 2* (Tyk2) e *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). A IL-10 se liga ao seu receptor IL-10R, o qual é um receptor transmembrana tetramérico composto por duas subunidades ligantes IL-10R1 e duas moléculas acessórias de sinalização IL-10R2 (FIORANELLI e ROCCIA, 2014).

O homodímero da IL-10 se ao receptor IL-10R1 desencadeando uma cascata de fosforilação que se inicia na Jak1 acoplada a IL-10R2, que uma vez fosforilada fosforila a Tyk2. Resíduos de tirosinas são formados, servindo como domínio temporário para a ancoragem do STAT3. Uma vez ancorado, o STAT3 é fosforilado e translocado para o núcleo onde se liga a região SBE (*Stat binding elements*) na região promotora de genes responsivos a IL-10 (figura 2) (BERTI et al., 2017a; PESTKA et al., 2004).

Dentre os genes responsivos estão os genes anti-apoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-XL*, genes envolvidos na progressão do ciclo celular e o *SOCS3* (*Supressor of cytokine signaling 3*), que faz *feed-back* negativo nas vias Jak1/Tyk2/STAT3 e *MAP-kinase* resultando na diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α (HERRERO et al., 2003; MANNINO et al., 2015b).

Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização da IL-10.



Via de sinalização *Jak1/Tyk2/STAT3* da IL-10 mais comum em células mielóides. O homodímero da IL-10 se liga as subunidades IL-10R1, iniciando cascata de fosforilação da JAK1 e Tyk2, ocorre a exposição de domínios intracelulares de IL-10R1 que agem como sítios de ancoragem transitórios para STAT3. Uma vez ancorada, o STAT3 é fosforilado, e sua forma homodimérica é translocado para o núcleo onde se liga a região SBE na região promotora de diferentes genes responsivos a IL-10, incluindo SOCS3. A proteína SOCS3 faz *feedback* negativo da via *JAK1/Tyk2/STAT3*, bem como inibe a via da *MAPK*, evitando a translocação do *NF-κB* para o núcleo e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β).

Fonte: BERTI, et al.,2017.

Uma grande variedade de células do sistema imune produz a IL-10, como os macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos Th1, linfócitos Th2, linfócitos Th17, Treg, linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, NK, mastócitos e fibroblastos (KUBO; MOTOMURA, 2012a).

A IL-10 é considerada ambígua por apresentar tanto a atividade anti-inflamatória quanto pró-inflamatória regulando a resposta imunológica mediada por células linfóides, mielóides, queratinócitos e células endoteliais. Sua ação anti-inflamatória acontece pela redução da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-12, GM-SCF, TNF- α e IFN- γ ; e pelo aumento de citocinas de perfil Th2

como IL-4, IL-5 e IL-13. Além disso, diminui a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, MHCII e CTLA-4, e aumento da PD-1 (proteína programadora de morte celular 1) resultando na anergia de células T e células dendríticas (COPE et al., 2011). Seus efeitos anti-inflamatórios foram estudados em ensaio clínico de paciente com doenças inflamatórias imuno-mediadas como doença de Crohn e psoríase. Em pacientes com psoríase a IL-10 diminuiu citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α além de diminuir proliferação dos queratinócitos (FUCHS et al., 1996)

Sua eficiência anti-inflamatória se mostrou ser dose-dependente no caso da doença de Crohn, onde doses moderadas de IL-10 diminuíram as citocinas inflamatórias, porém, em doses maiores seu efeito foi inverso, estimulando a secreção de IFN- γ e marcadores de inflamação (BIJJIGA; MARTINO, 2011; REICH et al., 2001). Como efeitos pró-inflamatórios foi descrito que IL-10 secretada possivelmente por NK, linfócito B ou granulócitos induz a resposta Th2 em estudos de modelo inflamatórios, também atuam como indutores de proliferação de células B e estimulam troca de isótipo de classes de IgG, utilizando a IL-4 como co-fator (OSTLIE et al., 2001; YU; WANG, 2011).

O importante papel regulador da resposta inflamatória exacerbada foi demonstrado por estudos em camundongos *knockout* (IL-10^{-/-}), que desenvolviam doenças inflamatórias como enterocolite crônica, com produção alta de TNF- α , IFN- γ e IL-1, após administração de IL-10 esse quadro era rapidamente revertido (KÜHN et al., 1993).

3.2 IL-10 E CÂNCER CERVICAL

O papel ambíguo da IL-10 provoca debates em virtude da sua ação oncosupressora e oncogênica em neoplasias associadas a vírus. Estudos relatam a associação da presença de DNA de HPV-AR 16 e 18 com a alta expressão de mRNA de IL-10 pelas células do sistema imunológico e também por células tumorais (SUNG e LEE, 2013).

Para a resolução eficiente de uma infecção viral a resposta imune celular de perfil Th1 é essencial. Estudos sobre a resposta imune ao HPV demonstram que a infecção inicial leva a uma resposta Th1 que logo é inibida e a resposta Th2

passa a prevalecer, sendo esse mecanismo associado à evasão viral (SANTIN et al., 2000; SYRJANEN et al., 2009; TORRES-POVEDA et al., 2012).

Os linfócitos de perfil Th2 e Treg produzem IL-10 favorecendo a imunossupressão pela inibição da função efetora das células Th1, das células B e dos macrófagos, interferindo desta forma na resposta imunológica celular essencial para eliminação do vírus pelo sistema imune (FIORANELLI e ROCCIA, 2014; KUBO e MOTOMURA, 2012; PRETE et al., 1993).

O estudo de Clerici et al. demonstrou que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LIE produzem menores concentrações de IL-2 e IFN- γ , associado ao aumento de IL-4 e IL-10 (CLERICI et al., 1997). A análise de pacientes com LIE e CC demonstrou aumento significativo de IL-10 em PBMC e aumento gradativo na expressão de IL-10 na citologia comparados ao cérvix normal evidenciando sua associação com progressão tumoral. Estudos *in vitro* mostram a ação inibidora da IL-10 na produção de IL-12, que induz expressão de IFN- γ , ativação de NK e diferenciação de célula T *naïve* em células de perfil Th1. Sua inibição pela IL-10 auxilia na polarização para Th2, tornando a zona de transformação do cérvix mais susceptível a infecção pelo HPV (CHOPRA; DINH; HANNIGAN, 1998; GIANNINI et al., 1998).

3.3 POLIMORFISMO NO GENE DA IL-10

O gene da IL-10 se localiza no cromossomo 1 (1q31-1q32) e é composto por 5 éxons e 4 íntrons (KIM et al., 1992). É considerado altamente polimórfico e na região promotora três polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram descritos, são eles: rs1800872 (c.-592C>A), rs1800870 (a.-1082A>G) e rs1800871 (c.-819C>T) (ESKDALE et al., 1998).

Turner et al. (1997), foi o primeiro a descrever os três polimorfismos encontrados na região promotora e seu trabalho foi baseado em estudo anterior de Kubo et al., 1995. Este demonstrava possível alteração na ligação da fatores de transcrição na região promotora do gene da IL-10 devido à presença de polimorfismos.

Desde a descoberta dos efeitos destes polimorfismos sobre a transcrição da IL-10 gerando diferentes padrões de transcrição e expressão da proteína, diversos pesquisadores começaram a analisar as possíveis consequências de polimorfismos da IL-10 com doenças. Um dos primeiros a descrever foi Hoobs et

al. (1998) que demonstraram o aumento da concentração sérica de IL-10 em pacientes com asma atópica, associado ao polimorfismo rs1800872. Também demonstrou a importância do papel imunorregulador e anti-inflamatório da IL-10 utilizando camundongos *knock-out*, estes desenvolviam alergia pulmonar letal na ausência de IL-10 (HOBBS et al., 1998).

O polimorfismo rs1800872 (c. -592C>A) consiste na troca do nucleotídeo citosina (C) pela adenina (A) na posição -592 da região promotora do gene da IL-10. Steinke et al. (2004) demonstraram que a troca para o nucleotídeo A altera o sítio de ligação do fator de transcrição Sp1 que atua como repressor da transcrição da IL-10 demonstrando mais uma vez a associação do polimorfismo com maiores concentrações de IL-10 sérico (STEINKE et al., 2004).

Em relação a lesões precursoras do CC, segundo o trabalho de Torres-Poveda et al. (2014) com mulheres Mexicanas, foi observado que este polimorfismo altera os níveis de expressão da IL-10 no microambiente de lesões cervicais e também os níveis séricos, onde os genótipos C/A e A/A no modelo dominante e no modelo co-dominante foram associados a maiores chances de LIE (CHAGAS et al., 2013; TORRES-POVEDA et al., 2014).

Alguns estudos (Quadro 3) estão disponíveis na literatura atual correlacionando o CC ao polimorfismo c.-592C>A da IL-10. De forma geral, estes estudos demonstram maiores chances de CC em mulheres que apresentam genótipo C/A associados a maior frequência do alelo A (SINGHAL et al., 2015; ZIDI et al., 2015; ZOODSMA et al., 2005) enquanto outros não demonstraram nenhuma associação (BAI et al., 2016; ROH et al., 2002).

Quadro 3. Estudos encontrados que correlacionam o polimorfismo c. -592 C>A da IL-10 com CC.

ESTUDO	AMOSTRA	POPULAÇÃO	RESULTADOS
Roh, et al. (2002)	CC= 144 Controle= 179	Coreia do Sul	Sem associação
Zoodsma et al. (2005)	CC= 695 Controle= 643	Holanda	Associação com genótipo C/A
Singhal et al. (2014)	CC= 208 Controle= 150	Índia	Associação com genótipo C/A

Zidi et al. (2015)	CC= 86 Controle= 126	Tunísia	Associação com alelo A
Bai et al. (2016)	CC= 165 Controle= 165	China	Sem associação
Du et al. (2019)	CC= 144 Controle= 179	China	Associação com genótipo C/A, A/A e alelo A.

O polimorfismo no gene da IL-10 parece ter aplicabilidade clínica, visto que a variação alélica na região promotora pode determinar baixa, intermediária ou alta expressão de IL-10. A capacidade de secretar diferentes níveis de citocinas, herdada geneticamente, parece ser relevante na resposta imune contra a infecção pelo HPV e na oncogênese de lesões cervicais.

Considerando a alta incidência e mortalidade do CC no Brasil, a análise do genótipo do polimorfismo c. -592 C>A da IL-10, ainda não estudado em população brasileira, pode contribuir na composição de um quadro de marcadores de suscetibilidade ao CC. Desta forma, auxiliaria na triagem e acompanhamento médico mais eficiente para mulheres que apresentarem maior risco de desenvolvimento e progressão de CC.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação do polimorfismo rs1800872 (c.-592C>A) do gene da IL-10, as características sociodemográficas, de comportamento sexual e reprodutivas de pacientes do Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba (HEG) diagnosticadas com CC.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar a detecção molecular de DNA-HPV pela técnica de PCR em amostras citológicas de mulheres atendidas na Unidade Básica de Saúde (UBS) Dr. Justiniano Clímaco da Silva e Armindo Guazzi de Londrina, PR, a fim de se determinar o grupo controle;
- Avaliar a frequência genotípica do polimorfismo rs1800872 (c.-592C>A) da IL-10 pela técnica de PCR-RFLP, em mulheres com diagnóstico de CC do Hospital do Câncer de Londrina e do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba e mulheres atendidas pelas UBSs, negativas para alterações cervicais e para a detecção de DNA-HPV;
- Determinar o perfil sociodemográfico das mulheres participantes do estudo (idade, estado civil, escolaridade, etnia e hábito tabagista), perfil de comportamento sexual e características reprodutivas como o uso de anticoncepcionais orais, uso de contraceptivo de barreira física (preservativo masculino), sexarca (idade da primeira relação sexual), número de gestações e abortos;
- Analisar a frequência genotípica do polimorfismo c. -592C>A no grupo controle e no grupo caso;
- Analisar a associação do polimorfismo rs1800872 (c. -592 C>A) da IL-10 com o diagnóstico de CC.

Produção Científica

5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

***IL-10* c. -592 C>A (rs1800872) polymorphism is associated with cervical cancer**

ABSTRACT

Cervical cancer has one of the highest incidences worldwide, nowadays is the fourth malignant tumor affecting women in Brazil. This neoplasia is a result of squamous intraepithelial lesion (SIL) caused by Human papillomavirus (HPV) carcinogenic types. Persistent HPV infection leads to SIL, classified as low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), if untreated may progress to cervical cancer. The majority of SIL cases will regress spontaneously within 36 months and only about 5-15% of HSIL will progress to cancer. Thus, the immune response plays a crucial role determining progression or inhibition of tumor development. Interleukin-10 (IL-10) is an immunoregulatory cytokine with both anti-inflammatory and immunosuppressive role. Its cervical and serum concentrations have been associated to a poor prognostic. The *IL-10* rs1800872 polymorphism (c. -592 C>A) seems to modify the amount of IL-10 protein and mRNA. Thereby, the aim of this work is to better understand the role of *IL-10* c. -592 C>A polymorphism in cervical cancer development. The genotyping was conducted by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism. Genomic DNA was extracted from patient's peripheral blood and tumor biopsy. Socio-demographic, sexual behavior and reproductive characteristics data were also evaluated. High frequency of cervical cancer was observed in women at age ≥ 55 ($p=0.001$), widow ($p=0.018$), smokers ($p=0.001$), with educational level up to elementary schooling ($p=0.001$), also correlated with oral contraceptive hormonal method intake ($p=0.007$), use of condoms ($p=0.009$) and more than one parturition ($p=0.011$). Considering the genotypes, C/A was the most frequent among cancer group. The co-dominant model in logistic binary regression adjusted for confounders, showed that patients presenting C/A genotype had 2.15 times more chances for developing cervical cancer (OR=2.15; CI_{95%}=1.02–4.56). The dominant model, C/A + A/A, was also independently associated with 2.71 times more chances for cervical cancer development when compared to control patients (OR=2.71; CI_{95%}=1.05–4.47). Our study analyses show, for the first time in the literature, the association between cervical cancer and *IL-10* c. -592C>A polymorphism in Brazilian population (mixed race), demonstrating that the allele A presence was independently associated with cervical cancer development, **also** older age, smoking status, use of oral contraceptive method and educational level are independently associated with the diagnosis.

Keywords: Cancer. Cytokine. Interleukin-10. Human papillomavirus.

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the fourth most incident cancer among women worldwide. World Health Organization's report in 2018 estimated that approximately 570 thousand women were diagnosed with CC resulting in 266 thousand deaths, of which 90% occurred in low or middle income countries (TORRE et al., 2015; WHO, 2016;2018).

It is well established that Human papillomavirus (HPV) infection in the uterine colon is the main factor for CC development. HPV carcinogenic types such as HPV16 and HPV18, are responsible for squamous intraepithelial lesions (SIL) that can be classified as low squamous intraepithelial lesions (LSIL) or high squamous intraepithelial lesions (HSIL), both considered precancerous lesions (SCHIFFMAN et al., 2007).

Several studies demonstrated that the majority (50-90%) of the HPV infections will clear or be undetectable in about 12 to 36 months, depending on HPV type, country and screening analysis. The risk to develop HSIL is higher in persistent infection up to 12 months, and about 15% of HPV16 positive women will evolve to CC (INSINGA et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2008; WHEELER et al., 2009; WHO, 2016).

Considering the low percentage of HPV infections leading to CC, it is noteworthy that the virus alone is not sufficient to promote carcinogenesis and other risk factors are associated as co-infection, diet habits (overweight), smoking status, hormonal oral contraceptives, parturition, family history of CC, low income, limited access to health care and immunosuppressive state (KESSLER, 2017; SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

Therefore, the immune system plays a crucial role by suppressing or supporting tumor development through activation of different immune components, including cells and cytokines. The modulation of tumor growth seems to be related to antigen-presenting response, that is down regulated in CC, resulting in humoral response and reduction of the cellular response (ZUR HAUSEN, 2002).

In this scenario an important immunoregulatory cytokine, the interleukin-10 (IL-10), is significantly correlated to the progression of LSIL, HSIL and CC, gradually increasing IL-10 mRNA expression (BHAIRAVABHOTLA et al., 2007; MIN; PU; GU, 2018). IL-10 is responsible for the shift of Th1 response (associated with HPV clearance) to Th2 (immune-inhibitory), considered an evasion mechanism,

enhancing tumor growth (BARBISAN et al., 2012). Is also correlated with T cell suppression, inhibition of antigen-presentation by macrophages, T cells and dendritic cells (DC) contributing to an immunosuppressive environment for tumor progression (MANNINO et al., 2015a; PESTKA et al., 2004).

Several studies correlate IL-10 expression with the susceptibility of HPV infection, SIL and CC and its expression seems to be correlated with a poor prognostic for CC. Bermudez-Morales et al. (2009) showed correlation between IL-10 mRNA expression in women with LSIL, HSIL and CC, where higher expression was associated with the disease severity (BERMUDEZ-MORALES et al., 2008).

The *IL-10* gene is highly polymorphic and three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the promoter region are known: (rs1800896 g. -1082 A>G; rs1800871 c. -819 C>T; and rs1800872 c -592 C>A) (ROH et al., 2002).

Hobbs et al., (1998) were the first to describe the c. -592C>A polymorphism (rs1800872), demonstrating loss in the negative promoter function, and the possible effect of this polymorphism altering the IL-10 transcription, therefore influencing its mRNA expression at the tumor microenvironment (ROH et al., 2002; TURNER et al., 1997). Steinke et al. (2004) were the first to demonstrate that the nucleotide exchange C (cytosine) to A (adenine) increases promoter activity (STEINKE et al., 2004).

Considering the incidence of CC in Brazil and the not well established influence of c.-591C>A (rs1800872) polymorphism on its development, the aim of the present study was to evaluate the influence of the aforementioned polymorphism in Brazilian women diagnosed with CC.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLES COLLECTION AND CHARACTERIZATION

This case control study included 85 patients diagnosed with CC (carcinoma and adenocarcinoma) confirmed by a pathologist based on histopathology and clinical features, and 146 control subjects negative for cytological abnormalities. Participants were recruited from Erasto Gaertner Hospital (Curitiba, PR, Brazil), Cancer Hospital of Londrina (Londrina, PR, Brazil) and two Basic Health-care Units

(Justianiano Clímaco da Silva and Armindo Guazzi, Londrina) between 2014 and 2018.

All subjects underwent DNA analysis for IL-10 polymorphism genotyping (rs1800872) using different biological samples. Cytobrushes from women who attended the basic health-care units were collected and the samples were stored in 2 mL of TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) at 4 °C until further analysis. Patients from Hospital Erasto Gaertner had peripheral blood collected into sterile syringes containing the anticoagulant EDTA, and stored at 4 °C until analysis. Cervical cancer biopsy was collected from Cancer Hospital of Londrina, previously fixed into paraffin.

The study was approved by the Institutional Ethics Committee Involving Humans of the State University of Londrina (Londrina, PR, Brazil) (CEP/UEL 133/2012; CAAE 05505912.0.0000.5231) and all subjects were promptly informed with clear instructions and information about the study and their questions and doubts were elucidated prior to the samples collection and interview.

GENOMIC DNA EXTRACTION

Genomic DNA from cervical cytobrushes was obtained using DNAzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions, and stored at –20 °C. Genomic DNA from peripheral blood samples was extracted using the Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix, Curitiba, PR, Brazil).

DNA from cervical cancer biopsy previously fixed into paraffin was extracted using the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. DNA concentration of all samples was measured by NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) at 260 nm and purity was assessed through 260/280 ratio.

HPV DETECTION BY PCR

HPV detection was performed, in the control group, by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using the specific primers MY09 (5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-

3') (BAUER et al., 1991), which were designed to amplify a conserved region of approximately 450 bp in the HPV L1 gene (GenBank Accession number: AJ236888). Reaction conditions were 190 nM of dNTPs*, 500 nM of each primer*, 2 mM of MgCl₂*, 1x of Buffer* (20 mM Tris-HCL (pH 8.4), 50 mM KCl), approximately 80 ng of DNA and 1.25 U of *Taq DNA polymerase**, annealing temperature of 55 °C. Amplification of the human b-globin gene (268 bp) was performed as an amplification control, using the primers GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3') under the same conditions as the HPV PCR. DNA from HeLa cells (containing HPV18-DNA) were used as positive control and reactions with no DNA were used as negative control. PCR products were electrophoresed on 10% polyacrylamide and silver nitrate stained.*Reagents by Thermo Fisher Scientific.

IL-10 RS1800872 POLYMORPHISM GENOTYPING BY PCR-RFLP

The *IL-10* c.-592C>A polymorphism was genotyped using PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Specific set of primers, forward (5'-GTGGAAACATGTGCCTGAGA-3') and reverse (5'-ATGAGGGGGTGGGCTAAATA-3'), were used to amplify a region of 154 bp of *IL-10* gene (CAPASSO et al., 2007), containing the polymorphic locus (*GenBank* NG_012088.1). PCR conditions were 0.1 mM of dNTPs*, 0.25 uM of each primer*, 1.5 mM of MgCl₂*, 1X of Buffer* (20 mM Tris-HCL (pH 8.4), 50 mM KCl), approximately 100 ng of DNA and 1.0 U of *Taq DNA polymerase**, with an annealing temperature of 58 °C. The amplified fragments of 154 bp were submitted to enzymatic restriction with 1 U of Afa I (Rsa I)* enzyme for polymorphism analysis, according to the manufacturer's instructions. This specific enzyme cleaves the amplified fragment when an adenine is present at locus 592, producing two fragments of 79 and 75 bp. In the presence of a cytosine, the 154 bp fragment remains intact. The PCR and the restriction fragments were electrophoresed on 10% polyacrylamide and silver nitrate stained.

*Reagents by Thermo Fisher Scientific.

STATISTICAL ANALYSIS

All categorical data were analyzed by Chi-Square test (χ^2 test) and expressed as absolute value and percentage.

Age data (continuous variable) were tested for normality by Kolmogorov–Smirnov test and assumed a non-normal distribution being further analyzed by Mann–Whitney test for group comparison and expressed by median and interquartile range (IQR).

The crude and adjusted odds ratio with 95% confidence interval were calculated to estimate the association between polymorphisms and cervical cancer based on a binary logistic regression model, without or with adjustment for confounding factors (smoker status, educational level, oral contraceptive method, condom use and age). All data were analyzed in SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

For this study, 231 women were selected and categorized as control group, including only negative women for any cervical abnormalities, whereas the cervical cancer group included women diagnosed with squamous cells carcinoma or adenocarcinoma. The control group is composed by 146 (63.2%) women, and cervical cancer group included 85 (36.8%) patients. The control group presented a median age of 42 years (IQR=19), being significantly lower than cancer group median age, 50 years (IQR=25) ($U=8309.500$; $p<0.001$).

SOCIO-DEMOGRAPHIC DATA

Socio-demographic data is shown in Table 1. Information about age, marital status, educational level, ethnicity and smoking status were compared between control and cervical cancer group. The frequency of CC was found higher among women older than 55 years ($p=0.001$), widow ($p=0.018$), that had educational level up to elementary school ($p=0.001$) and smokers ($p=0.001$). Regarding age and marital

status, widowed was associated with older age (55 years or more) in both control and cancer groups ($p < 0.001$).

Table 1. Socio-demographic data of control and cancer groups.

Variable	Control		Cervical Cancer		P value*
	n	(%)	n	(%)	
Age (years) n=231					0.001
≤ 24	8	(5.5)	0	(0.0)	
25 – 34	34	(23.3)	11	(12.9)	
35 – 44	36	(24.7)	26	(30.6)	
45 – 54	45	(30.8)	17	(20.0)	
≥ 55	23	(15.7)	31	(36.5)	
Marital status n= 230					0.018
Single	109	(74.7)	53	(63.1)	
Married	11	(7.5)	4	(4.8)	
Divorced	19	(13.0)	13	(15.4)	
Widowed	7	(4.8)	14	(16.7)	
Educational level¹ n=230					0.001
Elementary	57	(39.3)	68	(80.0)	
Secondary	72	(49.7)	13	(15.3)	
Higher education	16	(11.0)	4	(4.7)	
Ethnicity n= 230					0.532
Caucasian	74	(51.0)	47	(55.3)	
Non-caucasian	71	(49.0)	38	(44.7)	
Smoking status n= 231					0.001
Non-smoker	114	(78.1)	45	(52.9)	
Smoker	20	(13.7)	22	(25.9)	
Former smoker	12	(8.2)	18	(21.2)	

* Analysis by two-sided Chi-square (χ^2) test considering p value < 0.05 as significance level.

¹ Based on Brazilian educational system.

SEXUAL BEHAVIOR AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS

For sexual behavior and reproductive characteristics, showed in Table 2, the oral contraceptive method, condom use, age at first intercourse, number of pregnancies and number of abortion were analyzed. Significant difference was found in women who use oral contraceptive method ($p=0.007$), the condom use ($p=0.009$)

and patients who had been pregnant five or more times ($p=0.011$). The age of first intercourse and abortion showed no significance ($p=0.696$; $p=0.596$ respectively).

Table 2. Sexual behavior and reproductive characteristics of control and cancer groups.

Variable	Control		Cervical Cancer		P value*
	n	(%)	n	(%)	
Oral contraceptive method n= 228					0.007
	No	104 (72.2)	46 (54.8)		
	Yes	40 (27.8)	38 (45.2)		
Condom use n= 228					0.009
	No	132 (91.7)	67 (79.8)		
	Yes	12 (8.3)	17 (20.2)		
Age at first sexual intercourse (years) n= 227					0.696
	≤17	77 (52.7)	45 (55.6)		
	≥18	69 (47.3)	36 (44.4)		
Pregnancies n= 231					0.011
	None	13 (8.9)	2 (2.4)		
	1	21 (14.4)	13 (15.3)		
	2	49 (33.5)	22 (25.9)		
	3	35 (24.0)	15 (17.6)		
	4	15 (10.3)	13 (15.3)		
	≥5	13 (8.9)	20 (23.5)		
Abortion n= 220					0.596
	No	104 (78.2)	71 (81.6)		
	Yes	29 (21.8)	16 (18.4)		

* Analyses by two-sided Chi-square (χ^2) test considering p value <0.05 as significance level.

IL-10 C. -592C>A POLYMORPHISM

IL-10 c. -592 C>A polymorphism genotypes distribution were in the Hardy-Weinberg equilibrium in both control and cervical cancer groups ($p>0.05$). Regarding genotype distribution, among control group patients the C/C genotype was verified in 68 (16.5%) women, the C/A genotype in 62 (42.5%), and the A/A in 16 (11.0%). Analyzing the cancer group, 24 (28.1%) presented the C/C genotype, 50 (58.8%) the C/A genotype and 11 (12.9%) had genotype A/A.

The allele frequencies were 0.68 for the C allele (ancestral allele) and 0.32 for allele A (variant allele) in the control group, in the cancer group were 0.58 and 0.42 for allele C and allele A, respectively. Data available in the 1000 Genome Project

shows genotype frequencies similar to our control group in American, Iberian and Tuscany in Italia ($p>0.05$).

Genotypes models for statistical analysis included co-dominant, dominant, recessive models and allele frequency, as shown in table 3. Association between the polymorphism and CC, in both crude and adjusted values for confounders, was observed in co-dominant and dominant models for allele A carriers. The frequency of the C/A genotype, C/A + A/A genotypes, and allele A was higher in the cancer group compared to control ($p= 0.021$, $p= 0.006$, and $p= 0.030$, respectively). Consequently, susceptibility to CC was higher in women carrying C/A genotype ($OR_{adj}=2.15$; $CI_{95\%}= 1.02 - 4.56$), C/A + A/A genotypes ($OR_{adj}=2.71$; $CI_{95\%}= 1.05 - 4.47$), and allele A ($OR_{cr}=1.55$; $CI_{95\%}= 1.05 - 2.29$). No association was found when the recessive model was analyzed ($p>0.05$).

Table 3. Distribution of *IL-10* c. -592 C>A polymorphism genotypes in control and cancer groups.

Genotypes	Control		Cancer		Crude		Adjusted	
	n	(%)	n	(%)	OR	CI	OR	CI
Co-dominant								
C/C	68	(46.6)	24	(28.2)		Reference		Reference
C/A	62	(42.5)	50	(58.8)	2.28	1.26 – 4.15	2.15	1.02 – 4.56
A/A	16	(11.0)	11	(12.9)	1.95	0.79 – 4.78	2.24	0.072 – 7.03
Dominant								
C/C	68	(46.6)	24	(28.2)		Reference		Reference
C/A + A/A	78	(53.4)	61	(71.8)	2.22	1.25 – 3.93	2.71	1.05 – 4.47
Recessive								
C/C + C/A	130	(89.0)	74	(87.1)		Reference		Reference
A/A	16	(11.0)	11	(12.9)	1.21	0.53 – 2.74	1.44	0.50 – 4.13
Alleles								
C	198	(67.8)	98	(57.6)		Reference		
A	94	(32.2)	72	(42.4)	1.55	1.05 – 2.29		

Logistic binary regression analysis, cervical cancer as dependent variable and c.-592C>A polymorphism as explanatory variable. Crude and adjusted values for cofounders: age, educational level, smoking status, oral contraceptive method and condom use (adopted $p<0.05$ as significance level).

Bolded value: $p<0.05$; OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval.

For histological grade of SCC, 49 patients were included and classified as well differentiated squamous cells carcinoma (WDSCC), moderately differentiated squamous cells carcinoma (MDSCC), and poorly differentiated squamous cells

carcinoma (PDSCC). No association was found between IL-10 c. -592 C>A genotypes and histological grade ($p=0.705$). Also, no statistical significance was observed between histological grade and annual screening cytology or age ($p=0.304$).

Considering the IL-10 c. -592 C>A genotypes and clinical staging of CC, classified by FIGO's criteria, no association was verified ($p=0.963$).

DISCUSSION

CC was more frequent among women with age of 55 years or more, widowed, smokers and with educational level up to elementary school. Widowed status is paired with older age, which correlates with the HPV infection that is described as long-term development, considering that cancer outcome require the development of low squamous intraepithelial lesions (LSIL), progression to high squamous epithelial lesions (HSIL) and posteriorly squamous carcinoma, in general, this progression takes years or decades (MESRI; FEITELSON; MUNGER, 2014).

Our results corroborate previous findings regarding tobacco use and increased odds to develop CC. Over the past 40 years tobacco use has been associated with several types of cancer and higher concentrations of carcinogenic components of tobacco have been found in the cervical mucus of women with CC, such as, nicotine, cotinine (nicotine's metabolite), nitrosamines and benzopyrenes. Considering tumor markers, tumor suppressors molecules (p53 and FHIT) showed lower expression in tumor tissue and cell proliferation markers (Ki-67 and COX-2) showed higher expression among smokers (APPLEBY et al., 2006; SAMIR et al., 2010).

Women who smoke are more likely to be infected by HPV16 and 18 types, which are responsible for 75% of all cervical cancer cases (GUAN et al., 2012). It could be explained by the immunosuppressive condition related to nicotine concentration and diminished humoral response against HPV, since smokers have a lower seroconversion rates (ELDRIDGE et al., 2017; SIMEN-KAPEU et al., 2008). Also, HPV's carcinogenic proteins E6 and E7 are overexpressed in smokers enhancing carcinogenic alterations (MUÑOZ et al., 2018).

CC screening is made by annual/routine gynecological clinical exams, where cervical smear is used to cytopathology analysis (Papanicolaou's exam). It is a simple exam that can detect early alterations in the cervix, diagnosing LSIL and HSIL.

When these lesions are properly diagnosed, treated and closely watched, it is unlikely the progression to cervical cancer (LEES; ERICKSON; HUH, 2016).

World Health Organization (WHO) determines that women who have 25 to 60 years old are required to undergo cytopathology exam annually, the knowledge of the importance of cervical screening is not accessible for all women. Our results correlating the educational level up to elementary school confirm this fact, since higher education is associated with a higher financial income and thus favoring the access to information and health care (INCA, 2016).

In concern with sexual behavior and reproductive characteristics, we observed that women with CC take more oral contraceptive hormonal method, use condom and had more than one pregnancy when compared with control group.

The possible influence of hormones in cancer development is related to the high concentrations of hormones during menstrual cycle (follicular and luteal phase), use of hormonal oral contraceptive method and pregnancies. It has been suggested that progesterone may be the major candidate for tumor growth due to its immunosuppressive role. Progesterone receptor is found in the transformation zone at the ectocervix, where HPV infects immature squamous metaplastic cells and malignant cell transformation starts. In addition, possible epithelial traumas during labor can result in the eversion of the squamous epithelium (ectopy) favoring HPV infection and carcinogenesis (REEVES et al., 2006).

Unlike expected, the use of condom was significant high among cancer group, although it is known, that its use is the standard manner to protect against HPV infection, hence, against CC development. However, HPV is highly contagious and a single contact with the virus can be enough for the transmission. Also, HPV infection has a chronic profile and as the infection is mainly asymptomatic, women can be infected years before any cytological abnormalities show up.

The present study showed association between IL-10 c. -592 C>A polymorphism with CC diagnose in Brazilian population. The heterozygous genotype C/A was independently associated with CC corroborating results from Zoodsma et al., 2005. In their study, 695 CC patients in Dutch population showed risk of developing high squamous intraepithelial lesions (HSIL) and CC associated with the C/A genotype (ZOODSMA et al., 2005).

Singhal et al., 2015, in India, associated heterozygosis (C/A) and homozygosis (A/A) for the variant allele A, with squamous intraepithelial lesions and

CC. They also demonstrated that IL-10 protein serum levels were elevated in CC but did not correlated with the IL-10 c. -592 C>A polymorphism (SINGHAL et al., 2015). On the other hand, Torres-Poveda et al., 2012, in Mexico, showed association with the allele A of the polymorphism with IL-10 protein at serum and mRNA expression in cervical microenvironment in women with SIL (TORRES-POVEDA et al., 2012).

In contrast, Zidi et al., 2015, showed association between CC and the allele A with a eleven fold risk for cancer development, but the polymorphism did not correlated with IL-10 protein level at serum levels (ZIDI et al., 2015). Others studies showed no association between CC and the polymorphism, although some of them had no sample size power and the study was conducted with different ethnicities (BAI et al., 2016; IVANSSON et al., 2007). Therefore, IL-10 c. -592 C>A polymorphism seems to have a different frequency according to the population genetic background.

A recent case-control study with 522 Chinese patients corroborates with our findings, demonstrating higher risk of cancer development associated with the allele A of the polymorphism in the dominant, codominant and recessive models (DU et al., 2019).

As demonstrated in previous studies, the variant allele A of the c. -592 C>A polymorphism enhances promoter function in the *IL-10* gene, possibly due to loss of the DNA-binding transcription factor Sp1 that exerts negative regulation of the *IL-10* promoter, resulting in higher transcription of the IL-10 (CHAGAS et al., 2013b; HOBBS et al., 1998; STEINKE et al., 2014; TORRES-POVEDA et al., 2014; ZAID et al., 2001).

Our group demonstrated previously that IL-10 protein in cervical level were higher between women HPV infected associated with the allele A (BERTI et al., 2017b). Considering this, higher levels of IL-10 in the cervical microenvironment diminishes pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β and TNF- α that are crucial in the immune response for viral clearance, thus, favoring HPV chronic infection. Moreover, IL-10 can suppress costimulatory molecules CD80, CD86, MHC and CTLA-4 resulting in T cell anergy and tumor evasion. Also stimulating anti-apoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-XL) and proteins associated with cell cycle progression, supporting cell immortalization during CC carcinogenesis (COPE et al., 2011; KUBO; MOTOMURA, 2012b; MANNINO et al., 2015a).

All things considered, the strengths of our study include the statistical analyses adjusted for potential confounders. Also the number of control group (n= 146) 1.7 times larger than our cancer group, enhancing our statistical power.

CONCLUSION

Accordingly to our findings, the IL-10 c. -592 C>A polymorphism association with CC in Brazilian population has never been described in the literature until now. The C/A genotype in the co-dominant and dominant model was associated with increased CC diagnose suggesting the association with the allele A presence, confirmed by the allele analysis.

Moreover, considering the incidence and mortality of CC in Brazil, our results demonstrate the need to expand health programs of awareness about CC seriousness and encourage gynecological follow-ups. The design of a susceptibility framework composed by individual features that enhance the risk of cervical cancer risk development along with genetic biomarkers, as IL-10 c. -592C>A polymorphism could be a promising tool for cervical

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge all the partnerships, and all patients that engaged voluntarily, who made this study possible. The Cancer Hospital of Londrina and Erastos Gaertner's Hospital of Curitiba for granting the cancer samples and Justiniano Clímaco da Silva's Basic Health-care Unit for allowing our laboratory members to accompany the gynecology exams. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) and by Londrina State University Graduate Coordination (PROPPG-UEL).

REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2015 Mar 1;65(2):87–108. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.55.2.74>
2. Organization WH. UN Joint Global Programme on Cervical Cancer Prevention and Control. 2016; Available from: <http://www.who.int/ncds/un-task-force/un-joint-action-cervical-cancer-leaflet.pdf>
3. Schiffman M, Castle PEC, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;56370:890–970.
4. Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, Koutsky LA, Garland SM, Leodolter S, et al. Incident Cervical HPV Infections in Young Women: Transition Probabilities for CIN and Infection Clearance. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2011 Feb 1;20(2):287–96. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-10-0791>
5. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, et al. Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2008 Apr 2;100(7):513–7. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djn044>
6. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG V., Castle PE. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in the United States. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2009 Apr 1;101(7):475–87. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djn510>
7. Kessler TA. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2017 May;33(2):172–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2017.02.005>
8. Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. Vol. 18, *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012. p. 807–15.
9. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002;2(5):342–50. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc798>
10. Min Z, Pu X, Gu Z. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Sep 28;16(6):7189–94. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9520>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30546456>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6256322>

11. Bhairavabhotla RK, Verm V, Tongaonkar H, Shastri S, Dinshaw K, Chiplunkar S. Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. *Indian J Biochem Biophys* [Internet]. 2007 Oct;44(5):350–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18341210>
12. Barbisan G, Pérez LO, Contreras A, Golijow CD. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. *Tumor Biol*. 2012;33(5):1549–56.
13. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukine-10 and Related Cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2004;22(1):929–79. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>
14. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2015;367(2):103–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.009>
15. Roh JW, Kim MH, Seo SS, Kim SH, Kim JW, Park NH, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett* [Internet]. 2002 Oct;184(1):57–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383502001933>
16. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson I V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997;24(1):1–8.
17. Steinke JW, Berekzi E, Hagman J, Borish L. Functional Analysis of -571 IL-10 Promoter Polymorphism Reveals a Repressor Element Controlled by Sp1. *J Immunol* [Internet]. 2004 Sep 1;173(5):3215–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322183>
18. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *Jama*. 1991;265(4):472–7.
19. da Silva MC, Martins HPR, de Souza JL, Tognim MCB, Svidzinski TIE, Teixeira JJV, et al. Prevalence of HPV infection and genotypes in women with normal cervical cytology in the state of Paraná, Brazil. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2012 Oct 15;286(4):1015–22. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00404-012-2399-y>
20. Capasso M, Avvisati RA, Piscopo C, Laforgia N, Raimondi F, de Angelis F, et al. Cytokine Gene Polymorphisms in Italian Preterm Infants: Association Between Interleukin-10 -1082 G/A Polymorphism and Respiratory Distress Syndrome. *Pediatr Res* [Internet]. 2007 Mar;61(3):313–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1203/pdr.0b013e318030d108>
21. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014 Mar;15(3):266–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312814000699>
22. Appleby P, Beral V, Berrington De González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma

- of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;118(6):1481–95.
23. Samir R, Asplund A, Tot T, Pekar G, Hellberg D. Tissue tumor marker expression in smokers, including serum cotinine concentrations, in women with cervical intraepithelial neoplasia or normal squamous cervical epithelium. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2010;202(6):579.e1-579.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2009.11.034>
 24. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2012 Nov 15;131(10):2349–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27485>
 25. Eldridge RC, Pawlita M, Wilson L, Castle PE, Waterboer T, Gravitt PE, et al. Smoking and subsequent human papillomavirus infection: a mediation analysis. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2017 Nov;27(11):724-730.e1. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047279717303009>
 26. Simen-Kapeu A, Kataja V, Yliskoski M, Syrjänen K, Dillner J, Koskela P, et al. Smoking impairs human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 capsids antibody response following natural HPV infection. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2008 Jan 8;40(9):745–51. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365540801995360>
 27. Muñoz JP, Carrillo-Beltrán D, Aedo-Aguilera V, Calaf GM, León O, Maldonado E, et al. Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Dec 17;9(December):1–12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.03022/full>
 28. Lees BF, Erickson BK, Huh WK. Cervical cancer screening: evidence behind the guidelines. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Apr;214(4):438–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.10.147>
 29. INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. [Internet]. 2nd ed. 2016. 114 p. Available from: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/control_cancer
 30. Reeves G, Sweetland S, Kjaer S, Painter R, Vessey M, Daling J, et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;119(5):1108–24.
 31. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, Van Der Steege G, De Vries EGE, et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int*

- J Gynecol Cancer. 2005;15(6 SUPPL. 3):282–90.
32. Singhal P, Kumar A, Bharadwaj S, Hussain S, Bharadwaj M. Association of IL-10 GTC haplotype with serum level and HPV infection in the development of cervical carcinoma. *Tumor Biol.* 2015;36(4):2287–98.
 33. Torres-Poveda K, Burguete-Garcia AI, Cruz M, Martinez-Nava GA, Bahena-Roman M, Ortiz-Flores E, et al. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Infect Agent Cancer.* 2012;7(1):32.
 34. Zidi S, Gazouani E, Stayoussef M, Mezlini A, Ahmed SK, Yacoubi-Loueslati B, et al. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms as genetic biomarkers of cervical cancer susceptibility among Tunisians. *Cytokine* [Internet]. 2015 Dec;76(2):343–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.028>
 35. Ivansson EL, Gustavsson IM, Magnusson JJ, Steiner LL, Magnusson PKE, Erlich HA, et al. Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor, but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Dec 1;121(11):2451–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22989>
 36. Bai CY, Shi XY, He J, Xue J, Feng Y. Association between IL-10 genetic variations and cervical cancer susceptibility in a Chinese population. *Genet Mol Res* [Internet]. 2016;15(3):2–7. Available from: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-3/pdf/gmr8116.pdf>
 37. Du GH, Wang JK, Richards JR, Wang JJ. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 are associated with an increased risk of cervical cancer. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2019;66(32):154–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.015>
 38. HOBBS K, NEGRI J, KLINNERT M, ROSENWASSER LJ, BORISH L. Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β Promoter Polymorphisms in Allergies and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 Dec;158(6):1958–62. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.158.6.9804011>
 39. Steinke JW, Berekzi E, Hagman J, Borish L. Functional Analysis of -571 IL-10 Promoter Polymorphism Reveals a Repressor Element Controlled by Sp1. *J Immunol.* 2014;173(5):3215–22.
 40. Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol.* 2014;5(4):753–63.
 41. Chagas BS, Gurgel APAD, da Cruz HLA, Amaral CMM, Cardoso MV, Neto J da CS, et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in

- women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infect Genet Evol.* 2013;19:32–7.
42. Zaid A, Hodny Z, Li R, Nelson BD. Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. *Eur J Biochem.* 2001;268(21):5497–503.
 43. Berti FCB, Pereira APL, Trugilo KP, Cebinelli GCM, Silva LF da RS, Lozovoy MAB, et al. IL-10 gene polymorphism c.-592C>A increases HPV infection susceptibility and influences IL-10 levels in HPV infected women. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2017 Sep;53:128–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.020>
 44. Cope A, Le Friec G, Cardone J, Kemper C. The Th1 life cycle: Molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. *Trends Immunol.* 2011;32(6):278–86.
 45. Kubo M, Motomura Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front Immunol.* 2012;3(AUG):1–9.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- A detecção de DNA-HPV foi realizada em mulheres atendidas nas UBSs Justiniano Clímaco da Silva e Armindo Guazzi. As amostras negativas foram classificadas como grupo controle;
- A genotipagem do polimorfismo c. -592C>A da IL-10 foi realizada em todas as pacientes. Observou-se associação independente do polimorfismo com o CC no modelo de co-dominante, dominante e na frequência alélica ($p < 0,05$).
- Pela regressão logística binária em modelo ajustado, foi determinado o perfil sociodemográfico, de comportamento sexual e características reprodutivas das mulheres participantes, em que a idade igual ou maior a 55 anos, escolaridade até o ensino fundamental, hábito tabagista e uso de contraceptivos orais estiveram independentemente associados com CC;
- O genótipo C/A do polimorfismo no modelo co-dominante apresentou maior frequência no grupo CC (58,8%), com 2,15 vezes mais chances ($OR_{adj} = 2,15$; $IC_{95\%} = 1,02 - 4,56$) de desenvolver CC.
- Na análise dominante dos genótipos C/A + A/A, 71,8% das mulheres se mostraram portadoras do alelo variante A apresentando 2,71 vezes mais chances de desenvolver CC ($OR_{adj} = 2,71$; $IC_{95\%} = 1,05 - 4,47$). A frequência alélica também esteve associada ao CC, com 1,55 vezes mais chances de portadoras de alelo A desenvolverem CC ($OR_{crude} = 1,55$; $IC_{95\%} = 1,05 - 2,29$);

Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora presente no microambiente tumoral. Por apresentar caráter pleiotrópico, seu efeito protetor ou de risco parece ser dependente do modelo inflamatório e do tipo tumoral. Na infecção pelo HPV e em lesões pré-neoplásicas a IL-10 está associada à imunossupressão local, diminuindo o recrutamento de células efectoras, portanto, no CC esse perfil auxilia a evasão e crescimento tumoral.

Polimorfismos em genes de citocinas, responsáveis por orquestrar a resposta imunológica, podem contribuir como marcadores para identificar indivíduos com predisposição ao desenvolvimento de doenças, em especial o câncer. Neste estudo, foi demonstrada a associação do alelo A do polimorfismo rs1800872 da IL-10 (c.-592C>A) com o diagnóstico de CC, possivelmente pelos efeitos descritos anteriormente na literatura com aumento da transcrição de IL-10, consequência da perda do controle negativo sobre a região promotora pela troca da citosina pela adenina no loci 592 do gene da *IL-10* que ocorre neste polimorfismo.

Considerando os dados sociodemográficos, de comportamento sexual e reprodutivo, somados ao genótipo do polimorfismo rs1800872 da IL-10, pode-se traçar um perfil de suscetibilidade para o desenvolvimento de CC. Estes dados poderiam auxiliar a triagem e acompanhamento médico mais eficiente para mulheres que apresentam maior risco, além de contribuir para a implantação de programas de rastreamento que visem o acesso a exames preventivos e conhecimento sobre o CC, visto que no Brasil o CC apresenta altos índices de incidência e mortalidade

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L. DE et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, fev. 2005.
- AMADOR-MOLINA, A. et al. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624–2642, 2013.
- APPLEBY, P. et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 6, p. 1481–1495, 2006.
- ARROYO MÜHR, L. S. et al. Viruses in cancers among the immunosuppressed. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 12, p. 2498–2504, 15 dez. 2017.
- BAI, C. Y. et al. Association between IL-10 genetic variations and cervical cancer susceptibility in a Chinese population. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 2–7, 2016.
- BARBISAN, G. et al. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. **Tumor Biology**, v. 33, n. 5, p. 1549–1556, 2012.
- BAUER, H. M. et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **Jama**, v. 265, n. 4, p. 472–477, 1991.
- BERMUDEZ-MORALES, V. H. et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer investigation**, v. 26, n. 10, p. 1037–43, 2008.
- BERTI, F. C. B. et al. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 34, p. 1–13, abr. 2017a.
- BERTI, F. C. B. et al. IL-10 gene polymorphism c.-592C>A increases HPV infection susceptibility and influences IL-10 levels in HPV infected women. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 128–134, set. 2017b.
- BHAIRAVABHOTLA, R. K. et al. Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 44, n. 5, p. 350–6, out. 2007.
- BIJJIGA, E.; MARTINO, A. T. Interleukin 10 (IL-10) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, p. 1–6, 2011.
- BRAATEN, K. P.; LAUFER, M. R. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. **Reviews in obstetrics & gynecology**, v. 1, n. 1, p. 2–10, 2008.
- BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, medicine, and public health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. NIH Public Access. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 232–243, 2013.

- CAPASSO, M. et al. Cytokine Gene Polymorphisms in Italian Preterm Infants: Association Between Interleukin-10 -1082 G/A Polymorphism and Respiratory Distress Syndrome. **Pediatric Research**, v. 61, n. 3, p. 313–317, mar. 2007.
- CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The male role in cervical cancer. **Salud Publica de Mexico**, v. 45, n. SUPPL. 3, p. 345–353, 2003.
- CHAGAS, B. S. et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 32–37, 2013a.
- CHAGAS, B. S. et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 32–37, 2013b.
- CHOPRA, V.; DINH, T. V; HANNIGAN, E. V. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. **Cancer Invest.**, v. 16, n. 3, p. 152–159, 1998.
- CLERICI, M. et al. Cytokine Production Patterns in Cervical Intraepithelial Neoplasia: Association With Human Papillomavirus Infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 3, p. 245–250, 1997.
- COHEN, P. A. et al. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 393, n. 10167, p. 169–182, 2019.
- COPE, A. et al. The Th1 life cycle: Molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 278–286, 2011.
- DE LIMA, M. A. P.; DA SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 4, p. 565–573, 2013.
- DIZ, M. D. P. E.; MEDEIROS, R. B. DE. Câncer de colo uterino – fatores de risco, prevenção, diagnóstico e tratamento. **Revista de Medicina**, v. 88, n. 1, p. 7–15, 6 mar. 2009.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525–541, 1 maio 2006.
- DU, G. H. et al. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 are associated with an increased risk of cervical cancer. **International Immunopharmacology**, v. 66, n. 32, p. 154–161, 2019.
- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 329–360, abr. 2004.
- ELDRIDGE, R. C. et al. Smoking and subsequent human papillomavirus infection: a mediation analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 27, n. 11, p. 724- 730.e1, nov. 2017.
- EMMERICH, J. et al. IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8+ T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. **Cancer Research**, v. 72, n. 14, p. 3570–3581, 15 jul. 2012.
- ESKDALE, J. et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9465–70, 1998.
- FERLAY, J. et al. Reprint of: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 9, p. 1201–

1202, 2015.

FIORANELLI, M.; ROCCIA, M. G. Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses administration to low dose medicine new paradigm. **Journal of Integrative Cardiology**, v. 1, n. 1, p. 2–6, 2014.

FIorentino, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081–95, 1989.

FUCHS, A. C. et al. Clinical, hematologic, and immunologic effects of interleukin-10 in humans. **Journal of Clinical Immunology**, v. 16, n. 5, p. 291–303, 1996.

GIANNINI, S. L. et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. **Clinical and experimental immunology**, v. 113, n. 2, p. 183–9, ago. 1998.

GUAN, P. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 10, p. 2349–2359, 15 nov. 2012.

HEARD, I. et al. Characteristics of HPV infection over time in European women who are HIV-1 positive. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 120, n. 1, p. 41–49, jan. 2013.

HERRERO, C. et al. Reprogramming of IL-10 Activity and Signaling by IFN-. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5034–5041, 15 nov. 2003.

HOBBS, K. et al. Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β Promoter Polymorphisms in Allergies and Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 6, p. 1958–1962, dez. 1998.

INCA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2. ed. [s.l: s.n.].

INSINGA, R. P. et al. Incident Cervical HPV Infections in Young Women: Transition Probabilities for CIN and Infection Clearance. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 2, p. 287–296, 1 fev. 2011.

IVANSSON, E. L. et al. Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor, but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2451–2457, 1 dez. 2007.

KESSLER, T. A. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 33, n. 2, p. 172–183, maio 2017.

KIM, J. M. et al. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 148, n. 11, p. 3618–23, 1 jun. 1992.

KONG, Y. et al. Cervical cancer in women aged 25 years or younger: a retrospective study. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 2051–2058, mar. 2019.

KRISHNAPPA, P. et al. Expression of P16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. **Diagnostic Pathology**, v. 9, n. 1, p. 202, 1 dez. 2014.

KUBO, M.; MOTOMURA, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory

- cytokine IL-10 in acquired immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–9, 2012a.
- KUBO, M.; MOTOMURA, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–9, 2012b.
- KÜHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263–274, out. 1993.
- LANDONI, F. et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. **Lancet**, v. 350, n. 9077, p. 535–540, 1997.
- LEES, B. F.; ERICKSON, B. K.; HUH, W. K. Cervical cancer screening: evidence behind the guidelines. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 4, p. 438–443, abr. 2016.
- LI, W. et al. The physical state of HPV16 infection and its clinical signi W cance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, p. 1355–1361, 2008.
- MANAMELA, P. K. et al. Low- grade squamous intraepithelial lesions among women with HIV. **International Federation of Gynecology and Obstetrics**, v. 1, n. November 2017, p. 1–6, 2018.
- MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103–107, 2015a.
- MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103–107, 2015b.
- MESRI, E. A.; FEITELSON, M. A.; MUNGER, K. Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 3, p. 266–282, mar. 2014.
- MIN, Z.; PU, X.; GU, Z. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection. **Oncology Letters**, v. 16, n. 6, p. 7189–7194, 28 set. 2018.
- MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins : pathways to transformation. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.
- MOORE, P. S.; CHANG, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 12, p. 878–889, 24 dez. 2010.
- MOSCICKI, A. et al. Chapter 5 : Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 3, p. 42–51, 2006.
- MOSMANN, J. P. et al. Mutation Detection of E6 and LCR Genes from HPV 16 Associated with Carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 1151–1157, 2015.
- MUMM, J. B.; OFT, M. Pegylated IL-10 induces cancer immunity. **BioEssays**, v. 35, n. 7, p. 623–631, jul. 2013.
- MUÑOZ, J. P. et al. Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. December, p. 1–12, 17 dez. 2018.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap test and Bethesda 2014. **Cancer**

Cytopathology, v. 123, n. 5, p. 271–281, maio 2015.

O’GARRA, A. et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 114–131, 2008.

OKUYAMA, N. C. M. et al. Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 69, 18 dez. 2018.

OSTLIE, N. S. et al. Transgenic Expression of IL-10 in T Cells Facilitates Development of Experimental Myasthenia Gravis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 4853–4862, 15 abr. 2001.

PARK, J. W. et al. in Repair of DNA Damage. **Radiother Oncology**, v. 113, n. 3, p. 337–344, 2014.

PESTKA, S. et al. Interleukine-10 and Related Cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 929–979, 2004.

PRETE, G. DEL et al. by (Th1). v. 150, n. 2, p. 353–360, 1993.

RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV’s 16 and 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 70, p. 103–110, 2015.

REEVES, G. et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1108–1124, 2006.

REICH, K. et al. Response of psoriasis to interleukin-10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 2, p. 319–329, 2001.

RODRIGUEZ, A. C. et al. Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 7, p. 513–517, 2 abr. 2008.

ROH, J. W. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. **Cancer Letters**, v. 184, n. 1, p. 57–63, out. 2002.

SAMIR, R. et al. Tissue tumor marker expression in smokers, including serum cotinine concentrations, in women with cervical intraepithelial neoplasia or normal squamous cervical epithelium. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, n. 6, p. 579.e1-579.e7, 2010.

SANO, T. et al. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. **Pathology International**, v. 48, n. 8, p. 580–585, ago. 1998.

SANTIN, A. D. et al. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. **J Virol**, v. 74, n. 10, p. 4729–4737, 2000.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. **Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer** **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2012.

- SASLOW, D. et al. Screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 62, n. 3, p. 147–172, 2013.
- SCHIFFMAN, M. et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, v. 337, n. 1, p. 76–84, 2005.
- SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 56370, p. 890–970, 2007.
- SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016a.
- SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16086, 1 dez. 2016b.
- SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. Cervical-Cancer Screening with Human Papillomavirus and Cytologic Cotesting. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 24, p. 2324–2331, 12 dez. 2013.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.
- SIMEN-KAPEU, A. et al. Smoking impairs human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 capsids antibody response following natural HPV infection. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 745–751, 8 jan. 2008.
- SINGHAL, P. et al. Association of IL-10 GTC haplotype with serum level and HPV infection in the development of cervical carcinoma. **Tumor Biology**, v. 36, n. 4, p. 2287–2298, 2015.
- SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. **Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 16, p. 2114–2119, 2002.
- SOUTO, R. ET AL. O Papilomavírus Humano : um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155–160, 2005.
- STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.
- STEINKE, J. W. et al. Functional Analysis of –571 IL-10 Promoter Polymorphism Reveals a Repressor Element Controlled by Sp1. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3215–3222, 1 set. 2004.
- STEINKE, J. W. et al. Functional Analysis of –571 IL-10 Promoter Polymorphism Reveals a Repressor Element Controlled by Sp1. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3215–3222, 2014.
- SUNG, W.-W.; LEE, H. The role of interleukin-10 in the progression of human papillomavirus-associated lung carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 9, p. e25854, 2013.
- SYRJÄNEN, S. et al. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Archiv**, v. 455, n. 6, p. 505–515, 2009.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 1 mar. 2015.

- TORRES-POVEDA, K. et al. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. **Infectious agents and cancer**, v. 7, n. 1, p. 32, 2012.
- TORRES-POVEDA, K. et al. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 4, p. 753–63, 2014.
- TURNER, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 1997.
- UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER (UICC). **Classificação de Tumores Malignos**. [s.l: s.n.].
- VILLIERS, E. DE et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17–27, 2004.
- VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185–S198, dez. 2015.
- WALLACE, N. A.; GALLOWAY, D. A. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 403–423, 2015.
- WHEELER, C. M. et al. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in the United States. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 7, p. 475–487, 1 abr. 2009.
- WOODMAN, C. . et al. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. January, p. 11–22, 2007.
- YOU, D. et al. Association of Foxp3 promoter polymorphisms with susceptibility to endometrial cancer in the Chinese Han women. **Medicine**, v. 97, n. 18, p. e0582, 2018.
- YU, X.-M.; WANG, X.-F. The in vitro proliferation and cytokine production of V α 24+V β 11+ natural killer T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Chinese medical journal**, v. 124, n. 1, p. 61–5, jan. 2011.
- ZAID, A. et al. Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5497–5503, 2001.
- ZIDI, S. et al. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms as genetic biomarkers of cervical cancer susceptibility among Tunisians. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 343–347, dez. 2015.
- ZOODSMA, M. et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 6 SUPPL. 3, p. 282–290, 2005.
- ZSEMLYE, M. High-Grade Cervical Dysplasia: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 615–621, 2008.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“TGFB: possível marcador molecular de susceptibilidade para progressão das lesões cervicais induzidas pelo Papilomavírus Humano (HPV)”

Prezada Senhora:

Gostaríamos de convidá-la para participar da pesquisa “TGFB: possível marcador molecular de susceptibilidade para progressão das lesões cervicais induzidas pelo Papilomavírus Humano (HPV)”, a ser realizada “no Laboratório de genética molecular e Imunologia da UEL”. O objetivo da pesquisa é “detectar a presença do vírus HPV, que pode causar câncer de colo de útero, em amostra ginecológica, e também avaliar possíveis variações genéticas no sistema imune das mulheres que podem favorecer a infecção e o desenvolvimento de lesões de colo de útero”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: 1) você responderá a um questionário sobre dados como idade, escolaridade, renda familiar, hábito tabagista, idade da primeira menstruação e da primeira relação sexual, número de gestações e partos, entre outros; 2) você doará o material ginecológico que seria descartado após a confecção da lâmina do exame de Papanicolau (caso você esteja em consulta na UBS) ou material ginecológico restante das análises patológicas (caso você esteja em consulta no Hospital do Câncer de Londrina); 3) doará 5mL de sangue periférico, que serão coletados por equipe capacitada; 4) permitirá a consulta de dados de seu prontuário médico para análise de resultados de exames prévios.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que **suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e para pesquisas futuras** e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os materiais biológicos serão armazenados no laboratório de genética molecular e imunologia da UEL, e serão mantidos codificados, de modo a não permitir a sua identificação, e serão armazenados por 10 anos para a realização desta pesquisa e de pesquisas futuras, que serão submetidas ao comitê de ética em pesquisa antes de sua realização.

Esclarecemos ainda, que você não pagará e nem será remunerada por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os **benefícios** esperados são realização da detecção do vírus HPV e sua tipagem, por meio de metodologia sensível e específica, que permite diagnóstico precoce da infecção. E como benefícios indiretos espera-se contribuir para um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesões provocadas pelo HPV, contribuindo assim para a elaboração de medidas e protocolos médicos que poderiam vir a ser utilizados, na prática clínica, como marcadores moleculares de susceptibilidade para a infecção pelo HPV e também para o desenvolvimento de lesões de colo de útero.

Quanto aos **riscos** desta pesquisa são mínimos, pois os únicos procedimentos extras aos quais você será submetida são: 1) a realização de questionário sociodemográfico, que será aplicado em local reservado, a fim de garantir a sua privacidade e você poderá se recusar a responder as perguntas caso não se sinta confortável; 2) a realização de coleta de sangue que poderá gerar algum desconforto, dor, hematoma no local, e raramente desmaios, contudo serão realizadas por profissionais capacitados a fim de minimizar estes possíveis riscos, e serão realizadas nas UBSs ou no HCL, em sala apropriada. Em relação à coleta de material ginecológico, não há riscos diretos da participação nesta pesquisa, tendo em vista que você já seria submetida aos procedimentos descritos, para seu diagnóstico e tratamento, independentemente de sua participação neste estudo. Contudo caso ocorra algum tipo de desconforto você será prontamente atendida e amparada por mim (pesquisadora responsável) e / ou pela equipe de trabalho deste projeto.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar Karen Brajão de Oliveira (Rua dos Coqueiros, 555, apto 103, Telefone (43) 3371-5728/ (43) 3336-9948/ (43) 9955-5566), karen.brajao@uel.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 201__.

Pesquisador Responsável

RG: _____

(NOME POR EXTENSO DO SUJEITO DE PESQUISA), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

*Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado, atendendo, conforme normas da Resolução 466/2012 de 12 de dezembro de 2012.

APÊNDICE B

Questionário Sociodemográfico de Comportamento Sexual e de Características Reprodutivas

Nº LAB

QUESTIONÁRIO SOCIO-EPIDEMIOLÓGICO

Data: ___/___/___

Reg. Nº (ID) _____

Telefone: _____

E-mail: _____

A) Conhece o HPV?

- 1- () Não, nunca ouvi falar
 2- () Ouvi falar, mas não sei o que é
 3- () Sim, conheço

B) Conhece as formas de transmissão do vírus?

- 1- () Não 2- () Sim

C) Se sim, qual ou quais as formas de transmissão?

- 1- () Relação sexual 2- () Sanguínea
 3- () Contato roupas e objetos 4- () Outros
 5- () NA (não se aplica)

D) Idade _____ anos, DN ___/___/___

E) Qual sua etnia?

- 1- () Branca 2- () Parda 3- () Negra
 4- () Asiática 5- () Indígena

F) Você fuma?

- 1- () Não 2- () Sim: Idade de início: _____ anos
 Nº de cigarros por dia: _____
 3- () Ex-fumante (abandonou o cigarro há ≥ 6 meses)
 Idade de início: _____ anos
 Nº de cigarros por dia: _____

G) Faz uso de bebida alcoólica?

- 1- () Abstinente (menos de 1x/ano ou nunca bebeu)
 2- () Raramente (menos de 1x/mês)
 3- () Ocasional (1-3x/mês)
 4- () Frequente (1-4x/semana)
 5- () Muito Frequente (todos os dias)

H) Qual o seu grau de escolaridade?

- 1- () Até fundamental Incompleto
 2- () Fundamental Completo
 3- () Médio Incompleto 4- () Médio completo
 5- () Superior incompleto 6- () Sup. completo

I) Estado Civil:

- 1- () Casada/ união estável
 2- () Solteira (nunca viveu com alguém)
 3- () Divorciada/ separada
 4- () Viúva

J) Sua renda mensal familiar (em salário mínimo) é de?

- 1- () Até 1 Salário 2- () De 1 à 3 salários
 3- () De 3 à 5 salários 4- () De 5 à 7 salários
 5- () De 7 à 10 salários //// Renda Própria¹: _____

K) Faz o uso de anticoncepcional?

- 1- () Não 2- () Sim Qual: _____

L) Faz Terapia de Reposição hormonal (TRH)?

- 1 () Não 2- () Sim Qual medicamento: _____

M) Faz uso de preservativo em todas as relações sexuais?

- 1- () Não 2- () Sim

N) Número de Gestações²: _____

O) Número de partos normais: _____

P) Número de cesáreas: _____

Q) Número de abortos: _____

R) Idade da 1ª menstruação: _____ anos

S) Idade da 1ª relação sexual: _____ anos

T) Número de parceiros sexuais durante a vida: _____

U) Número de parceiros sexuais nos últimos 6 meses: _____

V) Quando realizou o último exame preventivo?

- 1- () Nunca
 2- () Há menos de 1 ano
 3- () Há 1 ano ou mais, mas menos de 2 anos
 4- () Há 2 anos ou mais, mas menos de 3 anos
 5- () Há 3 anos ou mais

W) Existem casos de câncer de colo de útero em sua família (parentes consanguíneos)?

- 1- () Não 2- () Sim

X) Em caso de resposta "SIM" qual o grau de parentesco?

- 1- () 1º grau (mãe ou filha)
 2- () 2º grau (irmã, avó ou neta)
 3- () 3º grau (tia, sobrinha, bisavó ou bisneta)
 4- () 4º grau (prima, tia-avó, neta de irmão(ã) ou trineta)
 5- () NA (não se aplica)

Y) Peso: _____ Kg

Z) Altura: _____ m

AA)IMC: _____

BB)Circunferência abdominal: _____ cm

CC)Faz algum outro tratamento para outra doença?

Qual? _____

DD)Medicação utilizada: _____

Pesquisador: _____

¹Em renda própria, anotar apenas o número da categoria que corresponde ao intervalo que contenha a resposta da entrevistada.

²Se Número de Gestações for igual a zero, responder NA (não se aplica) para: O) Número de partos normais, P) Número de cesáreas e Q) Número de abortos.

ANEXO A

Autorização Do Comitê De Ética Em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	133/2012
CAAE:	05505912.0.0000.5231
Processo:	19275/2012
Pesquisador(a):	Karen Brajão de Oliveira
Unidade/Órgão:	CCB – Departamento de Ciências Patológicas

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"PREVALÊNCIA E GENOTIPAGEM DE HPV E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM OS GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES EM NÍVEL DE DNA, RNA E PROTEÍNA: implicações no microambiente tumoral."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.

Londrina, 28 de agosto de 2012.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

Prof.ª Dr.ª Paula Mariza Zedu Alliprandini
Vice-Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina