



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIANO MARTIN FELIS ARANOME

**FATORES EXTERNOS E POLIMORFISMOS EM GENES
RELACIONADOS COM A IMUNOSSUPRESSÃO
ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER
CERVICAL**

Londrina
2018

ADRIANO MARTIN FELIS ARANOME

**FATORES EXTERNOS E POLIMORFISMOS EM GENES
RELACIONADOS COM A IMUNOSSUPRESSÃO
ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER
CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Aranome, Adriano Martin Felis.

Fatores externos e polimorfismos em genes relacionados com a imunossupressão envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical / Adriano Martin Felis Aranome. - Londrina, 2018.
74 f. : il.

Orientador: Karen Brajão de Oliveira.

Coorientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Colo uterino - Câncer - Tese. 2. Polimorfismo (Genética) - Tese. 3. Imunologia - Tese. 4. Vírus do papiloma - Tese. I. Oliveira, Karen Brajão de. II. Watanabe, Maria Angelica Ehara. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

ADRIANO MARTIN FELIS ARANOME

**FATORES EXTERNOS E POLIMORFISMOS EM GENES
RELACIONADOS COM A IMUNOSSUPRESSÃO ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Karen Brajão de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Carolina Batista Ariza
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Londrina, 9 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Karen Brajão de Oliveira, por toda dedicação, orientação, disponibilidade e parceria para que este projeto se concretizasse. Agradeço por ter me acolhido como seu aluno, sempre me orientando mesmo quando em licença maternidade com muito êxito. Obrigado por ser um exemplo de profissionalismo, ética e responsabilidade, o que a torna uma referência para a vida toda.

À Prof^a Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe pela co-orientação, apoio, dicas essenciais na solução de problemas encontrados no desenvolvimento experimental e fornecimento de reagentes específicos.

Às Prof^{as} Dr^a Carolina Batista Ariza e Dr^a Bruna Karina Banin Hirata por aceitarem o pedido de comporem tanto esta banca de defesa de mestrado como também a de qualificação e por todo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional.

À Capes, CNPq, Fundação Araucária, e a PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro deste estudo.

Aos Centros de Saúde Municipal Dr. Justiniano Clímaco da Silva (UBS Vivi Xavier) e Dr. Paulo Roberto Moita da Silva (UBS Armino Guazzi), Hospital do Câncer de Londrina, Hospital Universitário, Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema (CISMEPAR), Ambulatório Hospital de Clínicas (AHC) e Laboratório MicroPar, pelo auxílio na obtenção das amostras.

Às mulheres que aceitaram participar desta pesquisa, contribuindo com a doação de amostras e informações pessoais viabilizando a realização deste trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia e ao técnico Nilson de Jesus Carlos pelo apoio e fortalecimento do nosso grupo de pesquisa.

Ao meu pai e avó materna, mas principalmente minha mãe que apesar de não ter acompanhado minha formação, presente fisicamente, tenho certeza que esteve sempre comigo, sou eternamente grato pelos cuidados e educação que me forneceu, sem seus ensinamentos com certeza não seria nada e nem estaria finalizando mais uma etapa em minha vida, sendo persistente em todos os momentos de dificuldades, assim como ela foi.

ARANOME, Adriano Martin Felis. **Fatores externos e polimorfismos em genes relacionados com a imunossupressão envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical.** 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O câncer cervical está entre os cânceres mais frequentes em mulheres no mundo todo, e em alguns países em desenvolvimento chega a ser a maior causa de morte por câncer na população feminina. O sistema imunológico é fundamental tanto na resolução quanto no desenvolvimento de lesões pré-malignas e subsequentemente no câncer cervical. Proteínas relacionadas à imunossupressão são fundamentais para a não exacerbação da resposta inflamatória e na contenção de possíveis danos, entretanto, um microambiente com baixa inflamação está frequentemente relacionado a um pior prognóstico, favorecendo o desenvolvimento do câncer do colo do útero. A citocina fator de transformação do crescimento beta (TGFB) e o fator de transcrição *Forkhead box P3* (FOXP3) são elementos fundamentais na regulação imunológica. Considerando que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem alterar a expressão da proteína, bem como sua eficiência, nosso objetivo foi avaliar os polimorfismos *TGFB1* rs1800470 e rs1800471, como rs3087465 no gene *TGFB2* e o rs3761548 no *FOXP3*, além de dados sociodemográficos, de características reprodutivas e comportamento sexual com o desenvolvimento do câncer do colo do útero. Para isso, coletamos amostras do tumor do colo uterino de 49 mulheres com câncer cervical atendidas pelo Hospital de Câncer de Londrina e 107 controles livres de lesão cervical nas Unidades Básicas de Saúde de Londrina. A detecção do HPV foi realizada por PCR, genotipagem dos polimorfismos por PCR-RFLP, características sociodemográficas e dados clínicos foram obtidos através de prontuários e um questionário estruturado. Modelos de regressão logística ajustados para possíveis fatores confundidores foram utilizados para análise de associação e suscetibilidade, apresentando valores ajustados de *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Verificou-se que ter 4 ou mais parceiros sexuais durante a vida foi associado a estágios avançados da doença ($p = 0,014$). O não conhecimento sobre o HPV ($p = 0,023$) e suas formas de transmissão ($p < 0,01$), renda familiar de no máximo 1 salário mínimo ($p < 0,01$), ausência ou baixa escolaridade ($p < 0,01$), tabagismo ($p < 0,01$), ausência de outros testes preventivos no passado ($p = 0,026$), número de gestações ($p = 0,017$), número de partos vaginais ($p = 0,002$), nenhum parceiro sexual nos últimos 6 meses ($p = 0,014$) estão relacionados com o desenvolvimento do câncer cervical. Para os polimorfismos, foram independentemente associados ao desenvolvimento do câncer cervical, o genótipo AA ($OR = 3,461$ e $IC95\% = 1,136 - 10,540$; $p = 0,029$) do polimorfismo do *FOXP3* rs3761548, o genótipo AG ($OR = 8,093$ e $IC95\% = 1,272 - 51,472$; $p = 0,027$) e GG ($OR = 10,753$ e $IC95\% = 1,589 - 72,762$; $p = 0,015$) do polimorfismo do *TGFB2* rs3087465. Enquanto que o genótipo CT ($OR = 0,133$ e $IC95\% = 0,031 - 0,576$; $p = 0,007$) e TT ($OR = 0,243$ e $IC95\% = 0,062 - 0,953$; $p = 0,043$) nos modelos codominante e dominante ($OR = 0,186$ e $IC95\% = 0,052 - 0,659$; $p = 0,009$) para o polimorfismo rs1800470 de *TGFB* foram relacionados à proteção contra o desenvolvimento do câncer cervical. Nossos dados demonstram que SNPs em regiões de regulação do sistema imune podem ser utilizados como marcadores de suscetibilidade ao câncer cervical.

Palavras-chave: Marcador de suscetibilidade. rs3761548. rs3087465. rs1800470. rs1800471.

ARANOME, Adriano Martin Felis. **External factors and polymorphisms in genes related to immunosuppression involved in the cervical cancer development.** 2018. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Cervical cancer is among the most frequent cancer in women worldwide. In some developing countries it is the largest cause of cancer death in the female population. The immune system is important in both resolution and development of pre-malignant lesions and subsequently cervical cancer. Immunosuppressive-related proteins are fundamental for the non-exacerbation of the inflammatory response and contain possible damages, however, a microenvironment with low inflammation is often related to a worse prognosis, favoring the development of cervical cancer. The cytokine Transforming growth factor beta (TGFB) and Forkhead box P3 (FOXP3) transcription factor are fundamental elements in immune regulation. Considering that single nucleotide polymorphisms (SNPs) may alter the protein expression, as well as its effectiveness, our objective was to evaluate the *TGFB1* polymorphisms rs1800470 and rs1800471, as rs3087465 in the *TGFBR2* gene and the rs3761548 in the *FOXP3*, besides sociodemographic, reproductive and sexual behavior with the development of cervical cancer. For this purpose, we collected samples from the uterine cervix tumor of 49 women with cervical cancer attending the Londrina Cancer Hospital and 107 with no cervical lesion controls from the Basic Health Units of Londrina. HPV detection was performed by PCR, polymorphisms genotyping by PCR-RFLP, socio-demographic characteristics and clinical data were obtained through medical records and a structured questionnaire. Logistic regression models adjusted for possible confounders factors were used for association and susceptibility analysis, presenting adjusted Odds Ratio values with a 95% confidence interval. The significance level adopted was $p < 0.05$. It was observed that having 4 or more sexual partners during lifetime was associated with advanced stages of the disease ($p = 0.014$). The non-knowledge about HPV ($p = 0.023$) and their forms of transmission ($p < 0.01$), family income of at most 1 minimum wage ($p < 0.01$), absence or low schooling ($p < 0.01$), smoking habit ($p < 0.01$), absence of other preventive tests in the past ($p = 0.026$), the number of pregnancies ($p = 0.017$), number of vaginal birth ($p = 0.002$), no sexual partner in the past 6 months ($p = 0.014$) are related to the cervical cancer development. Analyzing the influence of the polymorphisms in the cervical cancer development, it was observed that the AA genotype (OR=3.461 and CI95%=1.136 – 10.540; $p = 0.029$) of the *FOXP3* polymorphism rs3761548, the genotype AG (OR=8.093 and CI95%=1.272 – 51.472; $p = 0.027$) and GG (OR=10.753 and CI95%=1.589 – 72.762; $p = 0.015$) on *TGFBR2* polymorphism rs3087465 were independently associated to cervical cancer development. While the genotype CT (OR=0.133 and CI95%=0.031 – 0.576; $p = 0.007$) and TT (OR= 0.243 and CI95%=0.062 – 0.953; $p = 0.043$) in the codominant and in the dominant model (OR=0.186 and CI95%=0.052 – 0.659; $p = 0.009$) for the polymorphism rs1800470 were related to protection against the development of cervical cancer. Our results suggest that SNPs in regions of immune system regulation can be used as markers of susceptibility to cervical cancer.

Keywords: Susceptibility marker. rs3761548. rs3087465. rs1800470. rs1800471.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1	Estadiamentos do Câncer Cervical (FIGO).....	19
Figura 1	Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV).....	21
Figura 2	Resposta imune das células T reguladoras no ambiente tumoral	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácido
ATP	Adenosina trifosfato
BAK1	BCL2 antagonist/killer 1
BMP	Bone morphogenetic protein
CDK1	Quinase dependente de ciclina 1
CDK2	Quinase dependente de ciclina 2
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
CDKN1B	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Fator de transcrição E2F
ERBB	Epidermal growth factor receptor
ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERK	Extracellular regulated MAP kinase
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria
FKH	Forkhead
FOXP3	Forkhead box P3
GDF5	Growth differentiation factor 5
HPV	Papilomavírus humano
IPEX	Desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X
IRF1	Interferon regulatory factor 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
KDa	Kilodalton
LAP	Latency-associated protein
LCR	Região longa de controle
LLC	Large Latent Complex
LTBP	Latent transforming growth factor beta binding proteins
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Mtor	Mechanistic target of rapamycin complex

MYB	MYB proto-oncogene, transcription fator
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
NFKB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer cell
ORFs	Open reading frames
p53	Tumor protein p53
PAR6A	Par-6 family cell polarity regulator alpha
Pb	Pares de bases
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit
alpha	
pRb	Proteína do retinoblastoma
PVs	Papilomavírus
R-SMAD	Receptor-bound SMADs
RHOA	Ras homolog family member A
SMAD	Small mothers against decapentaplegic proteins
SMAD2	SMAD family member 2
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP1	Sp1 transcription fator
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
TCF3	Transcription factor 3
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGFB1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TGFB	Fator de transformação do crescimento beta
TGFBR1	Transforming growth factor beta receptor 1
TGFBR2	Transforming growth factor beta receptor 2
TGIF1	TGFB induced factor homeobox 1
TLR9	Toll like receptor 9
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
URR	Upstream regulatory region
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	PAPILOMAVÍRUS (PVs)	13
2.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	13
2.2	PROTEÍNAS VIRAIS	15
3	CÂNCER CERVICAL	18
3.1	FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL	19
4	INFECÇÃO PELO HPV E SISTEMA IMUNOLÓGICO	21
5	FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO BETA (TGFB)	26
6	FORKHEAD BOX P3 (FOXP3)	30
7	POLIMORFISMO GENÉTICOS	32
7.1	POLIMORFISMOS RS1800470 E RS1800471 NO GENE <i>TGFB1</i>	32
7.2	POLIMORFISMO RS3087465 NO GENE <i>TGFBR2</i>	33
7.3	POLIMORFISMO RS3761548 NO GENE <i>FOXP3</i>	34
8	OBJETIVOS	35
8.1	OBJETIVO GERAL	35
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
9	ARTIGO CIENTÍFICO	36
10	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

APÊNDICES	70
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	71
APÊNDICE B - Questionário SócioEpidemiológico	72
ANEXO	73
ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL	74

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o terceiro câncer mais frequente na população feminina brasileira, sendo estimado cerca de 16.370 novos casos para cada ano do biênio de 2018 e 2019 (BRASIL, 2017). E em alguns países em desenvolvimento chega a ser a principal causa de morte por câncer na população feminina (LUCIANI et al., 2013).

Apesar de o câncer cervical ser uma doença de etiologia heterogênea, tem como principal fator para o seu desenvolvimento a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), contudo, outros fatores como o sistema imune, fatores genéticos e hábitos de vida como tabagismo, comportamentos sexuais, entre outros, contribuem para o desenvolvimento do câncer (BOSCH; MUÑOZ, 2002; TINDLE, 2002). Possui um desenvolvimento geralmente lento, com média de 10 anos entre lesões pré-malignas até o aparecimento do câncer cervical (SCHIFFMAN; KJAER, 2003), e apenas 10% das infecções pelo HPV que persistem por mais de 2 anos se evoluem para lesões pré-malignas; o restante, devido a fatores genéticos e ao sistema imune eficiente da paciente, conta com a eliminação da infecção e o não desenvolvimento da doença (MOORE et al., 2012; SCHIFFMAN et al., 2007). O oposto ocorre em pacientes imunossuprimidas, quando a diminuição de citocinas inflamatórias, durante a replicação viral, na montagem e liberação de partículas virais, atrasa a resposta imune contra a infecção, resultando em aumento da persistência da infecção, propiciando posteriormente o desenvolvimento do câncer cervical (STANLEY, 2006).

Esta inflamação além de estar relacionada com a infecção viral, sem dúvidas possui papel fundamental, tanto na tumorigênese, como também no combate às células tumorais. Sendo assim, frequentemente usada na descoberta de novos alvos para o tratamento do câncer, como na busca de biomarcadores inflamatórios que indiquem um prognóstico da doença (CRUSZ; BALKWILL, 2015).

Uma citocina importante no microambiente inflamatório é o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGFB1), que em condição normal, resulta principalmente em imunoregulação e expressão de várias proteínas supressoras de tumores. Porém frente uma infecção por HPV, passa a contribuir também com o desenvolvimento tumoral e angiogênese (FREITAS et al., 2017).

A via do TGFB1 também pode estar relacionada com o aumento da expressão do fator de transcrição *forkhead box P3* (FOXP3) (TONE et al., 2008), o qual é responsável pelo desenvolvimento e funcionalidade de células imunossupressoras, fundamentais para o equilíbrio da resposta imune (BANDUKWALA et al., 2011).

Outro fator importante no contexto da doença é a influência de polimorfismos genéticos, os quais podem estar relacionados tanto com o desenvolvimento, como também com a proteção contra o câncer cervical (GUO et al., 2018).

Polimorfismos genéticos tanto em regiões não codificantes como em regiões codificantes podem levar a alterações na expressão, como também na estrutura da proteína formada (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Assim, polimorfismos em genes associados ao sistema imune como no gene *TGFB1* (TAUBENSCHUSS et al., 2013; WOOD et al., 2000), em seu receptor *Transforming growth factor beta receptor 2* (*TGFBR2*) (SEIJO et al., 2001) e no fator de transcrição *FOXP3* (SHEN et al., 2010) podem levar a alterações em sua expressão ou funcionalidade. Entretanto pouco se sabe sobre o papel destes polimorfismos no câncer cervical.

2 PAPILOMAVÍRUS (PVs)

Os Papilomavírus (PVs) não possuem uma ordem estabelecida em sua classificação. Porém, com um conjunto de informações morfológicas, de composição genética e organizações de sequências de aminoácidos (aa), foi estabelecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus a inclusão dos PVs à família mais extensa de vírus conhecida, denominada *Papillomaviridae* (ARALDI et al., 2017).

Estes vírions medem cerca de 55 nm, com um capsídeo de formato icosaédrico composto por 72 capsômeros e não possuem envelope lipídico. O material genético corresponde a aproximadamente 10% de seu peso total e é constituído por uma única molécula de DNA circular, com tamanho entre 6800 e 8400 pares de bases, contendo de 40% a 60% de guanina e citosina. Além disso, possui até 10 *Open reading frames* (ORFs), com potencial de codificar de 8 a 10 proteínas com tamanhos de 7-73 kDa, classificadas em proteínas de fase precoce e tardia (HAUSEN, 2009).

Membros desta família possuem tropismo por tecido epitelial em diferenciação (CAMPO, 2002), e tem propensão por infectar junções em diferentes tipos de epitélios. Entretanto, necessitam de uma microfissura na epiderme para que o mesmo possa alcançar células basais (DOORBAR et al., 2012). Também já foi demonstrado a presença de PVs em sangue periférico e sugerido a capacidade destes infectarem e utilizarem linfócitos como sítios de latência (CHEN et al., 2009; DINIZ et al., 2009).

A infecção por PVs pode ocorrer tanto em epitélios de mamíferos como também de aves e répteis (BERNARD et al., 2010; BRAVO; DE SANJOSE; GOTTSCHLING, 2010; HERBST-KRALOVETZ et al., 2008). Apesar de possuírem características de infecções espécie-específicas, já foram relatados casos de infecções cruzadas do mesmos PVs em diferentes espécies de hospedeiros, com potencial de formação tumoral em ambos (NASIR; CAMPO, 2008).

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os PVs que possuem capacidade de infectar humanos são denominados de Papilomavírus humano (HPV), o qual possui mais de 200 tipos

identificados atualmente (BERNARD et al., 2010; BOLATTI et al., 2017; CHOUHY et al., 2013).

Os HPVs são classificados taxonomicamente de acordo com sua homologia genética, e distribuídos em cinco grandes gêneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mu papillomavirus* e *Nu papillomavirus* (DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR et al., 2012).

O HPV pode infectar tecidos de revestimento como pele e mucosas. É considerado o vírus mais prevalente entre as doenças sexualmente transmissíveis em todo o mundo e ocorre principalmente no trato urogenital tanto de homens como de mulheres. Geralmente não apresentam manifestações clínicas como é o caso de muitos membros dos gêneros *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, ao ponto que os *Alphapapillomavirus* são considerados mais agressivos pela sua capacidade de escape do sistema imunológico hospedeiro (DOORBAR et al., 2012).

Ao infectarem o epitélio das mucosas, estes vírus podem se manifestar de diferentes formas em seu hospedeiro, desde infecções assintomáticas e verrugas até o desenvolvimento tumoral, por favorecerem um acúmulo de mutações no tecido infectado. Embora infecções pelos HPVs do gênero *Betapapillomavirus* não apresentem sintomas clínicos, parecem estar associados com o câncer de pele não melanoma (HOWLEY; PFISTER, 2015; TOMMASINO, 2017). Já os *Gammapapillomavirus*, *Mu papillomavirus* e *Nu papillomavirus* comumente estão relacionados com o aparecimento de papilomas benignos (MCBRIDE, 2017).

Os membros do gênero *Alphapapillomavirus* normalmente são classificados em grupos de alto risco, os quais são responsáveis por mais de 95% de todo câncer cervical (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68). O HPV6 e HPV11 são classificados como não carcinogênicos para humanos, porém estão quase sempre relacionados com aparecimento de verrugas genitais (BOUVARD et al., 2009; SCHIFFMAN et al., 2007).

O genoma do HPV é constituído por 8 ou 9 ORFs e por um segmento longo – cerca de 1000 pb – conhecido como região longa de controle (LCR) ou *upstream regulatory region* (URR), o qual não codifica proteínas, porém é o sítio de ligação de fatores de transcrição. As ORFs podem ser classificadas em região de expressão precoce, codificadora de proteínas necessárias para replicação viral (E1,

E2, E4, E5, E6 e E7), e região de expressão tardia, codificadora das proteínas do capsídeo viral (L1 e L2), (BOJILOVA et al., 2016; TUNA; AMOS, 2017).

O controle da transcrição das ORFs é complexo. Há várias regiões promotoras, como ocorre no HPV-16, com 2 regiões promotoras principais, sendo a região de posição *p97* próxima ao códon inicial de *E6*, relacionada à regulação da expressão de um RNA policistronico, o qual é responsável pela formação de genes precoces, ao ponto que o promotor de posição *p670* é responsável por regular os genes de fases tardias, além de existir a interação com outros promotores menores, e da utilização da maquinaria de *splicing* para formar outras combinações (GRASSMANN et al., 1996; SMOTKIN; WETTSTEIN, 1986; ZHENG; BAKER, 2006).

2.2 PROTEÍNAS VIRAIS

A proteína L1 (55 kDa) é a principal proteína do capsídeo viral e é encontrada em maior quantidade do que a proteína L2 (74 kDa). Apresenta até 360 cópias organizadas em 72 capsômeros, enquanto a L2 corresponde ao componente menor, com aproximadamente 12 cópias; L2 se encontra no centro dos capsômeros pentavalentes nos vértices do vírion. Ambas as proteínas desempenham um papel importante na mediação da infecção e são responsáveis pela formação do invólucro do vírus (DOORBAR, 2006; MODIS; TRUS; HARRISON, 2002). A proteína L1 parece estar relacionada com a ligação viral à superfície celular sem a utilização de L2, ao ponto que L2 induz uma mudança conformacional na organização do vírion, necessário para expor um sítio de ligação secundário para a ligação ao DNA viral (HORVATH et al., 2010; STAUFFER et al., 1998). Ambas têm sido utilizadas na produção de vacinas (HAGENSEE et al., 1994).

E1 é uma proteína iniciadora com função de helicase e é essencial para a replicação viral e o controle da transcrição (MÜNGER; HOWLEY; DI MAIO, 2007). Esta proteína é codificada pela maior ORF e altamente conservada entre o genoma dos HPVs. Sua proteína é formada de 600 até 650 aa, dependendo do tipo do PV. Sua expressão é controlada de acordo com a sua disponibilidade no ambiente, podendo ser aumentada quando em baixos níveis, assim como reprimida em altas concentrações (HEBNER; LAIMINS, 2006; SUN; HAN; MCCANCE, 1998). E1 é recrutada pela E2 a um local específico no genoma viral conhecido como origem de replicação do DNA, ou "ori". Assim, é gerado um complexo ternário E1-E2-ORI de alta especificidade, composto por um dímero de E1 e outro dímero de E2.

Este complexo serve para recrutamento de mais E1. Após sofrer hidrólise de ATP, o complexo dá origem a 2 hexâmeros de baixa afinidade, cada um com capacidade de desenrolar uma cadeia de DNA separadamente e de recrutar fatores de replicação como a DNA-polimerase alfa, topoisomerase 1 e a proteína de replicação A (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013; STENLUND, 2003)

A proteína E2 não atua exclusivamente com a E1, pode também participar na transcrição viral, facilitando manutenção e integração ao DNA hospedeiro. Esta proteína é composta por uma região conservada N-terminal de aproximadamente 200 aa e um domínio C-terminal de aproximadamente 100 aa (MCBRIDE, 2013).

A proteína E4 é sintetizada em uma junção E1^{E4} devido ao *splicing* do mRNA, no qual o códon de iniciação e os primeiros aa derivam da ORF E1 (WANG et al., 2011). É encontrada em grandes quantidades, chegando em até 30% do total de proteínas virais de algumas verrugas (DOORBAR et al., 1986). Essa proteína parece induzir a permanência da divisão celular na fase *gap 2* (G2/M), assim facilitando uma melhor eficiência da replicação viral durante o ciclo de divisão (DAVY; DOORBAR, 2007). Este fato parece estar relacionado com a capacidade da E4 sequestrar quinase dependente de ciclina 1 (CDK1) e quinase dependente de ciclina 2 (CDK2) para o citoplasma (DAVY et al., 2006). Após isso a proteína E4 pode se ligar às mitocôndrias causando o desprendimento dos microtúbulos fazendo com que estas organelas se agrupem próximo ao núcleo induzindo apoptose e favorecendo a liberação de novos vírions (RAJ et al., 2004).

Vários autores têm relacionado a proteína E4 como uma ferramenta para prognóstico da doença causada pelo HPV, correlacionando sua presença com níveis de replicação viral no hospedeiro (CHOW et al., 2009), correlação com outros biomarcadores na neoplasia cervical (GRIFFIN et al., 2015), com o grau de lesão e a progressão ao câncer (SUPCHOKPUL et al., 2011).

E5 é uma proteína transmembranar com característica hidrofóbica, contendo aproximadamente 83 aa. Encontra-se principalmente no retículo endoplasmático, mas também no complexo de Golgi e, em menor quantidade, na membrana nuclear e plasmática (BORZACCHIELLO et al., 2010). Esta proteína pode interferir em várias vias do sistema inflamatório proporcionando a proliferação celular, progressão tumoral, e imunossupressão. Outras ações de E5 estão associadas à indução da angiogênese via fator de crescimento endotelial vascular

(VEGF) (FREITAS et al., 2017) e a sua capacidade em favorecer a produção das proteínas E6 e E7 e outros mecanismos de evasão do sistema imunológico (CAMPO et al., 2010; CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010; KIM et al., 2010).

A ORF E6 codifica uma proteína de aproximadamente 150 aa que desempenha papel fundamental nos processos que levam a uma transformação e imortalização celular, mesmo após estas células estarem danificadas, impedindo de serem encaminhadas para a morte celular. Isso se deve a capacidade de E6 de inibir a proteína supressora tumoral *tumor protein p53* (p53), responsável por induzir a apoptose em células com danos irreparáveis no DNA. Para evitar o disparo da apoptose pela p53 e permitir continuidade do ciclo celular, E6 pode agir degradando o coativador transcricional da p53, ou agir diretamente se ligando a um complexo ubiquitina ligase, permitindo ubiquitinação da p53 e consequente encaminhamento para via de proteólise (KASTENHUBER; LOWE, 2017; ZIMMERMANN et al., 1999). E6 também pode se ligar a várias outras proteínas, como ocorre na inibição da apoptose pela *BCL2 antagonist/killer 1* (BAK1), ou promovendo atividade da telomerase recrutando *MYC proto-oncogene* (MYC) para ativação de *telomerase reverse transcriptase* (TERT) e *SRC proto-oncogene* (SRC) levando a instabilidade genômica e proliferação (MÜNGER; HOWLEY; DI MAIO, 2007; VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013; VELDMAN et al., 2003).

A proteína E7 possui aproximadamente 100 aa, pode agir em sinergismo com E6, gerando imortalização da célula, escape do sistema imune do hospedeiro, ou interagir com inúmeras outras células isoladamente. Pode inibir a proteína do retinoblastoma (pRb) promovendo liberação precoce do fator de transcrição E2F (E2F), e bloqueio de inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (CDKN1A), inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (CDKN1B) que tem como função natural regular a parada do ciclo celular, com essa inibição, desencadeia a ativação de ciclina A e ciclina E promovendo a progressão do ciclo celular para a fase S e síntese de DNA. E7 também pode favorecer instabilidade cromossômica gerando aneuploidias. Isso tudo favorecendo o desenvolvimento de lesões cervicais, até o desenvolvimento do câncer (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010; HERBST-KRALOVETZ et al., 2008; MÜNGER; HOWLEY; DI MAIO, 2007).

3 CÂNCER CERVICAL

Para o câncer cervical, também conhecido por câncer do colo do útero, mundialmente foram previstos 266 mil mortes por esta neoplasia para o ano de 2012 (BRASIL., 2017). E em alguns países em desenvolvimento como Belize, El Salvador, Equador, Nicarágua, Paraguai, Peru e na região norte do Brasil, o câncer cervical chega a ser a principal causa de morte por câncer na população feminina excluindo-se o câncer de pele não melanoma (LUCIANI et al., 2013).

Acredita-se que cerca de 18% de todas as neoplasias são geradas por algum agente infeccioso. Já no câncer cervical, em virtualmente 100% dos casos apresentam infecção pelo vírus HPV. Por isto, o HPV é considerado o agente etiológico desta doença. Entretanto apenas a infecção pelo HPV não é suficiente, sendo necessário outros fatores em conjunto para o desenvolvimento do câncer cervical (BOSCH; MUÑOZ, 2002; PARKIN, 2006; SCHIFFMAN et al., 2010).

O controle eficiente do sistema imune é primordial tanto para proteção contra infecção pelo HPV, e conseqüente desenvolvimento e progressão do câncer, assim como também no estudo de estratégias para o combate e prevenção da doença. É demonstrado que pacientes imunossuprimidas possuem uma maior propensão ao desenvolvimento tumoral. A falha em montar uma resposta inflamatória eficiente, favorece o desenvolvimento do HPV e conseqüente desenvolvimento tumoral (SCHIFFMAN; KJAER, 2003; STANLEY, 2006).

O desenvolvimento do câncer cervical pode ser classificado conforme o seu estadiamento, dividido em grupos de I a IV, e em suas subdivisões, de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Tabela1) (FIGO COMMITTEE ON GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 2014).

Tabela 1 – Estadiamentos do Câncer Cervical (FIGO)

Estádio	Descrição
I	O carcinoma é estritamente confinado ao colo do útero (a extensão ao corpo uterino deve ser desconsiderada)
IA	Câncer invasivo identificado apenas microscopicamente. (Todas as lesões macroscópicas, mesmo com invasão superficial, são cânceres no estágio IB). A invasão é limitada à invasão estromal medida com uma profundidade máxima de 5 mm ^a e não superior a 7 mm.
IA1	Medida de invasão do estroma ≤ 3 mm em profundidade e ≤ 7 mm de largura
IA2	Medida de invasão do estroma > 3 mm e < 5 mm de profundidade e ≤ 7 mm de largura.
IB	Lesões clínicas confinadas ao colo uterino, ou lesões pré-clínicas maiores que o estágio IA.
IB1	Lesões clínicas não maiores que 4 cm.
IB2	Lesões clínicas maiores que 4 cm
II	O carcinoma se estende além do útero, mas não se estendeu para a parede pélvica ou para o terço inferior da vagina.
IIA	Envolvimento de até 2/3 superiores da vagina. Nenhum envolvimento parametrial óbvio.
IIA1	Lesão clinicamente visível ≤ 4 cm
IIA2	Lesão clinicamente visível > 4 cm
IIB	Envolvimento ao paramétrio óbvio, mas não na parede lateral pélvica.
III	O carcinoma se estendeu até a parede pélvica. No exame retal, não há regiões livres de câncer entre o tumor e a parede pélvica. O tumor envolve o terço inferior da vagina. Todos os casos de hidronefrose ou rim não funcional devem ser incluídos, a menos que sejam conhecidos por outras causas.
IIIA	Envolvimento da vagina inferior, mas sem extensão para a parede pélvica.
IIIB	Extensão na parede lateral pélvica ou hidronefrose / rim inoperante
IV	O carcinoma estendeu-se para além da pelve verdadeira ou envolveu clinicamente a mucosa da bexiga e / ou do reto.
IVA	Acometimento de órgãos pélvicos adjacentes.
IVB	Acometimento de órgãos distantes.

Fonte: (FIGO COMMITTEE ON GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 2014)

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

^a A profundidade da invasão não deve ser maior do que 5 mm da base do epitélio, seja da superfície ou região glandular, da qual se origina. Invasão do espaço vascular não deve alterar o estadiamento.

Apesar de possuir um desenvolvimento lento, com média de 10 anos entre lesões pré-malignas até o aparecimento do câncer, ainda existe uma alta incidência da doença (SCHIFFMAN; KJAER, 2003). Isso se deve não só a fatores genéticos e imunológicos (MOORE et al., 2012) mas também a exposição à fatores de risco, falta de implementação de ações educacionais e melhorias na detecção e tratamento das lesões pré-malignas (PINHO; FRANÇA-JUNIOR, 2003). Fatores que além de gerar uma alta incidência e progressão da doença, levam a prejuízos financeiros no sistema de saúde (CAETANO et al., 2006).

3.1 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL

Além da infecção pelo HPV, que não é suficiente, componentes tóxicos do cigarro possuem um importante papel na imunossupressão, como

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nicotina e o produto do seu metabolismo cotinina. São responsáveis pela formação de adutos de DNA e conseqüentemente desenvolvimento tumoral. Podem ser encontrado na cérvix uterina tanto de fumantes ativas como de passivas, demonstrando o cigarro como um dos fatores na infecção pelo HPV e também para o câncer cervical (CALIFORNIA, 1997; HILDESHEIM et al., 2001; LOUIE et al., 2011; MELIKIAN et al., 1999; SOPORI, 2002). Além disso a nicotina presente no cigarro pode ativar vias responsáveis pela inibição da apoptose e também bloquear proteínas antitumorais (HEUSCH, 1998).

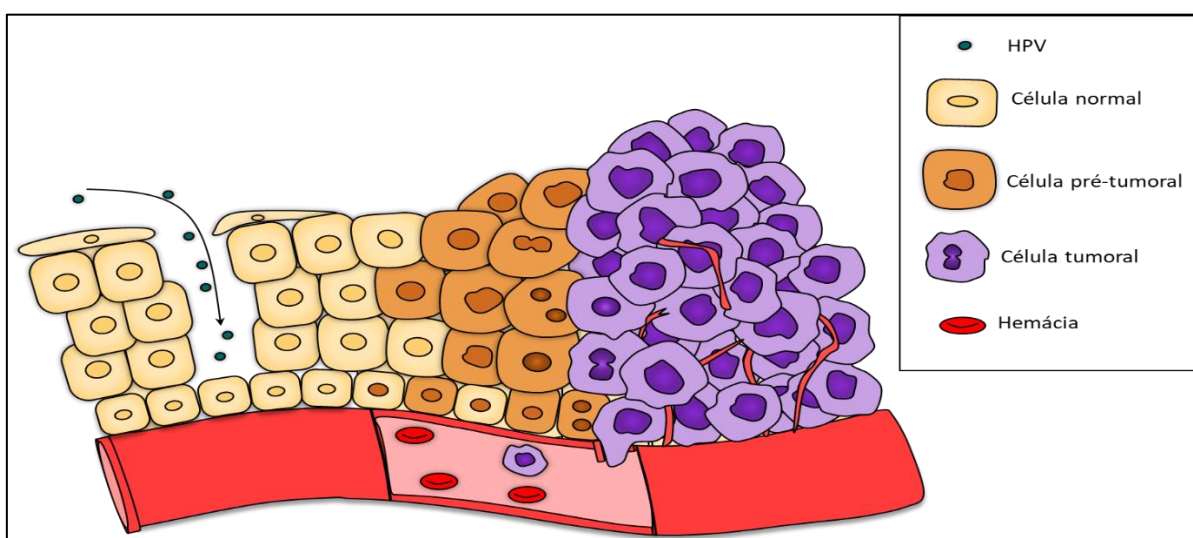
Apesar do câncer cervical não ter uma relação direta com hormônios sexuais como ocorre com o câncer de mama e de endométrio, tem sido relacionado o papel do uso de contraceptivos orais e de gestações com o câncer cervical. Foi demonstrada uma maior ativação transcricional da região URR viral em pacientes que utilizam terapias com estrógeno e progesterona exógenos, assim como em períodos gestacionais (MICHELIN et al., 1997). Entretanto existem muitas controvérsias sobre o seu real efeito, dependendo da dose e o tempo de utilização dos hormônios exógenos, e também ao serem analisadas juntamente com outros fatores confundidores. Além do fato de que mulheres que utilizam de terapias hormonais teoricamente possuem uma maior frequência nas consultas médicas, favorecendo um diagnóstico precoce das lesões cervicais conseqüentemente melhor prognóstico (SMITH et al., 2003).

Outros fatores como hábitos sexuais e multiparidade também são associados com o desenvolvimento da doença. A multiparidade pode representar um indício de fatores hormonais, potencializando efeitos proliferativos ou oncogênicos, enquanto que a idade da primeira relação sexual, e número de parceiros sexuais, sugerem uma maior probabilidade de contato com o vírus HPV, o que conseqüentemente levaria a maiores chances de desenvolvimento do câncer cervical (BRINTON et al., 1987; SCHIFFMAN et al., 2007).

4 INFECÇÃO PELO HPV E SISTEMA IMUNOLÓGICO

A infecção pelo HPV (Figura 1) ocorre por meio de contato do vírus com a pele ou mucosas (SCHIFFMAN et al., 2007). Porém para que ocorra a infecção e posterior estabelecimento do vírus, este necessita de uma fissura no epitélio estratificado para ter acesso às células basais. Conquanto, em primeiro momento, ainda em sua forma episossomal, ele não se integra ao DNA do hospedeiro; perde o seu revestimento ao migrar pelo endossoma, permanece até o início da mitose e rompimento da membrana nuclear, para então adentrar ao núcleo. Uma vez no núcleo, o genoma viral sofre uma amplificação limitada, sendo replicado fora do cromossomo em uma taxa mínima de 50 a 100 cópias por célula, apresentando um padrão de divisão diferente ao do hospedeiro. (MCBRIDE, 2017; STANLEY, 2012).

Figura 1 – Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV)



A infecção requer o contato com células da camada basal, possibilitado por microlesões no tecido epitelial estratificado. A célula infectada se divide e a população se espalha lateralmente. Após várias divisões celulares, caso a infecção não seja resolvida, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões cervicais, e desenvolvimento do câncer cervical.

Nesta fase inicial, as proteínas E6 e E7 estão em quantidades mínimas. À medida que o epitélio normal infectado passa a ser considerado uma neoplasia intraepitelial ou câncer invasivo, é frequentemente encontrado uma ruptura no gene *E2*, e consequente integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro. Essa ruptura acarreta o descontrole da produção de E6 e E7, e a taxa de replicação passa para milhares de cópias por célula, essa integração é

frequentemente encontrada em tumores de colo uterino e relacionada a transformação maligna da célula (SHIN et al., 2014; ZUR HAUSEN, 2002).

Estima-se que metade da população mundial esteja infectada por algum tipo de HPV. A infecção é frequentemente relacionada com o número de parceiros e hábitos sexuais, idade, etnia, região onde reside, escolaridade, hábito tabagista entre outros fatores. Cerca de 80% da população feminina irá se infectar pelo HPV em algum momento da vida. No entanto, a grande maioria desta população terá a infecção eliminada antes mesmo das proteínas oncogênicas causarem algum dano permanente ao seu DNA (GIULIANO et al., 2011; KOSHIOL et al., 2006).

O sistema imunológico, sem dúvida, é fundamental para o desfecho da infecção, sendo decisivo para resolução ou persistência viral, ou até mesmo facilitar o desenvolvimento do câncer (TINDLE, 2002). Em até 2 anos, a maioria das infecções por HPV, mesmo após apresentarem lesões citológicas, são resolvidas pelo sistema imunológico, ao ponto que aproximadamente apenas 10% das infecções evoluem para lesão pré-maligna (SCHIFFMAN et al., 2005, 2007).

Esta pequena fração de pessoas que não consegue conter a infecção viral, deve-se principalmente ao fato do HPV demonstrar ter mecanismos de escape do sistema imunológico. Um mecanismo é o da inibição da transcrição do *toll like receptor 9* (TLR9) pelas oncoproteínas E6 e E7, diminuindo o reconhecimento de DNA viral. Além disso, o HPV é capaz de inibir mecanismos antivirais responsáveis pela expressão de genes pró-inflamatórios como os da via do *interferon regulatory factor 1* (IRF1) e 3 (IRF3) (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010; HASAN et al., 2007; HERBST-KRALOVETZ et al., 2008). A proteína viral E5 também pode facilitar o escape contra o sistema imune, promovendo a retenção de moléculas responsáveis pelo reconhecimento antigênico em vesículas do complexo de Golgi, impedindo sua exteriorização e consequente sinalização para células CD8⁺ (CAMPO et al., 2010).

O HPV também possui outros mecanismos de escape do sistema imune, por exemplo, não necessitando de uma alta liberação de suas proteínas tardias de formação do capsídeo, em células basais, evitando com que haja reconhecimento das partículas virais pelas células apresentadoras de antígenos. Outro mecanismo de escape imunológico é não necessitar de se expor à corrente sanguínea e nem necessariamente desencadear morte celular, tendo o seu ciclo

ligado apenas ao desenvolvimento dos queratinócitos. Estas são algumas características que levaram ao sucesso evolutivo por uma partícula simples, porém com mecanismos adaptativos de alta complexidade (TINDLE, 2002; ZHOU et al., 1999).

O trato genital feminino inferior é bastante vulnerável a contatos com agentes infecciosos. É composto por um epitélio escamoso estratificado até a cérvix uterina, o qual promove a primeira linha de defesa contra essas infecções. Em seguida há uma transição para epitélio simples, local onde comumente se inicia a formação tumoral (SCHIFFMAN et al., 2007).

Frente a uma infecção viral, ocorre o reconhecimento do antígeno em regiões, não metiladas, por TLR9, levando a: 1) ativação do fator de transcrição NFκB e aumento da atividade pró-inflamatória e 2) liberação das citocinas *interferon alpha* e *interferon beta* pelas células epiteliais e dendríticas, induzindo mecanismos que impedem a replicação viral (ANDERSEN; AL-KHAIRY; INGALLS, 2006; BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010). Conjuntamente, pode ocorrer a apresentação do antígeno viral, pela via do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, aos linfócitos CD8⁺ e células *natural killer* (NK), com finalidade de induzir a morte da célula hospedeira diretamente pela inserção de perforinas e granzimas (AMADOR-MOLINA et al., 2013; SCOTT; MAYUMI NAKAGAWA, 2001). Também, a apresentação pode se dar via MHC de classe II por meio das células apresentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas, que reconhecem o antígeno e sinalizam para os linfócitos T CD4⁺, os quais passam por uma expansão clonal gerando uma resposta efetora. Caso a apresentação do antígeno não seja suficiente, essas células T CD4⁺ podem ficar anérgicas ou tornarem-se células T regulatórias pelo estímulo de citocinas específicas do microambiente (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005; SANTIN et al., 1999; VAN DER BURG et al., 2007).

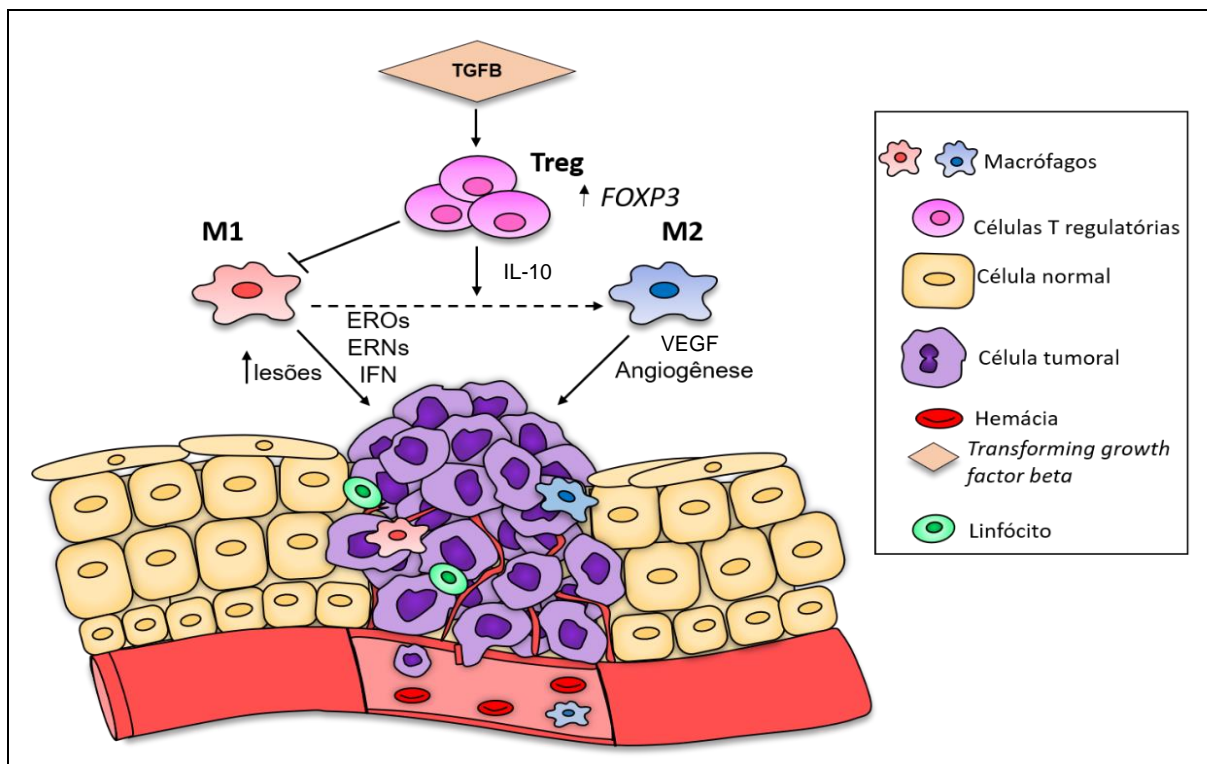
Outras células fundamentais na apresentação de antígenos são os macrófagos, que além de fagocitarem o antígeno e se comunicarem com as células T, também produzem citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contra a infecção (ELGERT; ALLEVA; MULLINS, 1998). Entretanto, o aumento de macrófagos citotóxicos está diretamente relacionado com a progressão de lesões no local. Por esta razão, é necessário o controle dos danos da resposta imune contra a infecção (HAMMES et al., 2007).

Os macrófagos associados a este ambiente tumoral, além de produzirem uma variedade de citocinas em resposta a lesão, também são alvos destas citocinas respondendo de forma variada de acordo com a indução. Regulam o crescimento, progressão e invasão tumoral, interação com outros componentes do estroma e ativação e orientação da imunidade adaptativa (MANTOVANI et al., 2008).

Células T regulatórias permitem a polarização do fenótipo dos macrófagos M1 para macrófagos do tipo M2. Macrófagos M1, em geral são caracterizados pelo aumento de IL-12, IL-23, TNF-alfa e baixos níveis de IL-10, e possuem um papel de indutores e efetores da resposta imune pró-inflamatória. Em contrapartida, os macrófagos do tipo M2 expressam citocinas anti-inflamatórias como IL-10, VEGF e TGFB, e são relacionados com recrutamento de leucócitos envolvidos no reparo e remodelamento tecidual (HAO et al., 2012).

Entretanto um microambiente com pouca inflamação é frequentemente relacionado à infecção pelo HPV e a um mau prognóstico para estas pacientes, favorecendo o desenvolvimento de neoplasia cervical (Figura 2) (MANTOVANI et al., 2008; MOLLING et al., 2007; PEGHINI et al., 2012; SCOTT et al., 2009). Células T regulatórias, originalmente identificadas como células T CD4⁺ CD25⁺, são responsáveis pelo controle da resposta imune. Possuem a característica de poder expressar o fator de transcrição FOXP3, necessário para o seu desenvolvimento e efetividade. Entretanto necessitam da atividade da citocina TGFB1 e fosforilação de Smad2 para uma maior expressão e efetividade de sua função imunossupressora (MARIE et al., 2005; SAKAGUCHI, 2004) (Figura 2).

Figura 2 – Resposta imune das células T reguladoras no ambiente tumoral



Citocina fator de transformação do crescimento beta (TGFB) ativa a resposta das células Treg, aumentam a expressão de *FOXP3*, e bloqueiam a ação dos macrófagos M1 contra o tecido tumoral, além de favorecerem a polarização de macrófagos M1 para macrófagos M2 favorecendo a angiogênese e progressão tumoral.

5 FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO BETA (TGFB)

A família de citocinas do TGFB consiste em mais de 30 proteínas, incluindo receptores transmembranares, ligantes e transdutores de sinais. Esta via possui papel fundamental nos processos celulares como proliferação, reconhecimento, diferenciação, morfogênese, apoptose, homeostase tecidual, regeneração, além de estar envolvida na regulação da expressão de um grande conjunto de genes. Estas proteínas podem ser divididas em *TGF- β /Activin/Nodal* ou *bone morphogenetic protein (BMP)*, *growth differentiation factor 5 (GDF5)* e *anti-Mullerian hormone (AMH)* as quais são divididas de acordo com suas similaridades e com suas vias de ativação (MASSAGUÉ, 1998, 2012; SHI; MASSAGUÉ, 2003).

Os ligantes TGFB, em humanos, são formados por dímeros de polipeptídeos com 12,5 kDa cada, contendo 6 resíduos de cisteína estruturalmente conservados. Podem ser encontrados em 3 isoformas, fator de transformação do crescimento beta 1 (TGFB1), com o gene localizado no cromossomo 19q13, Fator de transformação do crescimento beta 2 localizado no cromossomo 1q41 e fator de transformação do crescimento beta 3 no cromossomo 14q24 (BONEWALD et al., 1991; MASSAGUÉ, 1990).

Inicialmente o ligante se encontra inativo, e seu processamento inicia com uma clivagem proteolítica para remoção do peptídeo sinal da sua forma pré-pró-TGFB. É então secretado na matriz extracelular onde se encontra em complexo com o *latency-associated protein (LAP)* ligado covalentemente a uma outra proteína denominada por *Latent transforming growth factor beta binding proteins (LTBP)*, formando um complexo maior denominado de *Large Latent Complex (LLC)*. O LTBP promove a ligação do LLC às proteínas da matriz extracelular o qual ainda permanece inativo, até que ocorra a liberação da LLC da matriz extracelular pela ação de proteases, clivagem por meio de condições ácidas ou pela trombospondina para então estar em sua forma ativa e atuar em seus receptores específicos (HYYTIÄINEN; PENTTINEN; KESKI-OJA, 2004; KUBICZKOVA et al., 2012).

Em humanos a família dos receptores de TGFB, receptores serina/treonina quinases, possui 12 membros. Dentre eles estão o receptor do tipo I, *transforming growth factor beta receptor 1 (TGFB1)*, localizado no cromossomo 9q22.33, com aproximadamente 55 kDa, e o do tipo II, *transforming growth factor beta receptor 2 (TGFB2)* localizado no cromossomo 3p24.1, com aproximadamente

70 kDa, ambos responsáveis pela sinalização da via do TGFB (MANNING et al., 2002; MIZUGUCHI et al., 2004). Além dos receptores serina/treonina quinases, existe também um membro betaglicano da família do TGFB, o *transforming growth factor beta receptor 3*, responsável por intensificar a comunicação dos ligantes de TGFB aos receptores TGFBR1 e TGFBR2 (BILANDZIC; STENVERS, 2012).

Os ligantes do TGFB possuem alta afinidade apenas pelo TGFBR2, e ao se ligarem ao domínio do TGFBR2 permitem a incorporação do TGFBR1, formando um complexo composto por um dímero de ligantes, um dímero de TGFBR1 e outro de TGFBR2. O TGFBR1 possui uma sequência de resíduos de serina e treonina, denominada de domínio GS, a qual necessita da fosforilação advinda do TGFBR2 para que ocorra a sinalização intracelular (MASSAGUÉ, 1998; SHI; MASSAGUÉ, 2003).

Esta via pode ser resumidamente dividida em dois caminhos distintos: a via canônica e a não canônica. A via canônica é dependente de proteínas de genes ortólogos de vertebrados, denominadas de *Small mothers against decapentaplegic proteins* (SMAD), nome advindo das proteínas *mothers against decapentaplegic* de *Drosophila melanogaster* o primeiro mediador de TGFB identificado. A via não canônica pode não envolver as SMADs, podendo ser ativada pela via *receptor-bound SMADs* (R-SMADs) sem a presença de SMAD4, ou ainda sinalizar via TGFBR2 sem haver influência do TGFBR1 (KUBICZKOVA et al., 2012; SEKELSKY et al., 1995; SHI; MASSAGUÉ, 2003).

Na via canônica, após o TGFBR1 ser ativado, o mesmo fosforila as R-SMADs, SMAD2 e SMAD3, permitindo a formação de um complexo com a SMAD4, uma *common partner SMAD* (Co-SMAD). Este complexo pode então adentrar ao núcleo e agir em sinergismo com outros fatores de transcrição e co-ativadores na regulação de vários outros genes (SHI; MASSAGUÉ, 2003). As proteínas SMADs podem ter sua atividade aumentada pela maior concentração de sua proteína disponível, ou diminuída por um sistema de *feedback* negativo, como ocorre em tratamentos com TGFB exógeno, ocasionando alterações transcricionais para diminuição da expressão de mRNA de SMAD3. De outra forma, pode ocorrer o encaminhamento da degradação proteassomal de SMADs pela via da ubiquitina promovendo uma modificação pós-translacional, que desencadearia em aumento da sinalização de SMADs com objetivo de suprir essa degradação proteassomal

(CAESTECKER; PIEK; ROBERTS, 2000; PONCELET; DE CAESTECKER; SCHNAPER, 1999).

Em células com TGFBR1 mutado incapaz de se comunicar com as SMADs, foi demonstrado o efeito do TGF β em ativar a proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK), com consequente indução de apoptose e transição epitélio-mesenquimal, porém não foi capaz de gerar efeitos antiproliferativos (YU; HÉBERT; ZHANG, 2002). Além desta via independente de SMAD, podemos também ter a interação do TGFBR1 com o *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) promovendo a ligação e ubiquitinação da *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7* (MAP3K7), levando a apoptose (SORRENTINO et al., 2008). Além disso, o TGFBR2 pode diretamente ativar a proteína *par-6 family cell polarity regulator alpha* (PAR6A) sem a participação de TGFBR1, atraindo *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1* (SMURF1) que tem por objetivo a degradação da *ras homolog family member A* (RHOA) levando a uma diminuição de junções celulares (OZDAMAR et al., 2005).

Ainda na via não canônica, pode haver a participação das MAPK e ERK, podendo ou não atuar em conjunto com o complexo de SMADs no núcleo, regulando a proliferação celular, apoptose, metástases e angiogênese, como também da PIK3CA, mTOR na síntese proteica e NF κ B gerando inflamação e sobrevivência da célula (COSTANZA et al., 2017; SHI; MASSAGUÉ, 2003).

Em uma condição natural, o TGF β prioriza a via das SMADs, resultando na expressão de várias proteínas supressoras de tumores. Porém frente uma infecção por HPV, a via de SMADs e o TGFBR2 são inibidos pela proteína viral E5, ativando outros caminhos da via não canônica, como a *TGF β induced factor homeobox 1* (TGIF1), PIK3CA, NF κ B, ERK, VEGF, contribuindo para o desenvolvimento tumoral, angiogênese e imunoregulação. Além da NF κ B e PIK3CA gerar um feedback negativo de SMADs a ERK e TGIF1, levam ao bloqueio da fosforilação de SMADs impossibilitando a formação de seus complexos e deslocamento ao núcleo (FREITAS et al., 2017).

Foi demonstrado também que a SMAD3 pode se ligar em uma região *enhancer* do *FOXP3*, com papel fundamental no aumento da acetilação de histonas, e consequentemente potencializar e induzir a expressão de *FOXP3* (TONE et al., 2008). A via não canônica, por intermédio da MAPK, ERK, *Jun proto-oncogene*, *AP-*

1 transcription factor subunit (JUN) também demonstram induzir a transcrição do *FOXP3* (LU et al., 2010).

6 FORKHEAD BOX P3 (FOXP3)

O nome da proteína *Forkhead* (FKH) é derivado do gene de *Drosophila melanogaster*, o qual é expresso na formação embrionária, de onde origina o nome de mais de 100 membros (COFFER; BURGERING, 2004). A proteína *Forkhead box P3* (FOXP3) pertence a esta grande família de fatores de transcrição (KAESTNER et al., 2000), os quais compartilham um domínio característico de ligação ao DNA, responsável pela regulação de uma grande variedade de genes. Desempenha funções de ativação como também na repressão de genes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário, da audição e da fala, fissura do palato, características capilares, problemas oculares, diabetes, regulação do sistema imunológico, entre outros (COFFER; BURGERING, 2004; LEHMANN et al., 2003).

O gene *FOXP3* é localizado no cromossomo Xp11.23 e possui 11 éxons codificantes e 3 não codificantes (BRUNKOW et al., 2001; FLOESS et al., 2007; KARAGIANNIDIS et al., 2004). Este gene codifica uma proteína de 431 aa de cadeia longa, pesando aproximadamente 47 kDa. A proteína FOXP3 é considerada instável, possuindo uma meia-vida com menos de 30 minutos (LEE; GAO; FANG, 2008). Sua maior parte é constitutivamente localizada no núcleo, mas uma parte ainda permanece na região do citoplasma (LOPES et al., 2006). Esta proteína pode ser dividida em 4 domínios: região amino terminal, domínio *zinc finger*, *leucine zipper* e *forkhead domain* (DE ZOETEN et al., 2009; TRIULZI et al., 2013).

A região N-terminal é responsável por se ligar em genes alvos, reprimindo sua expressão; por isso também é denominada de região repressora. Pode atuar em vários genes que resultam no controle da proliferação, diferenciação, morte celular, entre outros (LEE; GAO; FANG, 2008).

O domínio *leucine zipper* e *zinc finger* estão relacionadas com a formação de dímeros com outra FOXP3, ou mesmo outras proteínas FKH. Foi demonstrado em pacientes com síndrome de desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X (IPEX), que uma mutação neste domínio leva a não formação destes dímeros e conseqüentemente perda da função destas proteínas, levando a um pior prognóstico da doença (CHATILA et al., 2000; LI et al., 2007). Também foi encontrado no domínio *leucine zipper*, 2 resíduos do aminoácido lisina que ao serem acetilados, neutralizam a carga positiva do local, promovendo mudança conformacional e maior estabilidade entre dímeros de

FOXP3, levando a alterações na ligação da região promotora, e maior atividade supressora das células T regulatórias (SONG et al., 2012).

O *forkhead domain* é conhecido também por *winged-helix* o qual é comparado ao formato de uma borboleta. Este domínio possui função estrutural para ligação ao DNA e, assim como o domínio *leucine zíper*, está relacionado com formação de dímeros. Mutações em sua região também são relacionadas com o desenvolvimento da IPEX (BANDUKWALA et al., 2011; CLARK et al., 1993; COFFER; BURGERING, 2004).

A proteína FOXP3 é responsável pelo desenvolvimento e funcionalidade das células imunossupressoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ as quais são fundamentais para o equilíbrio do sistema imunológico e proteção contra doenças autoimunes (BANDUKWALA et al., 2011). Entretanto, uma elevada concentração dessas células e uma maior efetividade dessa imunossupressão, vêm sendo relacionadas com várias neoplasias, como de colo uterino, mama, ovário, gastrointestinais, próstata entre outros, além de uma menor sobrevida destas pacientes (BATES et al., 2006; KAWACHI et al., 2018; SASADA et al., 2003; WANG et al., 2009; ZHU et al., 2016). Assim como a diminuição dos níveis de FOXP3, devido a polimorfismos genéticos, estão relacionados a um pior prognóstico em doenças autoimunes (SHEN et al., 2010).

7 POLIMORFISMO GENÉTICOS

Apesar do termo mutação ser frequentemente relacionado com conotações negativas, qualquer alteração na sequência de nucleotídeos levando ou não a alguma alteração fenotípica no indivíduo, pode ser considerada uma mutação (CONDIT et al., 2002). Contudo, substituições, inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos ou variações em sequências que se repetem, onde a variante do alelo menos frequente está presente em 1% ou mais da população, são denominados de polimorfismos genéticos (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Estes polimorfismos podem ser encontrados em regiões codificantes, podendo ou não gerar alterações de aminoácido, mudanças na estrutura e funcionalidade do mesmo; em regiões não codificantes como regiões reguladoras, podendo gerar alterações na expressão gênica; ou também em junções entre exons e introns, regiões envolvidas na formação de *splicing*, podendo alterar a expressão de proteínas alteradas (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Cerca de 90% das variantes genéticas em humanos são compostas por diferenças em bases únicas do DNA, denominadas de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (COLLINS; BROOKS; CHAKRAVARTI, 1998), os quais são frequentemente associados a uma infinidade de eventos, como alterações psicológicas (CHOI et al., 2018), cardiovasculares (PENG et al., 2018), diabetes (BROADGATE et al., 2018) e várias neoplasias (CHEN et al., 2018; LIAO et al., 2018; SERGENTANIS et al., 2011; SINGH et al., 2017).

7.1 POLIMORFISMOS RS1800470 E RS1800471 NO GENE *TGFB1*

Vários polimorfismos foram descritos para o *TGFB1*, dentre eles os SNPs em região que codifica o peptídeo sinal rs1800470 e rs1800471. O SNP rs1800470 (c.29C>T ou Pro10Leu) ocorre em região codificante (c.) do DNA, a +29 pb posteriores ao sítio de início da tradução (+1), no códon 10 do peptídeo sinal (SHAH et al., 2006). Neste local, a base C (citosina) do alelo ancestral (c.29C) pode ser substituída pela base T (timina), gerando o alelo variante (c.29T). Esta troca resulta na substituição de uma prolina (Pro) por uma leucina (Leu) na proteína. Em relação ao SNP rs1800471 (c.74G>C ou Arg25Pro), a substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C) no códon 25 acarreta, na proteína, a troca de uma arginina (Arg) por uma prolina (Pro) (CAMBIEN et al., 1996).

O peptídeo sinal é uma sequência de 29 aa que sinaliza a exportação da proteína em síntese para as membranas do retículo endoplasmático. Estruturalmente possui três regiões: uma região N-terminal carregada positivamente, um núcleo hidrofóbico central e uma região polar C-terminal. As trocas Pro10Leu (rs1800470) e Arg25Pro (rs1800471) estão localizadas, respectivamente, na região que codifica o núcleo hidrofóbico e próximo à extremidade 3' deste núcleo (CAMBIEN et al., 1996). Existem trabalhos demonstrando que modificações na composição de aminoácidos do peptídeo sinal afeta a sua polaridade e provoca diferenças nas taxas de exportação da proteína para o retículo endoplasmático (SUSIANTI et al., 2014; WOOD et al., 2000)

Os alelos ancestrais c.29C e c.74G produziram maior secreção do TGFB1 *in vitro* (AWAD et al., 1998; DUNNING et al., 2003; GU et al., 2012) e têm mostrado forte relação com o aumento da concentração sérica desta citocina (GUO et al., 2011; POOJA et al., 2013; TAUBENSCHUSS et al., 2013; YOKOTA et al., 2000).

7.2 POLIMORFISMO RS3087465 NO GENE *TGFBR2*

O SNP rs3087465 (g.4167A>G), também conhecido como G-875A, é encontrado em região promotora, não codificante, na posição -1216 pb anteriores ao sítio de início da tradução. Possui como alelo ancestral uma adenina, o qual frequentemente pode ser substituído por uma guanina. Foi demonstrado que em células epiteliais normais, a presença do alelo G promove uma maior expressão de *TGFBR2* (BAE et al., 1995; SEIJO et al., 2001).

Este SNP está relacionado com alto risco em doença renal em estágio final (KI et al., 2015). Entretanto em câncer gástrico oferece proteção contra a doença, além de estar relacionado com um melhor prognóstico contra estágios avançados da doença (GUO et al., 2012; MOCELLIN et al., 2015). Também está relacionado com câncer de mama nos subtipos positivos para receptores hormonais, com o alelo A oferecendo proteção contra a doença (ZHANG et al., 2011). Em pacientes com câncer colorretal em tratamento quimioterápico, este mesmo alelo promove diminuição de efeitos colaterais gástricos advindos do tratamento (LI et al., 2016).

7.3 POLIMORFISMO RS3761548 NO GENE *FOXP3*

Outro SNP não codificante é o rs3761548, também conhecido como g.8048A>C, ocorre em região promotora do gene *FOXP3*, localizado em -3279 pb anteriores ao sítio de início da tradução. Esta região pode ser sítio de ligação de vários fatores de transcrições, como pode ocorrer em sua região “GGGCGG”, um sítio de ligação para o fator de transcrição *SP1* (KADONAGA et al., 1988; SONG et al., 2013).

Seu alelo ancestral é uma base de citosina, a qual pode ser substituída por uma adenina neste polimorfismo. Foi demonstrado que o alelo A é responsável por interromper a ligação do *transcription factor 3* (TCF3) e *MYB proto-oncogene, transcription factor* (MYB) e conseqüente diminuição da transcrição do *FOXP3* em pacientes com psoríase (SHEN et al., 2010). Sendo que para o câncer de mama, o genótipo A/A é relacionado com aumento do *FOXP3* no microambiente tumoral (LOPES et al., 2014). Também foi demonstrado aumento de *interferon gamma* nos genótipos A/C e A/A quando comparado com C/C em pacientes transplantados, sendo relacionados com um pior prognóstico (VERMA et al., 2017).

O SNP rs3761548 vem sendo associado com várias neoplasias como câncer colorretal (CHEN et al., 2014), câncer de pulmão de células não pequenas (HE et al., 2013), câncer da tireóide (JIANG et al., 2017), em pacientes com câncer de mama parece não ter relação com uma predisposição à doença, entretanto o alelo A está relacionado a estágios avançados do tumor (HIRATA et al., 2017; JAHAN et al., 2014; RASKIN; RENNERT; GRUBER, 2009).

Estes polimorfismos vêm demonstrando grande importância no desfecho de diversas doenças, embora não haja uniformidade em sua distribuição genotípica dos mesmos, além de nenhuma caracterização do polimorfismo rs3087465 para a população norte do Paraná. E nenhum outro trabalho até o momento, que relacione a influência destes 4 polimorfismos com o desenvolvimento do câncer cervical e desfecho clínico da doença.

8 OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral analisar a influência de polimorfismos do *TGFB1*, *TGFBR2* e *FOXP3* no desenvolvimento do câncer cervical.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a associação do perfil sociodemográfico, características reprodutivas e comportamento sexual, com o desenvolvimento do câncer cervical, bem como com o estadiamento da doença;

Avaliar a frequência dos polimorfismos rs1800470, rs1800471 de *TGFB1*, do rs3087465 de *TGFBR2* e do rs3761548 de *FOXP3* em mulheres livres de lesões cervicais e pacientes com câncer cervical.

Analisar a influência dos polimorfismos rs1800470, rs1800471 do *TGFB1*, do rs3087465 do *TGFBR2* e do rs3761548 do *FOXP3* no desenvolvimento e estadiamento do câncer cervical.

9 ARTIGO CIENTÍFICO

EXTERNAL FACTORS AND POLYMORPHISMS IN GENES RELATED TO IMMUNOSUPPRESSION INVOLVED IN THE CERVICAL CANCER DEVELOPMENT

ABSTRACT

Cervical cancer is among the most frequent cancer in women worldwide. The immune system is important in both the resolution and development of pre-malignant lesions and subsequently cervical cancer. A microenvironment with low inflammation is often related to a worse prognosis, favoring the development of cervical cancer. Considering that single nucleotide polymorphisms (SNPs) may alter the expression of the protein, as well as its effectiveness, we aimed to evaluate the *TGFB1* polymorphisms rs1800470 and rs1800471, as rs3087465 in the *TGFBR2* gene and rs3761548 in the *FOXP3*, besides sociodemographic, reproductive and sexual behavior with the development of cervical cancer. We recruited 49 women with cervical cancer and 107 without cervical lesion. It was observed that having 4 or more partners during life was associated with advanced stages of the disease ($p=0.014$). The non-knowledge about HPV ($p=0.023$) and their forms of transmission ($p<0.01$), family income of at most 1 minimum wage ($p<0.01$), absence or low schooling ($p<0.01$), smoking habit ($p<0.01$), absence of previous preventive tests ($p=0.026$), high number of pregnancies ($p=0.017$) and vaginal birth ($p=0.002$), no sexual partner in the past 6 months ($p=0.014$) are related to the development of cervical cancer. Analyzing the influence of polymorphisms, was independently associated with the cervical cancer development the AA genotype (OR= 3.461 and CI95% = 1.136 – 10.540; $p=0.029$) of the *FOXP3* polymorphism rs3761548, the AG genotype (OR= 8.093 and CI95%= 1.272 – 51.472; $p=0.027$) and GG (OR= 10.753 and CI95%= 1.589 – 72.762; $p=0.015$) on *TGFBR2* polymorphism rs3087465. While the genotype CT (OR= 0.133 and CI95%= 0.031 – 0.576; $p=0.007$) and TT (OR= 0.243 and CI95%= 0.062 – 0.953; $p=0.043$) in the codominant models and the dominant model (OR= 0.186 and CI95%= 0.052 – 0.659; $p=0.009$) for the polymorphism rs1800470 were related to protection against cervical cancer development. These data suggest that SNPs in immune system regulatory regions can be used as susceptibility markers to cervical cancer development.

Keywords: Susceptibility marker; rs3761548; rs3087465; rs1800470; rs1800471

INTRODUCTION

The cervical cancer continues to be a huge health problem, reaching a global estimate of 266,000 deaths for the year 2012, according to the most recent statistics (SERRANO et al., 2018). And in some developing countries such as Belize, El Salvador, Ecuador, Nicaragua, Paraguay, Peru and the Northern region of Brazil,

cervical cancer is the leading cause of cancer death in the female population (LUCIANI et al., 2013).

Human Papillomavirus (HPV) infection is fundamental for the cervical cancer development, however other factors are necessary for viral persistence and consequent neoplasm development (SCHIFFMAN et al., 2007).

The immune system is critical both for protection against HPV infection, and consequent cancer progression, as well as for the study of strategies for combating and preventing the disease. An exacerbated immune response is related to the progression of cervical lesions, whereas immunosuppressed patients have a failure to mount an efficient HPV response and present a greater propensity to tumor development, what requires a delicate control of the inflammatory response, which is not fully understood (HAMMES et al., 2007; STANLEY, 2006).

Transforming growth factor beta (TGFB) is one of the key cytokines in cell processes such as proliferation, recognition, differentiation, morphogenesis, apoptosis, tissue homeostasis, regeneration, besides being involved in the regulation of a large gene set expression (MASSAGUÉ, 2012). In cancer this cytokine demonstrates to have a double effect, being related to the tumorigenesis and also with the tumor suppression (DRABSCH; TEN DIJKE, 2012).

Also important in the immunological context is the transcription factor Forkhead box P3 (FOXP3). It is responsible for the development and functionality of the T regulatory cells (Tregs) which are fundamental for the immune system balance (BANDUKWALA et al., 2011).

Genetic polymorphisms in both non-coding and coding regions can lead to changes in expression, as well as in the structure of the formed protein (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Thus, polymorphisms in genes associated with immunosuppression as in the gene *Transforming growth factor beta 1 (TGFB1)* (TAUBENSCHUSS et al., 2013; WOOD et al., 2000), in its receptor *Transforming growth factor beta receptor 2 (TGFB2)* (SEIJO et al., 2001), and in the transcription factor *FOXP3* (SHEN et al., 2010) can play key roles in the development of cervical cancer, bringing new findings for diagnosis, prognosis and treatments with immune regulation, which shows promising effects in the cancer treatment (RADVANYI, 2018; STEVANOVIĆ et al., 2017; ZACHARAKIS et al., 2018). Therefore, the objective of this study was to evaluate the association of sociodemographic profile, reproductive traits and sexual behavior as well as the influence of polymorphisms rs1800470,

rs1800471, rs3087465 and rs3761548 on the cervical cancer development and prognosis.

MATERIAL AND METHODS

ETHICAL ASPECTS

This study was approved by the Institutional Ethics Committee Involving Humans at State University of Londrina, Londrina – PR, Brazil (CEP/UEL 466/12; CAAE 56738316.3.0000.5231). All women signed the free and informed consent forms, after invitation and clarification on the project.

STUDY GROUPS AND SAMPLES

This is a cross-sectional, case-control study, and the women in the control group were selected at the Municipal Health Center Dr. Justiniano Clímaco da Silva, Intermunicipal Consortium of Health of the Middle Paranapanema Paranapanema (CISMEPAR) and at University Hospital and Clinic Center of State University of Londrina. While women with cervical cancer come from the Londrina Cancer Hospital . Both groups belong to the population of the Northern region of Paraná.

Peripheral blood and cervicovaginal secretion samples were obtained from 107 patients free of cervical lesions. Considering this control group, 86 patients are free from HPV infection and 21 HPV positive. The patients in the control group were selected according to age, so that there was no statistical difference when compared with the cervical cancer group ($p > 0.05$).

Samples of tumor of the uterine cervix, previously fixed and included in paraffin, were collected from 49 patients with confirmation of the diagnosis of malignancy for histopathological examination, performed by a professional pathologist.

Clinical characteristics were obtained from medical records, and socio-demographic data, reproductive and sexual behavior, by a structured questionnaire.

DNA EXTRACTION

The DNA of the cervical cancer group was extracted from the tumor

tissue previously included in paraffin, using RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's instructions.

The DNA of the control group was obtained from the peripheral blood to carry out the genotyping, using the Kit Biopur Mini Spin Plus (Biometrix, Curitiba-Paraná, Brazil), while for HPV detection in cervical secretion DNA was extracted using the reagent DNAzol (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. The extracted genetic material was measured by NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (USA, Thermo Fisher Scientific) at 260nm and purity was assessed through 260/280 ratio.

HPV MOLECULAR DETECTION

The presence of viral DNA was verified by Polymerase Chain Reaction (PCR), using the consensus primers *MY09* and *MY11* according to the GenBank access number: AJ236888. Which amplify a conserved region of about 450 bp, of the gene encoding the L1 protein of HPV (BAUER et al., 1991). An amplification control was also performed, using specific primers, *GH20* e *PC04*, for the beta-globin constitutive gene (MARANGON et al., 2013). All reactions were performed together with a negative control, to verify the non-contamination of the reaction with exogenous genetic material. As well as a positive control for the reaction, using DNA obtained from HeLa cells, which contains the genetic material of HPV18 in its genome.

For the cervical cancer group, we assume that virtually 100% of the cervical cancer contain the presence of HPV (SCHIFFMAN et al., 2010).

POLYMORPHISMS GENOTYPING

The regions in which the polymorphisms were found were amplified using primers synthesized according to the following GenBank access number and incubation protocols: For analysis of the rs3761548 of *FOXP3* – NT_079573.4 (Forward: 5'-GGCAGAGTTGAAATCCAAGC -3'; Reverse: 5'-CAACGTGTGAGAAGGCAGAA-3'), initially, a denaturing step consisted of 4 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, with a final extension of 10 minutes at 72°C;

For the rs3087465 of *TGFBR2* – NG_007490.1 (Forward: 5'-GGAATGTCTTGGGCAAATCT-3'; Reverse: 5' ACCTGAATGCTTGTGCTTTTATT-3'), a denaturing step consisted of 5 minutes at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 45 seconds, 59°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds, with a final extension of 10 minutes at 72°C;

For the *TGFB1* polymorphisms rs1800470 and rs1800471 - NG_013364.1 (Forward: 5-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3'; Reverse: 5-GCCGCAGCTTGG ACAGGATC-3'), a denaturing step consisted of 10 minutes at 96°C, followed by 35 cycles of 96°C for 75 seconds, 62°C for 75 seconds, and 73°C for 75 seconds, with a final extension of 5 minutes at 73°C.

After PCR amplification, the fragments were submitted to enzymatic restriction to determine the different genotypes.

For rs3761548 polymorphism genotyping of *FOXP3*, a region containing 155 bp was amplified, and then subjected to enzymatic cleavage by the *Pst I* enzyme (Promega, USA) (Allele A: 155 bp; Allele C: 80 bp, 75 bp). Genotyping of the rs3087465 polymorphism of *TGFBR2* was performed by the amplification of a 152 bp region subjected to cleavage by the *Taal* enzyme (*HpyCH4III*) (New England Biolabs Inc.) (Allele G: 152 bp; Allele A: 93 bp, 59 bp). A single 294 bp fragment was used for genotyping of polymorphisms rs1800470 and rs1800471, which were subjected to cleavage by the *MspA1-I* enzyme (New England Biolabs Inc.), for analysis of the rs1800470 polymorphism (Allele C: 149 bp, 67 bp, 40 bp, 26 bp e 12 bp; Allele T: 161 bp, 67 bp, 40 bp and 26 pb), and *Bgl-I* enzyme (Promega), for rs1800471 analysis (Allele G: 131 bp, 103 bp e 60bp; Allele C: 163 bp and 131bp). All enzymatic restriction reactions followed the instructions provided by the manufacturers.

STATISTICAL ANALYSIS

Differences between the dependent and independent variables of categorical data were assessed by chi-square or Fisher's exact test as appropriate and expressed as absolute number and percentage (%). For continuous data, Student's t-test or Mann-Whitney test was used, according to the normality evaluation by the Shapiro-Wilk test. Continuous data results are expressed as means and \pm standard deviation (σ) for parametric or median tests and interquartile range (IQR) for non-parametric tests.

The sociodemographic or reproductive and sexual behavior variables that presented significant differences were applied in a mathematical model of binary logistic regression, using the forward stepwise method based on the likelihood ratio, to obtain a better model than the non-predictors evaluated by the Hosmer-Lemeshow test, and to establish possible confounding factors to analyze the role of SNPs in cervical cancer and staging (FIGO) independently. The effect of these data was evaluated by the calculation of odds ratios (OR) with a confidence interval (CI) of 95%.

Statistical analyzes were performed by SPSS Statistics 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), using a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS

COMPARISONS BETWEEN STUDY GROUPS

This study was performed with a total of 156 women, of whom 107 with no cervical lesion and 49 with cervical cancer diagnosis. Among the control group, 21 (19.6%) had HPV infection and 86 (80.4%) were free of any HPV infection. Among the cervical cancer group, 28 (57.15%) were classified by FIGO staging, in stages I to IIB, and 21 (42.85%) from III to IVB (Table 1). There was no significant difference between the mean age of the control group (49 years \pm 8.37) and the cervical cancer group (53 years \pm 13.96) ($p=0.08$).

Table 1– Characterization of study groups

	n	(%)
Groups of study	156	100%
Control	107	68.6%
Cervical cancer	49	31.4%
HPV infection		
Control (HPV-)	86	80.4%
Control (HPV+)	21	19.6%
Staging (FIGO)		
I - IIB	28	57.15%
III - IVB	21	42.85%

HPV - *Human papillomavirus*; FIGO- International Federation of Gynecology and Obstetrics. Results are expressed as absolute number and percentage (%).

RESULTS OF SOCIODEMOGRAPHIC DATA

Cervical cancer development was associated to non-knowledge about HPV ($p=0.023$) and their transmission forms ($p<0.01$), family income of at most 1 minimum wage ($p<0.01$), absence or low schooling ($p<0.01$), smoking habit ($p<0.01$) and the absence of previous preventive tests ($p=0.026$). While family history ($p=0.836$), ethnicity ($p=0.377$), marital status ($p=0.069$) despite showing a significant trend, presented no association with the cervical cancer development (Table 2).

No sociodemographic variable evaluated in this study was related to the disease clinical staging, being these knowledge about HPV ($p=0.471$) and their forms of transmission ($p=0.565$), family income ($p=0.634$), schooling ($p=0.598$), smoking ($p=0.243$), previous preventive exams ($p=0.741$), family history of cancer ($p=0.369$), marital status ($p=0.361$) and ethnicity ($p=0.737$) (Table 2).

Table 2 – Sociodemographic characteristics of the Control, Cervical Cancer and Staging groups.

Variables	Control		Cervical cancer		I - IIB		Staging (FIGO) III – IVB	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Knowledge about HPV								
No	18	16.8	18	36.7*	11	39.3	7	33.3
Heard about	67	62.6	23	46.9	14	50	9	42.9
Yes	22	20.6	8	16.4	3	10.7	5	23.8
Know the form of HPV transmission								
No	50	46.7	37	75.5**	22	78.6	15	71.4
Yes	57	53.3**	12	24.5	6	21.4	6	28.6
Family cancer history								
No	90	84.1	41	85.4	25	89.3	16	80
Yes	17	15.9	7	14.6	3	10.7	4	20
Marital status								
Single	7	6.5	0	0	0	0	0	0
Married	73	68.2	29	59.2	19	67.9	10	47.6
Divorced	18	16.8	11	22.4	5	17.9	6	28.6
Widow	9	8.5	9	18.4	4	14.2	5	23.8
Family income^a								
Up to 1 minimum wage	31	30.1	29	64.4**	16	61.5	13	68.4
> 1 minimum wage	72	69.9**	16	35.6	10	38.5	6	31.6
Education^b								
(A)	43	40.2	35	73**	21	77.8	14	66.7
(B)	16	15	5	10.4	3	11.1	2	9.5
(C)	37	34.6**	4	8.3	2	7.4	2	9.5
(D)	11	10.2	4	8.3	1	3.7	3	14.3
Smoking habit^c								
No	92	86**	28	57.1	14	50	14	66.7
Yes	15	14	21	42.9**	14	50	7	33.3
Preventive Examinations								
No	3	2.8	6	12.5*	3	11.1	3	14.3
Yes	104	97.2*	42	87.5	24	88.9	18	85.7

Ethnicity^d

Caucasian	55	51.9	29	59.2	16	57.1	13	61.9
Not Caucasian	51	48.1	20	40.8	12	42.9	8	38.1

FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics; HPV - *Human papillomavirus*. Statistical analysis performed by Chi-square (χ^2) or Fisher's exact test as appropriate. Data were expressed as absolute number and percentage (%). Significant difference $p < 0.05$ (*). Significant difference $p < 0.01$ (**). ^a Based on the Brazilian minimum wage (approximately U\$ 250.00). ^b Based on the Brazilian educational system, (A) absent from school or incomplete elementary school; (B) Complete primary education; (C) High school complete or incomplete; (D) Complete and incomplete higher education. ^c Non-smokers include women who have quit smoking for more than 6 months. ^d Ethnic information was used by self-declaration.

REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS AND SEXUAL BEHAVIOR

Analyzing reproductive characteristics and sexual behavior it was observed an association between the cervical cancer development and high number of pregnancies ($p=0.017$) and number of vaginal birth ($p=0.002$). While the age of menarche ($p=0.656$), number of abortions ($p=0.891$) and age at sexual debut ($p=0.156$) were not associated to the cervical cancer development (Table 3).

No numerical variables of reproductive traits and sexual behavior were correlated to cervical cancer staging, as the age of the menarche ($p=0.334$), number of pregnancies ($p=0.417$), vaginal birth ($p=0.474$), abortions ($p=0.386$) and age at sexual debut ($p=0.449$) (Table 3).

Table 3 – Numerical variables for reproductive characteristics and sexual behavior of the Control, Cervical cancer and Staging groups.

Variables	Control		Cervical cancer		I - IIB		Staging (FIGO) III – IVB	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
Menarche (years)	13	± 2	12	± 3	13	± 2	12	± 3
Pregnancies	3	± 1	3	± 3*	3	± 2	4	± 4
Vaginal birth	1	± 2	2	± 2**	2	± 2	2.5	± 4
Abortion	0	± 1	0	± 1	0	± 1	0	± 1
Sexual debut (years)	18	± 4	17	± 3	18	± 4	17	± 2

FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics. Continuous data were evaluated by the Mann-Whitney test and expressed as medians and interquartile range (IQR). Significant difference $p < 0.05$ (*). Significant difference $p < 0.01$ (**).

When we analyzed reproductive characteristics and sexual behavior, categorically, it was observed that the age of menarche ($p=0.419$), use of oral contraceptives ($p=0.185$) or condoms during sex ($p=0.722$), types of births ($p=0.079$), having had an abortion ($p=0.807$), age at sexual debut ($p=0.140$) and number of partners during life, although this showed a tendency ($p=0.064$), no statistical differences associated to the cervical cancer development were observed (Table 4).

In relation to disease staging, having 4 or more sexual partners during lifetime was associated with a worse disease prognosis ($p=0.014$). While the age of menarche ($p=0.322$), use of oral contraceptives ($p=0.838$), use of condoms during sexual intercourse ($p=0.856$), types of births ($p=0.465$), abortion ($p=0.436$) and age at sexual debut ($p=0.771$) were not associated to disease staging (Table 4).

Table 4 – Categorical variables for reproductive characteristics and sexual behavior of the Control, Cervical cancer and Staging groups.

Variables	Control		Cervical cancer		Staging (FIGO)			
	n	%	n	%	I - IIB		III - IVB	
					n	%	n	%
Menarche (years)								
Up to 12	45	42.1	24	49	12	42.9	12	57.1
13 or more	62	57.9	25	51	16	57.1	9	42.9
Oral contraceptives								
No	88	82.2	35	72.9	20	74.1	15	71.4
Yes	19	17.8	13	27.1	7	25.9	6	28.6
Condom use								
No	100	93.5	46	95.8	26	96.3	20	95.2
Yes	7	6.5	2	4.2	1	3.7	1	4.8
Types of births								
Never gestated	4	3.7	1	2	1	3.6	0	0
Vaginal birth	43	40.2	28	57.1	18	64.3	10	47.7
Cesarean section	35	32.7	7	14.3	3	10.7	4	19
Both types	25	23.4	13	26.5	6	21.4	7	33.3
Abortions								
No	72	67.3	32	65.3	17	60.7	15	71.4
Yes	35	32.7	17	34.7	11	39.3	6	28.6
Sexual debut (years)								
Up to 17	40	37.4	24	50	13	48.1	11	52.4
18 or more	67	62.6	24	50	14	51.9	10	47.6
Lifetime sexual partners								
1 to 3	86	80.4	32	66.7	22	81.5*	10	47.6
4 or more	21	19.6	16	33.3	5	18.5	11	52.4*

FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics. Statistical analysis of categorical data was assessed using the Chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test as appropriate. The data were expressed as absolute number and percentage (%). It was adopted as significant difference $p < 0.05$ (*).

ANALYSIS OF INDEPENDENTLY SNPs ASSOCIATED TO CERVICAL CANCER DEVELOPMENT AND STAGING

The genotypic distribution for the rs3761548 (*FOXP3*), rs3087465 (*TGFBR2*), rs1800470 and rs1800471 (*TGFB1*) are demonstrated in Table 5.

A mathematical model of binary logistic regression was developed, which includes the following categorical variables: family income, schooling, smoking

and numbers of lifetime sexual partners as confounding factors. Thus, we can independently evaluate the SNPs with the development of cervical cancer.

The AA genotype of *FOXP3* polymorphism rs3761548, when evaluated in its codominant (OR=3.461 and CI95%=1.136 – 10.540; p=0.029) and recessive models (p=0.049) was independently associated to the cervical cancer development (Table 5).

For the rs3087465 polymorphism of *TGFBR2*, the AG genotype (OR=8.093 and CI95%=1.272 – 51.472; p=0.027), GG genotype (OR=10.753 and CI95%=1.589 – 72.762; p=0.015) and were associated to the cancer cervical development both in their codominant models, as well as dominant model (p=0.016) (Table 5).

TGFB1 rs1800470 was associated to protection against cervical cancer, being related to this protective effect the CT (OR=0.133 and CI95%=0.031 – 0.576; p=0.007) and TT genotypes (OR=0.243 and CI95%=0.062 – 0.953; p=0.043) both in their codominant models, and in their dominant model (OR=0.186 and CI95%=0.052 – 0.659; p=0.009) (Table 5).

The dominant model (p=0.06) for *FOXP3* rs3761548, as well as recessive model (p=0.573) for *TGFBR2* rs3087465, and recessive model (p=0.834) of rs1800470 and codominant model (p=0.548) of rs1800471, both of *TGFB1*, showed no statistical differences regarding cervical cancer development (Table 5).

Table 5 – Genotypic distribution of single nucleotide polymorphisms between the Control and Cervical Cancer groups, adjusted by the mathematical model of binary logistic regression.

Genotype models	Control		Cervical cancer		OR	CI _{95%}
	n	%	n	%		
FOXP3 – codominant						
CC	53	49.5	18	37.5	1	Reference
AC	38	35.5	15	31.25	1.795	(0.664 – 4.856)
AA	16	15	15	31.25	3.461*	(1.136 – 10.540)
FOXP3 – dominant						
CC	53	49.5	18	37.5	1	Reference
AA / AC	54	50.5	30	62.5	2.344	(0.966 – 5.690)
FOXP3 – recessive						
CC / AC	91	85	33	68.7	1	Reference
AA	16	15	15	31.3	2.722*	(1.005 – 7.374)
TGFB2 – codominant						
AA	25	23.4	2	4.1	1	Reference
AG	48	44.8	24	49	8.093*	(1.272 – 51.472)
GG	34	31.8	23	46.9	10.753*	(1.589 – 72.762)
TGFB2 – dominant						
AA	25	23.4	2	4.1	1	Reference
AG / GG	82	76.6	47	95.9	9.176*	(1.505 – 55.926)
TGFB2 – recessive						
AA / AG	73	68.2	26	53.1	1	Reference
GG	34	31.8	23	46.9	1.913	(0.794 – 4.608)
TGFB29 – codominant						
CC	10	9.3	9	31	1	Reference
CT	49	45.8	9	31	0.133**	(0.031 – 0.576)
TT	48	44.9	11	38	0.243*	(0.062 – 0.953)
TGFB29 – dominant						
CC	10	9.3	9	31	1	Reference
CT / TT	97	90.7	20	69	0.186**	(0.052 – 0.659)
TGFB29 – recessive						
CC / CT	59	55.1	18	62.1	1	Reference
TT	48	44.9	11	37.9	0.896	(0.319 – 2.515)
TGFB74 – codominant						
GG	100	93.5	27	93.1	1	Reference
CG	7	6.5	2	6.9	1.829	(0.255 – 13.104)

OR - Odds ratio; CI_{95%}- 95% confidence interval; *FOXP3* = rs3761548; *TGFB2* = rs3087465; *TGFB29* = rs1800470; *TGFB74* = rs1800471. The following variables were included in the logistic regression model: Family income, schooling, smoking and numbers of lifetime sexual partners. Data were expressed as absolute number and percentage (%). Significant difference $p < 0.05$ (*). Significant difference $p < 0.01$ (**).

Through a mathematical model of binary logistic regression, which includes the categorical variable numbers of lifetime sexual partners as a confounding factor of the analysis, we can verify that all SNPs in this study, when independently assessed, did not show statistical differences with staging of the disease: the codominant (AC vs CC $p=0.097$; AA vs CC $p=0.867$) dominant ($p=0.246$) and recessive ($p=0.508$) models for the *FOXP3* rs3761548; the codominant (AG vs AA $p=0.414$; GG vs AA $p=0.330$), dominant ($p=0.350$) and

recessive ($p=0.609$) models for the *TGFBR2* rs3087465; and for the polymorphisms of *TGFB1*, the rs1800470 in its codominant (CT vs CC $p=0.991$; TT vs CC $p=0.421$), dominant ($p=0.589$) and recessive ($p=0.359$) models; and for rs1800471, the codominant model ($p=1.000$) (Table 6).

Table 6 – Genotypic distribution of single nucleotide polymorphisms according to staging, adjusted by the mathematical model of binary logistic regression.

Genotype models	Staging (FIGO)				OR	CI _{95%}
	I - IIB		III - IVB			
	n	%	n	%		
FOXP3 - codominant						
CC	12	44.4	6	28.6	1	Reference
AC	6	22.2	9	42.9	3.801	(0.784 – 18.441)
AA	9	33.3	9	28.6	1.149	(0.226 – 5.840)
FOXP3 – dominant						
CC	12	44.4	6	28.6	1	Reference
AA / AC	15	55.6	15	71.4	0.452	(0.118 – 1.728)
FOXP3 – recessive						
CC / AC	18	66.7	15	71.4	1	Reference
AA	9	33.3	6	28.6	0.614	(0.145 – 2.597)
TGFBR2 – codominant						
AA	4	14.3	2	9.5	1	Reference
AG	12	42.9	10	47.6	2.389	(0.296 – 19.269)
GG	12	42.9	9	42.9	2.903	(0.340 – 24.815)
TGFBR2 – dominant						
AA	4	14.3	2	9.5	1	Reference
AG / GG	24	85.7	19	90.5	2.600	(0.391 – 13.214)
TGFBR2 – recessive						
AA / AG	16	57.1	12	57.1	1	Reference
GG	12	42.9	9	42.9	1.387	(0.395 – 4.871)
TGFB29 – codominant						
CC	4	26.7	5	35.7	1	Reference
CT	4	26.7	5	35.7	0.988	(0.113 – 8.638)
TT	7	46.7	4	28.6	0.442	(0.060 – 3.230)
TGFB29 – dominant						
CC	4	26.7	5	35.7	1	Reference
CT / TT	11	73.3	9	64.3	0.612	(0.103 – 3.643)
TGFB29 – recessive						
CC / CT	8	53.3	10	71.4	1	Reference
TT	7	46.7	4	28.6	0.444	(0.079 – 2.513)
TGFB74 - codominant						
GG	13	86.7	13	92.9	1	Reference
CG	2	13.3	1	7.1	1.000	(0.072 – 13.869)

FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics; OR - Odds ratio; CI_{95%} - 95% confidence interval. *FOXP3* = rs3761548; *TGFBR2* = rs3087465; *TGFB29* = rs1800470; *TGFB74* = rs1800471. It was included in the logistic regression model the categorical variable numbers of lifetime sexual partners. Data were expressed as absolute number and percentage (%). It was adopted as significant difference $p<0.05$.

DISCUSSION

In the present study we evaluated 49 cervical cancer patients and 107 healthy women, for the influence of sociodemographic characteristics,

reproductive traits, sexual behavior, and the presence of the polymorphisms rs1800470 (*TGFB1*), rs1800471 (*TGFB1*), rs3087465 (*TGFBR2*) and rs3761548 (*FOXP3*) on the cervical cancer development.

We have shown that women who had no knowledge about HPV and how it spreads, as well as low or no schooling, low income, and women who do not usually perform preventive exams were associated to the cervical cancer development. This fact corroborates with other studies, which demonstrated that patients with cervical cancer in several populations have a low level of knowledge about their disease, and do not attend disease screening programs. While a higher income demonstrated to be a protective factor against cervical cancer, being related to favorable attitudes towards a higher medical frequency and efficient screening of the disease (KAHESA et al., 2012; KOKANE et al., 2015; SHRESTHA; SAHA; TRIPATHI, 2013). Although our work presented only a tendency for the variable marital status for the development of cervical cancer, Kahesa et al. (2012) demonstrated that married women have a greater acceptance of cervical cancer screening programs, which would provide better treatment in the early stages, consequently reducing the incidence of the disease.

We also demonstrated that smokers were more likely to cervical cancer development. Just as the work of Louie et al. (2011), presenting the smoking habit as a high risk factor for the development of cervical cancer, and this risk can be doubled if the smoker lives with a partner who also smokes, demonstrating a synergistic effect of direct smoking, concomitant with passive smoking. However, passive smoking assessed independently, in the absence of active smoking, has not been shown to be a risk factor.

Tobacco smoke contains carcinogenic substances, which demonstrate a direct transformation effect on the cervix, which may cause immunosuppression, inhibition of apoptotic pathways and also blocking of antitumor proteins, favoring the persistence of HPV infections, and contributing to the tumor development (HEUSCH, 1998; IWATA et al., 2015).

Our work has also shown that the high number of pregnancies is related to the development of cervical cancer. Similar to data shown by Kahesa et al. (2012), that women who have less than 2 children are more likely to participate in disease screening programs than women with more than 5 children, favoring an early diagnosis which in turn promotes the non-development of the disease.

In addition to the fact that they are less frequent in disease screening programs, high parity is also shown to be related to cervical cancer for nutritional (HO et al., 1998) and hormonal factors (ARBEIT; HOWLEY; HANAHAN, 1996), due to high maintenance of the transformation zone of the uterine cervix, the metaplasia development, and also increased vascularization for many years due to gestations, which may favor HPV infection and tumor development (FREEMAN-WANG; WALKER, 2011; MUÑOZ et al., 2006).

A finding not commonly explored among authors of the area, which we demonstrated, was the association of the number of vaginal births with the development of cervical cancer. Similar to that observed by Hildesheim et al. (2001), which showed a trend ($p=0.05$) for vaginal births, with high grade lesions and cervical cancer.

Regarding the number of lifetime sexual partners, we demonstrated a trend in women who had a greater number of sexual partners, with the development of cervical cancer. Similar to the result of a meta-analysis, involving 41 studies, which concludes that the number of sexual partners is directly related to the development of cervical cancer, even in regions where there is a broad implementation of HPV vaccines (LIU et al., 2015).

When we evaluated the number of lifetime sexual partners with staging of the disease, it was observed that women with 4 or more partners had a worse prognosis of the disease. This finding could be supported by the fact that women with multiple partners during life could have greater contact with more than one viral type, which has already been shown to be a worse prognosis for cervical cancer, leading to a lower survival rate of these patients (GENTA et al., 2017).

Analyzing the effect of SNPs independently, we observed a high risk for the development of cervical cancer in women who presented the A allele in homozygous for rs3761548 in the *FOXP3* gene. But for endometrial cancer in Chinese women, it has already been shown that the A allele is related to protection against the development of the disease, however, this allele was more frequent in endometrial cancer with cervical invasion (YOU et al., 2018). As for breast cancer in a Brazilian population, an association between the AA genotype of this same polymorphism was associated with the development of triple negative breast cancer, as well as an increase of the FOXP3 protein in the tumor microenvironment (LOPES et al., 2014).

Luo et al. (2015) demonstrated that high concentrations of FOXP3 are related to the development of premalignant lesions and cervical cancer. Furthermore was demonstrated that the silencing of FOXP3 expression in cervical cancer cell cultures favors the decrease of cyclin dependent kinase inhibitor 2A, resulting in cell cycle progression and increases of apoptosis.

When evaluating the *TGFBR2* polymorphism rs3087465, a susceptibility to the development of cervical cancer was demonstrated for this polymorphism in heterozygosity, and an even greater risk when it was doubly mutated (GG genotype). It has been demonstrated that in normal epithelial cells, the presence of the G allele promotes a greater expression of *TGFBR2* (SEIJO et al., 2001). However, for gastric and breast cancers, demonstrated in a meta-analysis performed by Huang et al. (2014) this polymorphism presented a protective effect over these cancers.

TGFBR2 is the first receptor in which TGF β binds, promoting cell signaling. This pathway, besides being responsible for the immune regulation, can be routed basically to 2 different characteristics: 1- Tumorigenesis by cell growth, cell mobility and angiogenesis 2- tumor suppression, arrested growth and apoptosis (DRABSCH; TEN DIJKE, 2012). In cultures of cervical cancer cells treated with TGF β 1, it was not able to change the cell growth (THACKER; KARUNAGARAN, 2015; WANG et al., 2018), suggesting that the increase of this pathway is related to cervical cancer, by the characteristic of TGF β in generating immunosuppression, which may be related to a higher HPV establishment and also a decrease in immune response to the tumor (ALCOCER-GONZÁLEZ et al., 2006)

For the rs1800470 polymorphism of *TGFB1*, we demonstrated that the heterozygous genotype (CT genotype) and mutated homozygote (TT genotype) in the codominant model, as well as the dominant model, have protective effects against the development of cervical cancer. Susianti et al. (2014) demonstrated that the mutate allele is related to the decrease of the TGFB1 protein. The ancestral allele (C) is responsible for coding a proline, which is related to the effectiveness of its translocation to the membrane of the endoplasmic reticulum, whereas the substitution by a T allele leads to the coding of a leucine, causing in changes in the hydrophobic region of the peptide signal of TGFB1.

It has already been demonstrated that the expression of TGFB1 increases gradually according to the degree of cervical lesion, in addition to being

increased in the cervical cancer as compared to the control group. This is because tumor progression is involved with increased cytokine profile of regulatory T cells, causing immunosuppression (PEGHINI et al., 2012; SHEU et al., 2001). TGF β may also lead to increased expression of FOXP3, increasing the activity of regulatory T cells (DAVIDSON et al., 2007; LI et al., 2006) favoring tumorigenesis (DRABSCH; TEN DIJKE, 2012).

Although we know the ability of these SNPs to alter the levels of proteins related to the regulation of the immune system, when we evaluated these with the staging of the disease, they did not present statistical differences.

Increasingly, promising new studies have been proposed which use immune regulation to obtain a complete elimination of some cancers in advanced stages, as observed in cervical cancer (STEVANOVIĆ et al., 2015, 2017) among other cancers (RADVANYI, 2018; SEIWERT et al., 2016; ZACHARAKIS et al., 2018). Our study has shown that polymorphisms in the *FOXP3* and *TGFBR2* gene may offer a high risk of cervical cancer development, while changes in the *TGFBI* gene may have a protective effect against cancer. These data together can trace a search for better treatments, involving genetic standards, for a better control of the immune profile, related to immune regulation.

In addition, we demonstrated with sociodemographic findings, reproductive traits and sexual behaviors, a need for greater improvements investment in the Brazilian educational system, as well as the need for a greater spread of awareness campaigns about habits that are related to prevention against cervical cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible, the Intermunicipal Consortium of Health of the Middle Paranapanema (Cismepar), University Hospital and Clinic Center of State University of Londrina, Londrina Cancer Hospital (HCL) and Municipal Health Department of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) and the Londrina State University Graduate Coordination (PROPPG-UEL).

REFERENCES

ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M. et al. In Vivo Expression of Immunosuppressive Cytokines in Human Papillomavirus-Transformed Cervical Cancer Cells. **Viral Immunology**, v. 19, n. 3, p. 481–491, set. 2006.

ARBEIT, J. M.; HOWLEY, P. M.; HANAHAN, D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 7, p. 2930–2935, 2 abr. 1996.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 6, p. 593–601, ago. 2004.

BANDUKWALA, H. S. et al. Structure of a Domain-Swapped FOXP3 Dimer on DNA and Its Function in Regulatory T Cells. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 479–491, abr. 2011.

BAUER, H. M. et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 4, p. 472–7, 1991.

DAVIDSON, T. S. et al. Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3+ T Regulatory Cells. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4022–4026, 1 abr. 2007.

DRABSCH, Y.; TEN DIJKE, P. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 553–568, 20 dez. 2012.

FREEMAN-WANG, T.; WALKER, P. Colposcopy in special circumstances: Pregnancy, immunocompromise, including HIV and transplants, adolescence and menopause. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 5, p. 653–665, out. 2011.

HAMMES, L. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression—Clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 157–165, abr. 2007.

HEUSCH, W. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 4, p. 551–556, 1 abr. 1998.

HILDESHEIM, A. et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 9, p. 1219–1226, 5 maio 2001.

HO, G. Y. F. et al. Viral characteristics of human papillomavirus infection and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. **International Journal of Cancer**, v. 78, n. 5, p. 594–599, 23 nov. 1998.

HUANG, Y. et al. Association between the TGFBR2 G-875A Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from a Meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 20, p. 8705–8708, 6 nov. 2014.

IWATA, T. et al. Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 126–133, 1 fev. 2015.

KAHESA, C. et al. Determinants of acceptance of cervical cancer screening in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, p. 1093, 19 dez. 2012.

KOKANE, A. et al. Knowledge, attitude, and practices related to cervical cancer among adult women: A hospital-based cross-sectional study. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 324, 2015.

LI, M. O. et al. TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 99–146, abr. 2006.

LIU, Z.-C. et al. Multiple Sexual Partners as a Potential Independent Risk Factor for Cervical Cancer: a Meta-analysis of Epidemiological Studies. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 9, p. 3893–3900, 18 maio 2015.

LOPES, L. F. et al. FOXP3 Transcription Factor: A Candidate Marker for Susceptibility and Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

LOUIE, K. S. et al. Smoking and Passive Smoking in Cervical Cancer Risk: Pooled Analysis of Couples from the IARC Multicentric Case-Control Studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 7, p. 1379–1390, 1 jul. 2011.

LUCIANI, S. et al. Cervical and female breast cancers in the Americas: current situation and opportunities for action. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 9, p. 640–649, 1 set. 2013.

LUO, Q. et al. Roles of Foxp3 in the occurrence and development of cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 8, n. 8, p. 871-30, 2015.

MARANGON, A. V. et al. The Association of the Immune Response Genes to Human Papillomavirus-Related Cervical Disease in a Brazilian Population. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

MASSAGUÉ, J. TGF β signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 616–630, 20 out. 2012.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. S1–S10, ago. 2006.

GENTA, M. L. N. D. et al. Multiple HPV genotype infection impact on invasive cervical cancer presentation and survival. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182854, 22 ago. 2017.

PEGHINI, B. C. et al. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 920–926, set. 2012.

RADVANYI, L. G. Targeting the cancer mutanome of breast cancer. **Nature Medicine**, v. 24, n. 6, p. 703–704, 4 jun. 2018.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, set. 2007.

SCHIFFMAN, M. et al. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3159–3169, 15 abr. 2010.

SEIJO, E. R. et al. Identification of genetic alterations in the TGF β type II receptor gene promoter. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 483, n. 1–2, p. 19–26, nov. 2001.

SEIWERT, T. Y. et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 7, p. 956–965, jul. 2016.

SERRANO, B. et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 14–26, fev. 2018.

SHEN, Z. et al. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 1–2, p. 226–241, jan. 2010.

SHEU, B.-C. et al. Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2972–2978, 1 set. 2001.

SHRESTHA, J.; SAHA, R.; TRIPATHI, N. Knowledge, Attitude and Practice regarding Cervical Cancer Screening Amongst Women visiting Tertiary Centre in Kathmandu, Nepal. **Nepal Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 2, 14 out. 2013.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. S16–S22, mar. 2006.

STEVANOVIĆ, S. et al. Complete Regression of Metastatic Cervical Cancer After Treatment With Human Papillomavirus–Targeted Tumor-Infiltrating T Cells. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 14, p. 1543–1550, 10 maio 2015.

STEVANOVIĆ, S. et al. Landscape of immunogenic tumor antigens in successful immunotherapy of virally induced epithelial cancer. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 200–205, 14 abr. 2017.

SUSIANTI, H. et al. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- β 1 due to T869C polymorphism of TGF β 1 associated with lupus renal fibrosis. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 514, 2014.

TAUBENSCHUSS, E. et al. The L10P polymorphism and serum levels of transforming growth factor beta1 in human breast cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 15376–15385, 2013.

THACKER, P. C.; KARUNAGARAN, D. Curcumin and Emodin Down-Regulate TGF- β Signaling Pathway in Human Cervical Cancer Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120045, 18 mar. 2015.

WANG, X. et al. LncRNA PVT1 promotes the growth of HPV positive and negative cervical squamous cell carcinoma by inhibiting TGF- β 1. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 70, 8 dez. 2018.

WOOD, N. A. . et al. Identification of human TGF- β 1 signal (leader) sequence polymorphisms by PCR-RFLP. **Journal of Immunological Methods**, v. 234, n. 1–2, p. 117–122, fev. 2000.

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, maio 2018.

ZACHARAKIS, N. et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. **Nature Medicine**, v. 24, n. 6, p. 724–730, 4 jun. 2018.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento do Câncer Cervical está associado a fatores como o não conhecimento sobre o HPV e suas formas de transmissão, a uma baixa ou nenhuma escolaridade, baixa renda, a não realização de exames preventivos, hábito tabagista, maiores números de gestações e partos normais. Enquanto que o maior número de parceiros sexuais durante a vida foi associado a um estadiamento da doença mais avançado.

Os polimorfismos rs3087465 no gene do *TGFBR2* e rs3761548 do *FOXP3* oferecem um alto risco de desenvolvimento do câncer cervical, enquanto que o rs1800470 do *TGFB1* apresentou um efeito protetor.

Sendo assim, nossos dados podem auxiliar na busca por melhorias no tratamento do câncer cervical, buscando elucidar padrões genéticos e suas influências no microambiente tumoral. Além disso, demonstramos com os dados sociodemográficos, de características reprodutivas e comportamentos sexuais, a necessidade de maiores investimentos no sistema educacional brasileiro, bem como a necessidade de maior divulgação de campanhas de conscientização sobre os hábitos relacionados à prevenção contra o câncer cervical.

REFERÊNCIAS

- 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, 28 out. 2013.
- ANDERSEN, J. M.; AL-KHAIRY, D.; INGALLS, R. R. Innate Immunity at the Mucosal Surface: Role of Toll-Like Receptor 3 and Toll-Like Receptor 9 in Cervical Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens¹. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 5, p. 824–831, 1 maio 2006.
- ARALDI, R. P. et al. Papillomaviruses: A systematic review. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 1–21, 2017.
- AWAD, M. R. et al. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**, v. 66, n. 8, p. 1014–20, 1998.
- BAE, H. W. et al. Characterization of the Promoter Region of the Human Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 49, p. 29460–29468, 8 dez. 1995.
- BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 30, n. 6, p. 593–601, ago. 2004.
- BANDUKWALA, H. S. et al. Structure of a Domain-Swapped FOXP3 Dimer on DNA and Its Function in Regulatory T Cells. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 479–491, abr. 2011.
- BATES, G. J. et al. Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 34, p. 5373–5380, dez. 2006.
- BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 35–56, out. 2013.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.
- BILANDZIC, M.; STENVERS, K. L. Reprint of: Betaglycan: A multifunctional accessory. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 359, n. 1–2, p. 13–22, 2012.
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 1 nov. 2010.
- BOJILOVA, E. D. et al. Extrachromosomal HPV-16 LCR transcriptional activation by HDACi opposed by cellular differentiation and DNA integration. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 75526–75538, 2016.

BOLATTI, E. M. et al. Natural history of human papillomavirus infection of sun-exposed healthy skin of immunocompetent individuals over three climatic seasons and identification of HPV209, a novel betapapillomavirus. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 6, p. 1334–1348, 2017.

BONEWALD, L. F. et al. Latent forms of transforming growth factor-beta (TGF beta) derived from bone cultures: identification of a naturally occurring 100-kDa complex with similarity to recombinant latent TGF beta. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 5, n. 6, p. 741–51, 1991.

BORZACCHIELLO, G. et al. 1st International Workshop on Papillomavirus E5 Oncogene-A report. **Virology**, v. 408, n. 2, p. 135–137, 2010.

BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 183–190, nov. 2002.

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–322, 2009.

BRASIL. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. **INCA** 2017.

BRAVO, I. G.; DE SANJOSE, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 432–438, 2010.

BRINTON, L. A. et al. Sexual and Reproductive Risk Factors for Invasive Squamous Cell Cervical Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 79, n. 1, p. 23–30, jul. 1987.

BROADGATE, S. et al. Diabetic macular oedema: under-represented in the genetic analysis of diabetic retinopathy. **Acta Ophthalmologica**, v. 96, p. 1–51, abr. 2018.

BRUNKOW, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 68–73, 1 jan. 2001.

CAESTECKER, M. P. DE; PIEK, E.; ROBERTS, A. B. Role of Transforming Growth Factor- Signaling in Cancer AS. v. 92, n. 17, 2000.

CAETANO, R. et al. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 99–118, jul. 2006.

CALIFORNIA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, C. E. P. Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency. **Tobacco control**, v. 6, n. 4, p. 346–53, 1 dez. 1997.

CAMBIEN, F. et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 881–7, nov. 1996.

- CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 249–261, nov. 2002.
- CAMPO, M. S. et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. **Virology**, v. 407, n. 1, p. 137–142, nov. 2010.
- CHATILA, T. A. et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 75–81, 2000.
- CHEN, A. C.-H. et al. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 10, p. 1792–1796, 1 out. 2009.
- CHEN, L. et al. Association of FoxP3 rs3761548 polymorphism with susceptibility to colorectal cancer in the Chinese population. **Medical Oncology**, v. 31, n. 12, p. 374, 22 dez. 2014.
- CHEN, W. et al. Association of WWOX rs9926344 polymorphism with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 7, p. 1239–1247, 2018.
- CHOI, H.-Y. et al. Psychological and genetic risk factors associated with suicidal behavior in Korean patients with mood disorders. **Journal of Affective Disorders**, v. 235, p. 489–498, ago. 2018.
- CHOUHY, D. et al. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. **Journal of General Virology**, v. 94, n. Pt_11, p. 2480–2488, 2013.
- CHOW, L. T. et al. A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions. **Cell Cycle**, v. 8, n. 9, p. 1319–1323, 2009.
- CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, v. 118, n. 6–7, p. 422–449, 2010.
- CLARK, K. L. et al. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. **Nature**, v. 364, n. 6436, p. 412–420, 1993.
- COFFER, P. J.; BURGERING, B. M. T. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 11, p. 889–899, nov. 2004.
- COLLINS, F. S.; BROOKS, L. D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation: Table 1. **Genome Research**, v. 8, n. 12, p. 1229–1231, 1 dez. 1998.
- CONDIT, C. M. et al. The changing meanings of ?mutation:? A contextualized study of public discourse. **Human Mutation**, v. 19, n. 1, p. 69–75, jan. 2002.

COSTANZA, B. et al. Stromal Modulators of TGF- β in Cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 1, p. 7, 6 jan. 2017.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584–596, 30 out. 2015.

DAVY, C.; DOORBAR, J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. **Virology**, v. 368, n. 2, p. 219–226, 2007.

DAVY, C. E. et al. HPV16 E1^{E4} protein is phosphorylated by Cdk2/cyclin A and relocalizes this complex to the cytoplasm. **Virology**, v. 349, n. 1, p. 230–244, 2006.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DE ZOETEN, E. F. et al. Foxp3 processing by proprotein convertases and control of regulatory T cell function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5709–5716, 2009.

DINIZ, N. et al. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 4, p. 1474–1480, 2009.

DOORBAR, J. et al. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. **The EMBO journal**, v. 5, n. 2, p. 355–62, 1986.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525–541, 1 maio 2006.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012.

DUNNING, A. M. et al. A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer research**, v. 63, n. 10, p. 2610–2615, 2003.

ELGERT, K. D.; ALLEVA, D. G.; MULLINS, D. W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 3, p. 275–290, set. 1998.

FIGO COMMITTEE ON GYNECOLOGIC ONCOLOGY. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 125, n. 2, p. 97–8, maio 2014.

FLOESS, S. et al. Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells. **PLoS Biology**, v. 5, n. 2, p. e38, 30 jan. 2007.

FREITAS, A. C. et al. HrHPV E5 oncoprotein: Immune evasion and related immunotherapies. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 1–15, 2017.

GIULIANO, A. R. et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. **The Lancet**, v. 377, n. 9769, p. 932–940, 21 mar. 2011.

GRASSMANN, K. et al. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. **Journal of virology**, v. 70, n. 4, p. 2339–49, 1996.

GRIFFIN, H. et al. Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM. **Modern Pathology**, v. 28, n. 7, p. 977–993, 2015.

GU, X. et al. Transforming Growth Factor beta1 Gene Variation Leu10Pro Affects Secretion and Function in Hepatic Cells. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 11, p. 2901–2909, 2012.

GUO, C. et al. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 9, n. 15, p. 12365–12375, 23 fev. 2018.

GUO, W. et al. Polymorphisms of transforming growth factor- β 1 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma in north China. **International Journal of Immunogenetics**, v. 38, n. 3, p. 215–224, jun. 2011.

GUO, W. et al. Association of polymorphisms in transforming growth factor- β receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 4301–4309, 22 abr. 2012.

HAGENSEE, M. E. et al. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. **Journal of virology**, v. 68, n. 7, p. 4503–5, 1994.

HAMMES, L. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression—Clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 157–165, abr. 2007.

HAO, N.-B. et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 948098, 2012.

HASAN, U. A. et al. TLR9 Expression and Function Is Abolished by the Cervical Cancer-Associated Human Papillomavirus Type 16. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3186–3197, 2007.

HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.

HE. et al. FoxP3 genetic variants and risk of non-small cell lung cancer in the Chinese Han population. **Gene**, v. 531, n. 2, p. 422–425, dez. 2013.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 83–97, mar. 2006.

HERBST-KRALOVETZ, M. M. et al. Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 59, n. 3, p. 212–24, 13 mar. 2008.

HEUSCH, W. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 4, p. 551–556, 1 abr. 1998.

HILDESHEIM, A. et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 9, p. 1219–1226, 5 maio 2001.

HIRATA, B. K. B. et al. FOXP3 Allelic Variants and Haplotype Structures Are Associated with Aggressive Breast Cancer Subtypes. **Disease Markers**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

HORVATH, C. A. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 11, 2010.

HOWLEY, P. M.; PFISTER, H. J. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. **Virology**, v. 479–480, p. 290–296, maio 2015.

HYTTIÄINEN, M.; PENTTINEN, C.; KESKI-OJA, J. Latent TGF- β binding proteins: Extracellular matrix association and roles in TGF- β activation. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 41, n. 3, p. 233–264, 2004.

JAHAN, P. et al. Foxp3 promoter polymorphism (rs3761548) in breast cancer progression: a study from India. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 3785–3791, 13 abr. 2014.

JIANG, W. et al. Association between FOXP3 gene polymorphisms and risk of differentiated thyroid cancer in Chinese Han population. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, n. 5, p. e22104, set. 2017.

KADONAGA, J. et al. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. **Science**, v. 242, n. 4885, p. 1566–1570, 16 dez. 1988.

KAESTNER, K. H. et al. Unified nomenclature for the winged helix / forkhead transcription factors. **Genes & development**, v. 14, n. 2, p. 142–146, 2000.

KARAGIANNIDIS, C. et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 6, p. 1425–1433, dez. 2004.

KASTENHUBER, E. R.; LOWE, S. W. Putting p53 in Context. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062–1078, set. 2017.

KAWACHI, A. et al. Tumor-associated CD204 + M2 macrophages are unfavorable prognostic indicators in uterine cervical adenocarcinoma. **Cancer Science**, v. 109, n. 3, p. 863–870, mar. 2018.

KI, H. J. et al. Transforming growth factor- β receptor 2 gene polymorphisms are associated with end-stage renal disease. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 34, n. 2, p. 93–97, jun. 2015.

KIM, M. et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1930–1935, 2010.

KOSHIOL, J. E. et al. Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 7, p. 1623–1629, 2006.

KUBICZKOVA, L. et al. TGF- β – an excellent servant but a bad master. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 183, 2012.

LEE, S.-M.; GAO, B.; FANG, D. FoxP3 maintains Treg unresponsiveness by selectively inhibiting the promoter DNA-binding activity of AP-1. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3599–3606, 1 abr. 2008.

LEHMANN, O. J. et al. Fox's in development and disease. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 6, p. 339–344, jun. 2003.

LI, B. et al. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4571–4576, 13 mar. 2007.

LI, J. et al. A novel genetic score model of UGT1A1 and TGFB pathway as predictor of severe irinotecan-related diarrhea in metastatic colorectal cancer patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 7, p. 1621–1628, 9 jul. 2016.

LIAO, J. et al. Polymorphisms in the TOX3/LOC643714 and risk of breast cancer in south China. **The International Journal of Biological Markers**, n. 22, p. 172460081875563, 23 abr. 2018.

LOPES, J. E. et al. Analysis of FOXP3 Reveals Multiple Domains Required for Its Function as a Transcriptional Repressor. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3133–3142, 1 set. 2006.

LOPES, L. F. et al. FOXP3 Transcription Factor : A Candidate Marker for Susceptibility and Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

LOUIE, K. S. et al. Smoking and Passive Smoking in Cervical Cancer Risk: Pooled Analysis of Couples from the IARC Multicentric Case-Control Studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 7, p. 1379–1390, 1 jul. 2011.

LU, L. et al. Role of SMAD and Non-SMAD Signals in the Development of Th17 and Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 8, p. 4295–4306, 15 abr. 2010.

LUCIANI, S. et al. Cervical and female breast cancers in the Americas: current situation and opportunities for action. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 9, p. 640–649, 1 set. 2013.

MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1912–1934, 2002.

MANTOVANI, A. et al. Infiltration of Tumours by Macrophages and Dendritic Cells: Tumour-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. In: **Novartis Foundation symposium**. v. 256p. 137–148. 2008.

MARIE, J. C. et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4 + CD25 + regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1061–1067, 4 abr. 2005.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annual review of cell biology**, v. 6, p. 597–641, 1990.

MASSAGUÉ, J. TGF- β signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 753–791, 1998.

MASSAGUÉ, J. TGF β signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 616–630, 20 out. 2012.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 57–79, 10 out. 2013.

MCBRIDE, A. A. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 8, p. 919–927, 2017.

MELIKIAN, A. A et al. Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. **Cancer Letters**, v. 146, n. 2, p. 127–134, nov. 1999.

MICHELIN, D. et al. Regulation of Human Papillomavirus Type 18in Vivo:Effects of Estrogen and Progesterone in Transgenic Mice. **Gynecologic Oncology**, v. 66, n. 2, p. 202–208, ago. 1997.

MIZUGUCHI, T. et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 855–860, 4 ago. 2004.

MOCELLIN, S. et al. Genetic variation and gastric cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. **Gut**, v. 64, n. 8, p. 1209–1219, ago. 2015.

MODIS, Y.; TRUS, B. L.; HARRISON, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **The EMBO journal**, v. 21, n. 18, p. 4754–62, set. 2002.

- MOLLING, J. W. et al. CD4+CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1749–1755, 2007.
- MOORE, E. E. et al. The Roles of Genetic and Environmental Factors on Risk of Cervical Cancer: A Review of Classical Twin Studies. **Twin Research and Human Genetics**, v. 15, n. 1, p. 79–86, 28 fev. 2012.
- MÜNGER, K.; HOWLEY, P.; DI MAIO, D. Human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. **The Papillomaviruses**, v. 39, n. 2007, p. 197–252, 2007.
- NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: Their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 243–254, 2008.
- OZDAMAR, B. et al. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1603–1609, 2005.
- PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3030–3044, 15 jun. 2006.
- PEGHINI, B. C. et al. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 920–926, set. 2012.
- PENG, C. et al. Association study of CACNA1C polymorphisms with large artery atherosclerotic stroke in Chinese Han population. **Neurological Research**, v. 6412, p. 1–6, 23 abr. 2018.
- PINHO, A. D. A.; FRANÇA-JUNIOR, I. Prevenção do câncer de colo do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 1, p. 95–112, mar. 2003.
- PONCELET, A C.; DE CAESTECKER, M. P.; SCHNAPER, H. W. The transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cells. **Kidney international**, v. 56, n. 4, p. 1354–1365, 1999.
- POOJA, S. et al. Strong impact of TGF- β 1 gene polymorphisms on breast cancer risk in Indian women: a case-control and population-based study. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75979, out. 2013.
- PUDNEY, J.; QUAYLE, A. J.; ANDERSON, D. J. Immunological Microenvironments in the Human Vagina and Cervix: Mediators of Cellular Immunity Are Concentrated in the Cervical Transformation Zone1. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 6, p. 1253–1263, 1 dez. 2005.
- RAJ, K. et al. E1^E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. **Journal of Virology**, v. 78, n. 13, p. 7199–7207, 2004.
- RASKIN, L.; RENNERT, G.; GRUBER, S. B. FOXP3 germline polymorphisms are not associated with risk of breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 190, n. 1, p. 40–42, abr. 2009.

SAKAGUCHI, S. NATURALLY ARISING CD4+ REGULATORY T CELLS FOR IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE AND NEGATIVE CONTROL OF IMMUNE RESPONSES. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 531–562, abr. 2004.

SANTIN, A. D. et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5402–10, jul. 1999.

SASADA, T. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies. **Cancer**, v. 98, n. 5, p. 1089–1099, 1 set. 2003.

SCHIFFMAN, M. et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, v. 337, n. 1, p. 76–84, jun. 2005.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, set. 2007.

SCHIFFMAN, M. et al. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3159–3169, 15 abr. 2010.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. K. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. **JNCI Monographs**, v. 2003, n. 31, p. 14–19, 2003.

SCOTT, M. E. et al. Diminished IFN- γ and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1379–1383, 15 mar. 2009.

SCOTT, M.; MAYUMI NAKAGAWA, A. A.-B. M. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 209–220, 2001.

SEIJO, E. R. et al. Identification of genetic alterations in the TGF β type II receptor gene promoter. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 483, n. 1–2, p. 19–26, nov. 2001.

SEKELSKY, J. J. et al. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 139, n. 3, p. 1347–1358, 1995.

SERGENTANIS, T. N. et al. Cytochrome P450 1A1 Gene Polymorphisms and Endometrial Cancer Risk. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 21, n. 2, p. 323–331, fev. 2011.

SHAH, R. et al. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: Characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. **Human Genetics**, v. 119, n. 1–2, p. 61–74, 2006.

SHEN, Z. et al. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 1–2, p. 226–241, jan. 2010.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685–700, jun. 2003.

SHIN, H.-J. et al. Physical Status of Human Papillomavirus Integration in Cervical Cancer Is Associated with Treatment Outcome of the Patients Treated with Radiotherapy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e78995, 10 jan. 2014.

SINGH, P. et al. Association of –330 interleukin-2 gene polymorphism with oral cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 146, n. 6, p. 730, 2017.

SMITH, J. S. et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **The Lancet**, v. 361, n. 9364, p. 1159–1167, abr. 2003.

SMOTKIN, D.; WETTSTEIN, F. O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 13, p. 4680–4, 1986.

SONG, P. et al. Association between FOXP3 polymorphisms and vitiligo in a Han Chinese population. **British Journal of Dermatology**, v. 169, n. 3, p. 571–578, set. 2013.

SONG, X. et al. Structural and Biological Features of FOXP3 Dimerization Relevant to Regulatory T Cell Function. **Cell Reports**, v. 1, n. 6, p. 665–675, jun. 2012.

SOPORI, M. Science and society: Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 5, p. 372–377, maio 2002.

SORRENTINO, A. et al. The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 10, p. 1199–1207, 2008.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. S16–S22, mar. 2006.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.

STAUFFER, Y. et al. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. **Journal of molecular biology**, v. 283, n. 3, p. 529–36, 1998.

STENLUND, A. Initiation of DNA replication: Lessons from viral initiator proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 10, p. 777–785, 2003.

SUN, Y.; HAN, H.; MCCANCE, D. J. Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. **J Gen Virol**, v. 79 (Pt 7), n. 1998, p. 1651–1658, 1998.

- SUPCHOKPUL, A. et al. E4 expression of human papillomavirus in cervical samples with different cytology categories. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 5, p. 1113–1118, 2011.
- SUSIANTI, H. et al. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- β 1 due to T869C polymorphism of TGF β 1 associated with lupus renal fibrosis. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 514, 2014.
- TAUBENSCHUSS, E. et al. The L10P polymorphism and serum levels of transforming growth factor beta1 in human breast cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 15376–15385, 2013.
- TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59–64, 2002.
- TOMMASINO, M. The biology of beta human papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 128–138, 2017.
- TONE, Y. et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. **Nature Immunology**, v. 9, n. 2, p. 194–202, 2008.
- TRIULZI, T. et al. FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 1, p. 30–35, 2013.
- TUNA, M.; AMOS, C. I. Next generation sequencing and its applications in HPV-associated cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8877–8889, 2017.
- VAN DER BURG, S. H. et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12087–12092, 17 jul. 2007.
- VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 115–137, out. 2013.
- VELDMAN, T. et al. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8211–8216, 8 jul. 2003.
- VERMA, S. et al. Significant association between FOXP3 gene polymorphism and steroid-resistant acute rejection in living donor liver transplantation. **Hepatology Communications**, v. 1, n. 5, p. 406–420, jul. 2017.
- WANG, L. et al. Somatic Single Hits Inactivate the X-Linked Tumor Suppressor FOXP3 in the Prostate. **Cancer Cell**, v. 16, n. 4, p. 336–346, out. 2009.
- WANG, X. et al. Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 16, p. 8080–8092, 2011.

WOOD, N. A. . et al. Identification of human TGF- β 1 signal (leader) sequence polymorphisms by PCR-RFLP. **Journal of Immunological Methods**, v. 234, n. 1–2, p. 117–122, fev. 2000.

YOKOTA, M. et al. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. **Circulation**, v. 101, n. 24, p. 2783–7, jun. 2000.

YU, L.; HÉBERT, M. C.; ZHANG, Y. E. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. **The EMBO journal**, v. 21, n. 14, p. 3749–59, 15 jul. 2002.

ZHANG, M. et al. A functional polymorphism of TGFBR2 is associated with risk of breast cancer with ER+, PR+, ER+PR+ and HER2– expression in women. **Oncology Letters**, v. 2, n. 4, p. 653–658, jul. 2011.

ZHENG, Z.-M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 11, p. 2286–302, 1 set. 2006.

ZHOU, J. et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4972–4982, 1999.

ZHU, Q. et al. Interaction between Treg cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of epithelial ovarian cancer. **Oncology Reports**, v. 36, n. 6, p. 3472–3478, nov. 2016.

ZIMMERMANN, H. et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **Journal of virology**, v. 73, n. 8, p. 6209–19, ago. 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 1 maio 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“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.”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“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.”**, realizada no **“Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina”**. O objetivo da pesquisa é avaliar a presença do vírus em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer cervical do setor público de saúde da região norte do Paraná, por meio de metodologia específica e sensível, visando também à associação de dados demográficos, para análise dos fatores de risco que contribuem para a exposição da população ao vírus, bem como os determinantes de sua manutenção. Adicionalmente objetiva-se compreender o papel do sistema imune no controle e iniciação tumoral, bem como na sua formação, crescimento e progressão, em especial avaliar a interação tumor-hospedeiro em pacientes portadoras do vírus HPV e no desenvolvimento do câncer cervical. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **doação de 5mL de sangue periférico coletado por punção venosa e doação do swab cérvico-vaginal utilizado para confecção das lâminas para o exame preventivo para análises moleculares, bem como responder um questionário sociodemográfico**. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras biológicas (sangue periférico e secreção cérvico-vaginal) serão utilizados para extração de DNA e RNA para análises moleculares e imunológicas. Estes materiais serão obtidos em pequenas quantidades portanto não haverá sobra de material biológico.

Os benefícios esperados são a detecção precoce do vírus HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público de saúde da região norte do Paraná. Informamos que a paciente que se dispôr a participar do projeto não sofrerá desconfortos nem riscos à saúde, não havendo qualquer prejuízo às mesmas. Informamos que a senhora não pagará 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 na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar **Karen Brajão de Oliveira, Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, 3371-4267, karen.brajao@uel.br**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 201__.

Pesquisador Responsável _____
 Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira
 RG:: 6.538.742-5

_____ (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: _____

APÊNDICE B
Questionário SócioEpidemiológico

Nº LAB

QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

Data: ___/___/___

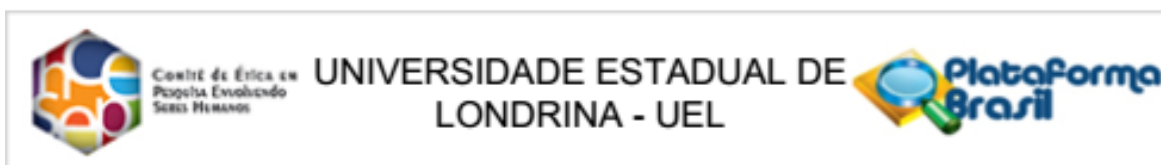
Reg. N° _____

1. Conhece o HPV???
- () Nunca ouvi falar
- () Já ouvi falar mas não sei o que é
- () Conheço
2. Idade _____ anos DN, _____
3. Etnia: _____
- Branca / parda / negra / asiática / indígena
4. Sua renda mensal (em salário mínimo) é de?
- () Até 1 Salário () De 1 à 3 salários
- () De 3 à 5 salários () De 5 à 7 salários
- () De 7 à 10 salários
5. Você fuma?
- () Não () Sim Tempo: _____
6. Qual o seu grau de escolaridade?
- () Fundamental Incompleto
- () Fundamental Completo
- () Médio Incompleto () Médio completo
- () Superior incompleto () Sup. completo
7. Estado Civil:
- () Solteira () Casada
- () Divorciada () Viúva
8. Qual sua profissão?
- _____
9. Faz o uso de algum método contraceptivo?
- () Não () Sim Qual: _____
10. Tipo de Parto:
- () Normal () Cesária
11. Nº de gestações: _____
12. Números de Partos:
- () Nenhum () Um
- () Dois () Três
- () Quatro ou mais
13. Idade da 1ª relação sexual: _____ anos
14. Idade da 1ª menstruação: _____ anos
15. Número de parceiros sexuais durante a vida:
- _____
16. Número de parceiros sexuais nos últimos 6 meses: _____.
17. Já realizou outros exames preventivos?
- () Sim () Não
18. Exames de prevenção realizados no passado apresentaram algum tipo de alteração?
- () Sim () Não
- () Não me lembro
- Em caso de resposta "Sim" favor descrever a alteração: _____
19. Já contraiu alguma infecção ginecológica
- () Não () Sim () não sei informar
- Em caso de resposta "SIM", se possível descrever qual: _____
20. Já esteve infectada pelo HPV?
- () Sim () Não () Não sei informar
21. Conhece as formas de transmissão ou formas de contrair o vírus?
- () Não () Sim Qual ou quais: _____
22. Existem casos de câncer de colo de útero em sua família?
- () Sim () Não
- Em caso de resposta "SIM" descrever o grau de parentesco: _____
- Pesquisador: _____

ANEXO

ANEXO A

Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TGFB: possível marcador molecular de susceptibilidade para progressão das lesões cervicais induzidas pelo Papilomavírus Humano (HPV)

Pesquisador: Karen Brajão de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56738316.3.0000.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Fundação Araucária

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.590.141

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo experimental, que será realizado com mulheres, 18 anos, atendidas em UBSs de Londrina e no Hospital do Câncer de Londrina (HCL). A adesão das pacientes será voluntária, após receberem informações e explicações sobre o estudo e seus objetivos. Aquelas que aceitarem participar firmarão a concordância, mediante leitura e assinatura do TCLE. O presente estudo pretende avaliar a presença do HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer cervical do setor público de saúde da região norte do Paraná e no Hospital do Câncer de Londrina por meio de metodologia específica e sensível, a PCR, visando também à associação de dados demográficos e análise dos fatores de risco que contribuem para a exposição da população ao HPV, bem como os determinantes da manutenção da infecção. Objetiva-se, ainda, avaliar a influência destes quatro polimorfismos do gene TGFB1 e do polimorfismo do gene TGFBR2, sozinhos e combinados, em mulheres infectadas pelo HPV em vários estágios de desenvolvimento de lesões, a fim de elaborar um painel de genótipos que poderiam vir a ser utilizados como marcadores moleculares de susceptibilidade para a infecção pelo HPV e também para a carcinogênese cervical na prática clínica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

Município: LONDRINA

E-mail: cep268@uel.br