



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

BIANCA LISLEY BARBOZA PACHECO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES
CD28 E ICOS FRENTE A INFECÇÃO PELO HPV NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS
CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

Londrina
2025

BIANCA LISLEY BARBOZA PACHECO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES
CD28 E *ICOS* FRENTE A INFECÇÃO PELO HPV NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS
CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

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

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

Londrina
2025

BIANCA LISLEY BARBOZA PACHECO

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES
CD28 E ICOS FRENTE A INFECÇÃO PELO HPV NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS
CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

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

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Carolina Batista Ariza Tamarozzi
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Londrina, 29 de Setembro de 2025

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

P116 Pacheco, Bianca Lisley Barboza.
INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NOS GENES CD28 E ICOS
FRENTE A INFECÇÃO PELO HPV NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES
INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO /
Bianca Lisley Barboza Pacheco. - Londrina, 2025.
69 f. : il.

Orientador: Karen Brajão de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Moléculas Coestimulatórias - Tese. 2. SNVs - Tese. 3. Polimorfismos -
Tese. 4. Imunologia - Tese. I. de Oliveira, Karen Brajão. II. Universidade Estadual
de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental. III. Título.

CDU 577.27

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Karen Brajão de Oliveira, pela orientação, dedicação e paciência ao longo de todo este percurso. Sua disponibilidade em compartilhar conhecimento, seu olhar atento e suas valiosas contribuições foram fundamentais para a construção deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski e Profa. Dra. Carolina Batista Ariza Tamarozzi, e também, da banca suplente, Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello e Prof. Dr. Wilson Frantine da Silva, pela disponibilidade, pelas valiosas contribuições e sugestões que enriqueceram esta pesquisa.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Pós-Graduação em Patologia Experimental, pela oportunidade de crescimento acadêmico e científico. À CAPES e a PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro para realização do projeto

Ao Sistema Único de Saúde e às pacientes que aceitaram participar deste estudo, pela colaboração voluntária por meio da doação de amostras e do preenchimento dos questionários, cuja contribuição viabilizou a realização desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia (LAGMI) e do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA (LEAP), pelo apoio e ensinamentos que enriqueceram esta trajetória.

Agradeço aos meus pais, Patrícia e Levy, pelo incentivo, apoio, educação e valores que sustentaram cada passo da minha formação, ao meu namorado Daniel, pelo companheirismo, paciência e apoio, fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço a Deus por mais esta conquista!

PACHECO, Bianca Lislely Barboza. **Investigação de variantes genéticas nos genes *CD28* e *ICOS* frente a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e de câncer de colo de útero.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Imunologia, Parasitologia e Patologia, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, 2025.

RESUMO

A resposta imune tem papel crucial tanto no controle da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), quanto na prevenção da progressão de lesões cervicais para o câncer cervical. Entre as moléculas envolvidas nessa resposta, destacam-se o grupo de diferenciação 28 (CD28) e o coestimulador induzível de células T (ICOS), que atuam na ativação de células T. O CD28 está expresso constitutivamente em células T, enquanto que ICOS é induzido após a ativação do receptor de células T (TCR). Durante a ativação de células T, a coestimulação por CD28 promove a produção de citocinas e a proliferação de células T, enquanto ICOS exerce uma função essencial na diferenciação e atuação, principalmente, das células T foliculares auxiliares (T_{fh}). Variantes de nucleotídeo único (SNVs) nos genes *CD28* e *ICOS* podem influenciar na expressão gênica dos receptores em células T, impedindo a estimulação necessária para a ativação de células T e consequentemente prejudicando a resposta imune frente a infecção por HPV, progressão de lesões cervicais e o câncer cervical. Neste contexto, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a associação dos alelos, genótipos e haplótipos das SNVs rs3116496 de *CD28* e rs4404254 de *ICOS* com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e de câncer cervical em uma amostra da população feminina do sul do Brasil. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 38937520.2.0000.5231). As amostras de sangue periférico e de secreção cervical foram utilizadas para a extração de DNA genômico. Foram utilizadas PCR quantitativa e convencional para a genotipagem das SNVs rs3116496 de *CD28* e rs4405254 de *ICOS* utilizando sondas validadas e caracterização da presença de HPV, respectivamente. As combinações haplotípicas das SNVs de *CD28* e *ICOS* foram inferidas pelo software PHASE e as análises estatísticas foram realizadas pelo software SPSS *Statistics*, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$. Foram incluídas 450 mulheres, agrupadas inicialmente de acordo com a presença ($n=263$) ou ausência ($n=187$) da infecção pelo HPV. As mulheres infectadas pelo HPV foram subdivididas em: sem lesão cervical ($n=116$), lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) ($n=21$), lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) ($n=61$) e câncer cervical ($n=65$). Observou-se que as características sociodemográficas, comportamentais e sexuais mostraram associação significativa com a infecção por HPV e a presença de lesões cervicais. Mulheres portadoras dos genótipos TC (OR: 2,029; IC95%: 1,028-4,007; $p=0,041$) e TC+CC (OR: 2,085; IC95%: 1,089-3,989; $p=0,027$) do SNV rs3116496 de *CD28* apresentaram maior chance de desenvolvimento de LIEAG. A análise do SNV rs4404254 de *ICOS* não apresentou associação significativa com a infecção por HPV e as lesões cervicais, assim como a análise dos haplótipos. Os resultados indicam que a SNV rs3116496 de *CD28* está associado com o desenvolvimento de LIEAG em uma coorte de mulheres brasileira, sugerindo que esta variante pode

influenciar nos mecanismos imunogenéticos envolvidos na progressão de lesões cervicais para câncer, dependendo de cofatores individuais.

Palavras-chaves: Papilomavírus Humano, coestimulador induzível de células T, grupo de diferenciação 28, câncer cervical;

PACHECO, Bianca Lisley Barboza. **Investigation of genetic variants in the *CD28* and *ICOS* genes in the face of HPV infection and the development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer.** Master's Dissertation – Postgraduate Program in Experimental Pathology, Department of Immunology, Parasitology and Pathology, Center of Biological Sciences – State University of Londrina, 2025.

ABSTRACT

The immune response plays a crucial role both in controlling Human Papillomavirus (HPV) infection and in preventing the progression of cervical lesions to cervical cancer. Among the molecules involved in this response, cluster of differentiation 28 (CD28) and inducible T-cell co-stimulator (ICOS) stand out, as they act in T-cell activation. CD28 is constitutively expressed on T cells, whereas ICOS is induced following T-cell receptor (TCR) activation. During T-cell activation, CD28 co-stimulation promotes cytokine production and T-cell proliferation, while ICOS plays an essential role in the differentiation and function, mainly, of follicular helper T cells (Tfh). Single nucleotide variants (SNVs) in the *CD28* and *ICOS* genes may influence receptor gene expression in T cells, impairing the stimulation required for T-cell activation and consequently compromising the immune response against HPV infection, progression of cervical lesions, and cervical cancer. In this context, the aim of this study was to evaluate the association of alleles, genotypes, and haplotypes of the SNVs rs3116496 in *CD28* and rs4404254 in *ICOS* with HPV infection and the development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in a sample of the female population from southern Brazil. The project was approved by the Research Ethics Committee involving human subjects of the State University of Londrina (CAAE 38937520.2.0000.5231). Peripheral blood and cervical secretion samples were used for genomic DNA extraction. Quantitative and conventional PCR were employed for genotyping of the SNVs rs3116496 in *CD28* and rs4404254 in *ICOS* using validated probes, and for HPV detection, respectively. Haplotype combinations of *CD28* and *ICOS* SNVs were inferred using the PHASE software, and statistical analyses were performed with SPSS *Statistics*, adopting a significance level of $p < 0.05$. A total of 450 women were included, initially grouped according to the presence ($n=263$) or absence ($n=187$) of HPV infection. HPV-positive women were further subdivided into: no cervical lesion ($n=116$), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) ($n=21$), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) ($n=61$), and cervical cancer ($n=65$). Sociodemographic, behavioral, and sexual characteristics showed a significant association with HPV infection and the presence of cervical lesions. Women carrying the TC genotype (OR: 2.029; 95% CI: 1.028–4.007; $p=0.041$) and the TC+CC genotypes (OR: 2.085; 95% CI: 1.089–3.989; $p=0.027$) of the *CD28* rs3116496 SNV showed a higher likelihood of developing HSIL. Analysis of the SNV rs4404254 in *ICOS* showed no significant association with HPV infection or cervical lesions, nor did the haplotype analysis. The results indicate that the SNV rs3116496 in *CD28* is associated with the development of HSIL in a cohort of Brazilian women, suggesting that this variant may influence immunogenetic mechanisms involved in the progression of cervical lesions to cancer, depending on individual cofactors.

Keywords: Human Papillomavirus, cluster of Differentiation 28, inducible T-cell costimulator

LISTA DE FIGURAS

1. Organização da estrutura genômica de um HPV-BR e HPV-AR.....	17
2. Etapas da infecção pelo HPV.....	18
3. Patogênese viral do HPV.....	22
4. Eventos da sinalização de CD28 e ICOS.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PV	Papilomavírus
HPV	Papilomavírus humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LIEBG	lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau
LIEAG	lesões intraepiteliais cervicais de alto grau
CD28	grupo de diferenciação 28
ICOS	coestimulador induzível de células T
SNVs	variantes de nucleotídeo único
SUS	sistema único de saúde
DNA	ácido desoxirribonucleico
HPV-AR	HPV de alto risco
HPV-BR	HPV de baixo risco
LCR	região de controle longa
URR	região reguladora superior
ORF	quadro de leitura aberto
NFI	fator nuclear I
OCT-1	fator de transcrição 1 de ligação ao octâmero
AP-1	proteína ativadora 1
TEF-1	fator intensificador de transcrição 1
SP1	proteína de especificidade 1
PHS	proteoglicano de sulfato de heparana
PML	corpos de leucemia promielocítica
RNA	ácido ribonucleico
Fas	receptor de morte da superfície celular
Bax	proteína X associada à Bcl-2
Bak	antagonista/assassino homólogo à Bcl-2
Bcl-2	linfoma de células B 2
p53	proteína tumoral p53
pRb	proteína do retinoblastoma
E2F	fator de ligação ao promotor E2
p21	proteína 21
E6-AP	proteína associada a E6
hTERT	transcriptase reversa da telomerase humana
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
pRb-E2F	complexo do fator de transcrição E2F
PDZ	proteínas contendo domínio PDZ
APCs	células apresentadoras de antígenos
TLR9	receptor toll-like 9
dsDNA	DNA de fita dupla
STING	estimulador de genes do interferon
IFNs	interferons
JAK/STAT	transdutor de sinal e ativador da transcrição

NF-kB	fator nuclear kB
IFN-K	interferon kappa
CD8+	linfócitos T citotóxicos
CD4+	linfócitos T auxiliares
MHC I	complexo principal de histocompatibilidade I
MHC II	complexo principal de histocompatibilidade II
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
IL-2	interleucina 2
IL-12	interleucina 12
CD40	cluster de diferenciação 40
CD40L	CD40 ligante
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
Tregs	células T reguladoras
TCR	receptor de células T
CD28	cluster de diferenciação 28
ICOS	coestimulador indizível de células T
CD80	cluster de diferenciação 80
CD86	cluster de diferenciação 86
CTLA-4	antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos
PD-1	proteína 1 de morte celular programada
BTLA	atenuador de linfócitos T e B
IgSF	superfamília das imunoglobulinas
GATA-3	proteína de ligação GATA-3
ICOS-L	ligante coestimulador de células T induzível
PIK3	fosfatidilinositol-3-quinase de classe IA
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
FoxP3+	fator de transcrição FoxP3
GCs	centros germinativos
Tfh	células T foliculares
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
IDCV	imunodeficiência comum variável
3'UTR	região 3' não traduzida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Papilomavírus humano	14
1.1.1 Estrutura genômica	15
1.1.2 Infecção	17
1.1.3 HPV e o câncer de colo de útero	19
1.1.4 Imunidade contra o HPV	22
1.2 Cluster of Differentiation 28 (<i>CD28</i>)	25
1.2.1 Variantes de nucleotídeo único do gene <i>CD28</i>	26
1.3 Inducible T-cell costimulator (<i>ICOS</i>)	27
1.3.1 Variantes de nucleotídeo único do gene <i>ICOS</i>	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. REFERÊNCIAS	33
4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	43
5. CONCLUSÃO	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
APÊNDICES	67
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
APÊNDICE B - Questionário Socioepidemiológico	68
ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	69

1. INTRODUÇÃO

Os papilomavírus (PV) são um grupo de vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, com capacidade de infectar diversas espécies de vertebrados. Dentre eles, os papilomavírus humanos (HPV) são os mais estudados e clinicamente relevantes em humanos. A infecção genital por HPV é considerada a infecção sexualmente transmissível mais comum e está associada a vários tipos de câncer, como o câncer cervical, orofaríngeo, anal e genital (Aden *et al.*, 2024).

O câncer cervical é uma das principais causas de mortalidade em mulheres em todo mundo, no Brasil é o terceiro tipo de câncer mais frequente em mulheres, excluindo os tumores de pele não melanoma (INCA, 2023). Os subtipos oncogênicos do HPV possuem capacidade de induzir transformações celulares levando ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LIEBG), lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (LIEAG), e dependendo de cofatores pode evoluir para o carcinoma *in situ*. No entanto, a progressão para o câncer cervical ocorre em apenas uma pequena fração de mulheres infectadas, evidenciando que outros fatores possam influenciar na carcinogênese, como os fatores imunogenéticos do hospedeiro que modulam a suscetibilidade individual (Gheit, 2019).

As moléculas coestimulatórias desempenham papel essencial na regulação da resposta imune e na manutenção da homeostase das células T e B. Dentre essas moléculas, destacam-se o *cluster of differentiation* 28 (CD28) e o coestimulador induzível de células T (ICOS) que participam da ativação e modulação da resposta imune (Peng *et al.*, 2022; Thomas; Gao; Wells, 2005). Considerando a importância dessas vias coestimulatórias, variantes de nucleotídeo único (SNVs) localizadas em genes que codificam essas moléculas podem impactar na sua função ou expressão, modulando a resposta imune frente ao câncer e a suscetibilidade ao desenvolvimento e progressão (Human Genome Structural Variation Working Group, 2007).

1.1 Papilomavírus humano (HPV)

Os HPVs são membros da família *Papillomaviridae* sendo um vírus pequeno com diâmetro de aproximadamente 55 nm, não envelopado e seu genoma consiste

em uma única molécula de DNA circular em fita dupla (Van Doorslaer *et al.*, 2018). Possui um capsídeo com estrutura icosaédrica formado por 72 capsômeros, constituído por duas proteínas do capsídeo, L1 e L2. A L1 é a principal proteína que compõe o capsídeo, organizada em pentâmeros, enquanto a proteína L2 apresenta cerca de 12 cópias por vírion (Baker *et al.*, 1991; Sapp *et al.*, 1995).

Atualmente já foram identificados mais de 231 tipos de HPV classificados em dois grupos de acordo com a oncogenicidade, os HPVs de alto risco (HPV-AR) e os HPVs de baixo risco (HPV-BR). O grupo HPV-AR inclui os tipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 apresentando associação com a carcinogênese. O grupo HPV-BR inclui os HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81, podendo causar lesões de baixo grau, como os condilomas e lesões cervicais benignas (Brancaccio *et al.*, 2018; Haedicke; Iftner, 2013; Wilczynski *et al.*, 1993).

Além disso, os HPV também são classificados 37 gêneros dos quais 5 gêneros são responsáveis pela infecção em humanos: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapilomavirus* e *Nupapillomavirus* dependendo do tropismo tecidual, os HPVs *Alpha* infectam o tecido mucoso, e os subtipos *Beta*-, *Gama*-, *Nu*- e *Mu*- infectam tecido cutâneo (Doobar *et al.*, 2015). Os gêneros *Mu* e *Nu* causam o desenvolvimento de verrugas nas mãos e pés, os *Beta* e *Gamma* infectam a pele, sendo importante ressaltar que o subtipo *Alphapapillomavirus* compreendem os HPVs oncogênicos (McBride, 2022).

A classificação filogenética é definida de acordo com a sequência do gene L1, devido ao fato de ser a região mais conservada do genoma viral, os gêneros são classificados em espécies que apresentam de 60 a 70% de identidade nucleotídica do gene L1 (De Villiers *et al.*, 2004).

1.1.1 Estrutura genômica

O genoma do HPV é formado por uma única molécula de DNA circular de fita dupla. As sequências de codificação de proteínas organizam-se em três regiões funcionais: a região reguladora *upstream* não codificadora, também denominada de região de controle longa (*Long Control Region*, LCR) ou região reguladora superior (*Upper Regulatory Region*, URR), a segunda região é chamada de região inicial (*Early Region*, E) e a terceira região é conhecida como região tardia (*Late Region*, L). A região LCR é responsável pelo controle da transcrição de ORFs (*Open Reading Frame*) que atuam regulando a replicação do DNA viral devido a presença

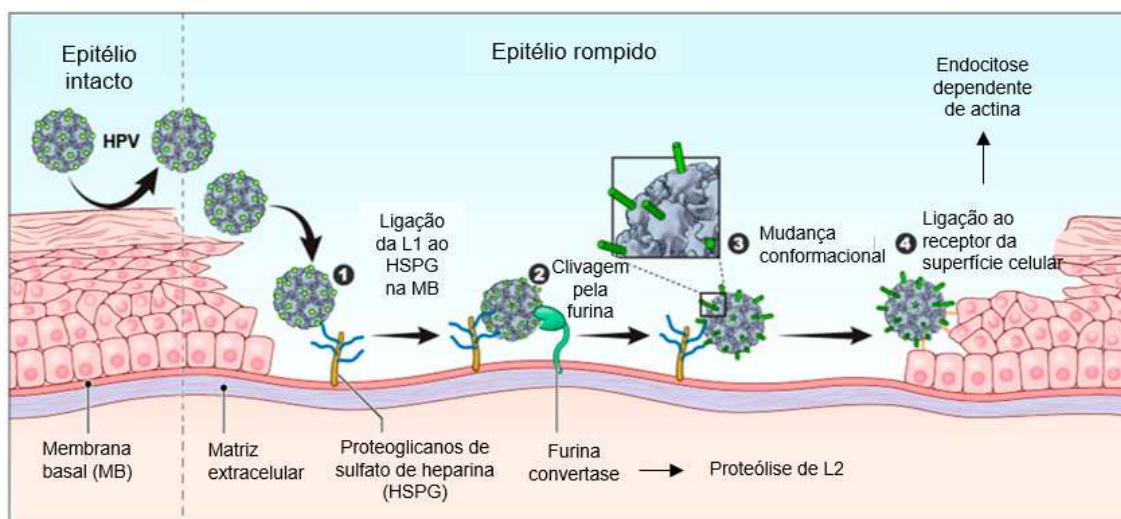
de sequências intensificadoras e silenciadoras e o promotor central p97. Na região E encontram-se as ORFs E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são responsáveis pela replicação do HPV (E1 e E2), transcrição do DNA (E2), maturação e liberação das partículas virais (E4), processo de carcinogênese (E5, E6 e E7) e imortalização (E6 e E7). A região L codifica os ORFs L1 e L2, sendo as proteínas que constituem o capsídeo viral (Apt *et al.*, 1996; Favre, 1975; Stanley; Pett; Coleman, 2007).

A região LCR apresenta tamanho variável entre os papilomas vírus, sendo 853 pb no HPV-16 e 825 pb no HPV-18. A região LCR contém locais para a ligação das proteínas virais (E1 e E2) e para fatores de transcrição celular como NFI, Oct-1, AP-1, TEF-1 e SP1, sendo responsáveis pela iniciação da replicação e transcrição inicial (Connor *et al.*, 1995; Yu; Majerciak; Zheng, 2022).

Todos os HPVs do gênero *Alphapapillomavirus* compartilham essa organização genômica, porém existem diferenças entre os demais gêneros: por exemplo, os gêneros *Beta*, *Gama* e *Mu* não apresentam a ORF E5. No entanto, apenas as ORFs E1, E2, L1 e L2 são necessárias para a replicação e disseminação do vírus (Nobre *et al.*, 2009; Van Doorslaer; McBride, 2016).

Para a classificação de um novo ou desconhecido tipo de HPV, as ORFs E6, E7 e L1 devem ser 90% homólogas às sequências nucleotídicas de HPVs já descritas na literatura. Os genes que codificam E1, E2 e L2 são mais conservados em comparação aos genes que codificam E5-E7. Essa variabilidade pode determinar o potencial oncogênico, afinidade por regiões anatômicas e via de transmissão do tipo de HPV (Doorbar *et al.*, 2015; Torrisi *et al.*, 2000).

O genoma do HPV-AR e HPV-BR também possuem diferenças significativas, o HPV-AR codifica uma ou duas das quatro diferentes proteínas E5, sendo elas E5 α , E5 β , E5 γ e E5 δ devido a presença de um segmento adicional na ORF E5. As proteínas E5 e E6 do HPV-AR são codificadas a partir de um único mRNA policistrônico, esse transcrito pode sofrer *splicing* alternativo originando uma nova proteína, conhecida como E6*. Em contraste, no HPV-BR as proteínas E6 e E7 são transcritas por promotores distintos (Bravo; Alonso, 2004; Bravo; Félez-Sánchez, 2015; McBride, 2022).

Figura 2. Etapas da infecção pelo HPV

O HPV inicialmente liga-se aos proteoglicanos de sulfato de heparina da matriz extracelular exposta por microlesões (1). A proteína L2 é clivada pela furina convertase (2), induzindo a mudança conformacional do vírion (3), permitindo a ligação a receptores específicos da superfície celular (4), facilitando a internalização viral. Adaptado de Kines e Schiller (2022).

O HPV é internalizado na célula por endocitose, as vesículas endocíticas contendo as partículas virais fundem-se aos lisossomos, desmontando o capsídeo icosaédrico e promovendo a dissociação e degradação da proteína L1. Em seguida, o genoma viral é transportado para o núcleo por uma via mediada pela proteína dos microtúbulos. No interior do núcleo, a proteína L2 direciona o genoma viral para os corpos de leucemia promielocítica (PML). Os PMLs são estruturas localizadas no núcleo celular que estão envolvidas em processos celulares, como apoptose, regulação transcricional, respostas imunes inatas e intrínsecas. A interação com os PMLs permite o início dos processos de transcrição e replicação precoce do HPV. Além disso, a proteína L2 do HPV degrada o antígeno nuclear Sp100 permitindo o início da replicação viral dependente da maquinaria celular. As proteínas oncogênicas E6 e E7 também possuem atuação no processo, estas induzem a célula a entrar na fase S da mitose, permitindo o acesso as polimerases celulares (Cruz; Meyers, 2013; Moody; Laimins, 2010; Schelhaas *et al.*, 2012; Shafit-Keramat *et al.*, 2003).

Durante a infecção por HPV, os primeiros genes expressos são E1 e E2 responsáveis principalmente pela ativação da replicação do DNA viral. A proteína E1 forma um complexo com a E2, aumentando a especificidade para a sequência alvo do DNA. Inicialmente, é produzido um pequeno número de cópias do genoma viral, que são subsequentemente duplicadas durante a divisão celular (Scarth *et al.*,

2021). Nas camadas superiores do epitélio, são expressos os genes L1 e L2 em células terminalmente diferenciadas, associados à montagem do capsídeo ao redor dos genomas virais replicados. Durante as etapas finais de montagem e liberação dos vírions, processo que ocorre por descamação das camadas superficiais do epitélio, a expressão de genes tardios é regulada por mecanismos de poliadenilação e *splicing* alternativo do ácido ribonucleico (RNA). Por fim, a liberação das partículas virais é mediada pela proteína E4, que atua no rompimento da rede celular de filamentos de citoqueratina, promovendo a saída dos vírions (Della Fera et al., 2021; Gheit, 2019; Moody, 2017).

1.1.3 HPV e o câncer de colo de útero

A infecção persistente causada por subtipos oncogênicos do HPV, constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres no Brasil, excluindo os tumores de pele não melanoma. Estima-se que cerca de 99,7% dos casos estejam associados à infecção genital pelos HPVs de alto risco oncogênico, sendo os subtipos HPV-16 e HPV-18 os mais prevalentes. Esses subtipos estão fortemente associados à progressão de lesões intraepiteliais cervicais, que são classificadas em LIEBG ou LIEAG, conforme os critérios estabelecidos pelo Sistema Bethesda (Pangarkar, 2022).

Na maioria dos casos a infecção pelo HPV regride espontaneamente entre 12 a 24 meses, sem o aparecimento de sinais e sintomas, porém em alguns casos a infecção progride devido a presença de cofatores do indivíduo como a resposta imune, fatores hormonais, ambientais e genéticos que podem influenciar na progressão para as lesões intraepiteliais cervicais e posteriormente para a carcinogênese cervical. Estudos relatam que cerca de 60-79,4% das LIEBG regredem para a citologia normal e apenas 3,6-17% das lesões progridem para LIEAG e potencialmente causam o câncer cervical (Gheit, 2019; Schlecht, 2003; Silveira *et al.*, 2015).

O câncer cervical pode se desenvolver em diferentes regiões do colo uterino, sendo mais frequente a origem na zona de transformação cervical ou no epitélio estratificado infectado da ectocérvice. Os HPVs-AR utilizam suas proteínas acessórias E5, E6 e E7 para a adaptação e estabelecimento de um nicho celular

favorável à replicação, persistência viral dentro dos queratinócitos e contribuem para a evasão imunológica (Egawa *et al.*, 2015; Herfs *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015).

A proteína E5 altera as camadas epiteliais basais e parabasais do epitélio escamoso, aumentando a proliferação celular e inibindo a diferenciação dos queratinócitos, além de aumentar a sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Ilahi; Bhatti, 2020). A E5 pode atuar inibindo a apoptose através da degradação do receptor de morte da superfície celular Fas, resultando na diminuição dos níveis das proteínas pró-apoptóticas, Bcl-2 associated X protein (Bax) e Bcl-2 antagonist/killer (Bak) e aumento da expressão da proteína anti-apoptótica, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), promovendo a sobrevivência celular (Pal; Kundu, 2020).

As oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs-AR modulam o ciclo celular por meio da inativação das vias supressoras de tumores, como aquelas mediadas pela proteína p53 e pela proteína do retinoblastoma (pRb). Em situações normais, a proteína Rb atua regulando a transição da fase G1/S do ciclo celular, impedindo a progressão do ciclo celular quando há danos ao DNA, por meio de sua ligação aos fatores de transcrição E2F. No entanto, durante a infecção por HPV-AR, a proteína E7 possui alta afinidade pela pRb, promovendo a sua degradação e liberação dos fatores E2F, o que ativa a transcrição de genes que promovem a entrada da célula na fase S do ciclo celular e resulta em proliferação celular descontrolada (Figura 3) (Münger *et al.*, 1989). Além disso, a oncoproteína E7 também desregula o ciclo celular ao inibir p21, um inibidor de quinase dependente de ciclina que bloqueia a progressão do ciclo celular. Esta interação de E7 com p21 favorece a manutenção da proliferação celular (Münger *et al.*, 1989; Schiffman; Wentzensen, 2013; Shin *et al.*, 2009).

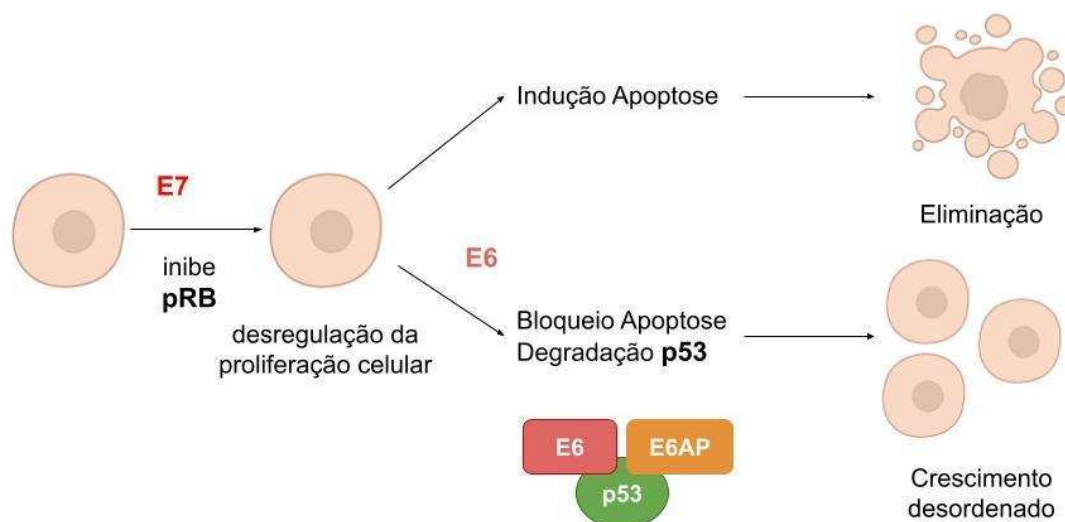
A inibição da via pRb-E2F leva ao aumento dos níveis de p53, uma proteína responsável por induzir a parada do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose quando há danos no DNA. Na infecção por HPV-AR, a oncoproteína E6 interage com p53 em associação com a proteína E6-AP (*E6-associated protein*), uma ubiquitina ligase, este complexo E6/E6AP formado leva a degradação proteossomal de p53 mediada pela ubiquitina. Como consequência, a degradação de p53 culmina no acúmulo de danos ao DNA e instabilidade genômica, contribuindo para a carcinogênese cervical (Figura 3) (Pal; Kundu, 2020; Vatts *et al.*, 2021).

Além disso, a E6 inibe a senescência celular dos queratinócitos ao preservar a telomerase por meio da ativação transcricional da transcriptase reversa da

telomerase humana (hTERT), enzima que mantém o comprimento dos telômeros durante a divisão celular. A E6 possui em sua extremidade C-terminal um motivo de ligação formado por cerca de 80 a 90 aminoácidos, que interage com proteínas contendo o domínio PDZ (zonula occludens-1), como ZO-1 (*zonula occludens-1*), PSD-95 (*Postsynaptic Density Protein 95*) e hDlg (*Drosophila discs large tumor suppressor*). Essas proteínas com domínio PDZ são responsáveis pela regulação da polaridade das células epiteliais e divisão celular assimétrica, quando degradadas pela E6 ocorre à desorganização das junções celulares e da polaridade epitelial, enfraquecendo as barreiras físicas e sinais regulatórios que em situações normais impedem a proliferação descontrolada do HPV. Dessa forma, a interação E6-PDZ contribui para um microambiente favorável à persistência dos genomas do vírus HPV Ganti et al., 2015; Klingelutz; Foster; Mcdougall, 1996; Marsh et al., 2017).

A infecção persistente por HPV-AR é um evento fundamental para a integração do genoma viral à cromatina do hospedeiro, promovendo a oncogênese. No entanto, a integração do genoma viral do HPV interrompe a síntese de novas partículas virais. Além disso, resulta na interrupção da repressão mediada pelo gene viral E2, levando a desregulação da expressão dos genes E6 e E7, aumentando a proliferação celular, inibindo os checkpoints do ciclo celular e aumentando a instabilidade genética (McBride; Warburton, 2017).

Figura 3. Patogênese viral do HPV



As oncoproteínas E6 e E7 do HPV atuam alterando processos celulares: E6 atua desativando p53, o que impede a morte celular programada, levando ao acúmulo de mutações e crescimento desordenado. E7 inibe o pRb e libera os fatores de transcrição da família E2F, resultando na ativação de genes necessários para a entrada da célula na fase S do ciclo celular mesmo na presença de danos ao DNA, contribuindo para falhas nos mecanismos de reparo e instabilidade genômica. Adaptado: Hoppe-Seyler *et al.*, 2018

1.1.4 Imunidade contra o HPV

A infecção pelo HPV na maioria dos casos é transitória e assintomática, devido à capacidade do sistema imune em combater a infecção. A infecção persistente pelo HPV a longo prazo, depende da capacidade do vírus em evadir a resposta imune e o ciclo infeccioso do vírus fornece barreiras ao reconhecimento imunológico do hospedeiro. Durante o ciclo replicativo viral, os altos níveis de expressão gênica e amplificação viral acontecem em queratinócitos diferenciados que estão desprendidos da superfície do epitélio, dessa forma, o ciclo viral é ocultado dos mecanismos de imunovigilância do hospedeiro. O HPV não induz morte citolítica, inflamação e expressão de citocinas pró-inflamatórias, permitindo que não ocorra o recrutamento de células imunes necessárias para a apresentação de antígeno e destruição das células infectadas, protegendo o vírus HPV contra as respostas imunes inatas e adaptativas (Stanley *et al.*, 2020).

Inicialmente, a resposta imune inata atua como a primeira linha de defesa mediada por células apresentadoras de antígenos (do inglês, *Antigen-Presenting*

Cells - APCs) contra a infecção viral através da detecção de ácidos nucleicos virais, ativação de vias de transdução de sinais e produção de citocinas pró-inflamatórias e antivirais. No entanto, durante a infecção pelo HPV, as proteínas E5, E6 e E7 inibem os sensores de DNA do hospedeiro, interferem na produção de citocinas, inibem a ativação de vias de sinalização e regulam as respostas pró-inflamatórias. A E6 juntamente com E7 do HPV16 prejudicam a expressão de TLR9 (receptor toll-like 9), receptor que reconhece dsDNA e ativa a resposta imune inata (Hasan *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2020).

A E7 tem papel crucial na inibição do primeiro ponto da cascata de sinalização celular, ligando-se ao estimulador do sensor de DNA citosólico dos genes do interferon (STING) e bloqueando a produção subsequente de interferons do tipo I (IFNs). Em conjunto, as proteínas virais E5, E6 e E7 atuam suprimindo IFN- I, além de inibir as vias de transdução de sinal, como Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) e do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Scott *et al.*, 2020; Tummers *et al.*, 2015).

Além disso, as proteínas E6 e E7 prejudicam a formação e o recrutamento de complexos de inflamassomos para o local da infecção e também reduz a produção de IL-1B, um importante mediador pró-inflamatório. A proteína E5 atua regulando negativamente a produção de IFN específico dos queratinócitos, a IFN-K (Hong *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2020).

A resposta imune adaptativa é fundamental para o reconhecimento e eliminação das células infectadas e prevenção da reinfecção através da geração de memória imunológica, dependendo principalmente da ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8+) e linfócitos T auxiliares (CD4+) (Amador-Molina *et al.*, 2013; Sasagawa *et al.*, 2012). Durante a infecção pelo HPV, as proteínas E5, E6 e E7 atuam impedindo o recrutamento de APCs epidérmicos, diminui a captação de antígenos virais pelas APCs e regula negativamente a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I) (Ashrafi *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2019).

Os linfócitos T CD4+ virgens reconhecem antígenos apresentados via MHC de classe II, diferenciando-se em linfócitos T auxiliares. Os linfócitos T auxiliares podem diferenciar-se em células Th1, responsáveis por promover imunidade mediada por células, ou em células Th2, responsáveis pela estimulação da imunidade humoral. As células Th1 secretam citocinas como interleucina-2 (IL-2),

interleucina-12 (IL-12) e IFN- γ que atuam na ativação de linfócitos T citotóxicos. Enquanto que as células Th2 estimulam a imunidade humoral através da interação do ligante CD40L e o receptor CD40 presente em linfócitos B e por meio da secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-6, promovendo a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, responsáveis pela produção de anticorpos contra o HPV (Sasagawa; Takagi; Makinoda, 2012).

Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem antígenos via MHC de classe I, diferenciando-se em linfócitos T citotóxicos, desempenhando papel importante na eliminação da infecção pelo HPV através da secreção de proteínas citotóxicas, as granzimas e perforinas (Tian *et al.*, 2021). Outras subpopulações de células T auxiliares (Th) atuam na resposta imune contra o HPV, como as células T reguladoras (Tregs) que possuem função imunossupressora e são frequentemente encontradas em infecções persistente pelo HPV e no microambiente tumoral (Hibma *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2003). As Tregs secretam IL-10, uma citocina imunorreguladora que interfere na diferenciação de células dendríticas e como consequência interfere no processo de apresentação de antígenos (Sabat *et al.*, 2010).

A ativação dos linfócitos T requer o reconhecimento dos antígenos pelo receptor de células T (TCR) e os sinais coestimulatórios mediado pelos receptores CD28 e ICOS. A interação entre CD28 e seus ligantes, fornecem sinais fundamentais em processos das células T como a produção de citocinas, sinais de sobrevivência e diferenciação de longo prazo, favorecendo a eliminação de células infectadas pelo HPV. Por outro lado, ICOS é expresso após a ativação de células T e desempenha papel fundamental na manutenção da resposta imune, promovendo a diferenciação de células T auxiliares foliculares (Tfh) e secreção de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-12 (Esensten *et al.*, 2016; Rujas *et al.*, 2020).

Portanto, CD28 e ICOS são moléculas coestimulatórias essenciais para a coordenação da resposta imune adaptativa ao HPV, modulando a ativação, diferenciação e função efetora dos linfócitos T, influenciando diretamente na capacidade do sistema imune em eliminar a infecção pelo HPV, prevenir a persistência e impedir a progressão para lesões intraepiteliais cervicais e o câncer cervical.

1.2 Cluster of Differentiation 28 (CD28)

CD28, uma molécula coestimulatória expressa constitutivamente na superfície de células T *naive* e de memória, atua como um segundo sinal para a ativação, proliferação, sobrevivência e manutenção funcional dessas células, além de prevenir a indução de anergia e contribuir para o estabelecimento de uma resposta imune de memória. A ativação de linfócitos T envolve o reconhecimento do antígeno apresentado pelo MHC ao TCR, juntamente com o sinal coestimulatório de CD28 ao interagir com seus ligantes CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em células apresentadoras de antígenos. A falta de coestimulação CD28-B7 durante o processo de ativação de células T, torna a célula anérgica e não responsiva à estimulação antigênica (Acuto; Michel, 2003; Boesteanu *et al.*, 2009; Esensten *et al.*, 2016).

A molécula CD28 é um membro fundador de uma subfamília de moléculas coestimulatórias contendo um domínio extracelular variável semelhante à imunoglobulina. Além de CD28, fazem parte dessa subfamília, ICOS, CTLA-4 (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos), PD-1 (proteína 1 de morte celular programada) e BTLA (atenuador de linfócitos T e B) (Chen; Flies, 2013). CD28 e CTLA-4 são moléculas homólogas e competem pelos mesmos ligantes, B7-1 e B7-2, porém, CTLA-4 têm afinidade maior competindo com CD28 e suprimindo as respostas das células T efectoras (Engelhardt *et al.*, 2006; Linsley *et al.*, 1990). Além disso, CD28 e CTLA-4 possuem efeitos opostos na estimulação de células T, CD28 ativa as células T e CTLA-4 inibe as células T (Walunas *et al.*, 1994).

O gene *CD28* tem 300 kb e está localizado no cromossomo 2 na região q33 (Xing *et al.*, 2021). O CD28 é uma glicoproteína de estrutura homodimérica com aproximadamente 44 kDa, cujo domínio extracelular em forma de V com ligações dissulfeto contém o motivo conservado MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr), essencial para a interação com seus ligantes CD80 e CD86 presentes em células apresentadoras de antígenos, enquanto seu domínio citoplasmático é composto por 41 aminoácidos, atuando na transdução de sinais coestimulatórios. Os membros da família CD28 compartilham características estruturais comuns, possuem domínios pareados da superfamília de imunoglobulinas (IgSF) V-set ligados a domínios transmembrana únicos e domínios citoplasmáticos com motivos de sinalização (Boomer *et al.*, 2010; Carreno; Collins, 2002).

A ativação dos receptores CD28 induz alterações a nível epigenético, transcricional e pós-transducional em células T. Esses processos são cruciais para o crescimento e especialização das células T. Um efeito notável da coestimulação de CD28 é o controle sobre a ativação de genes de citocinas, como a IL-2. Quando não há coestimulação do CD28, ocorre diminuição na produção de IL-2, tornando as células não responsivas (Thomas *et al.*, 2005). A molécula CD28 protege contra a morte celular por apoptose induzida por Fas, devido a ativação da via de sinalização envolvendo as cinases Akt e PI3K, a Akt ativada inibe a progressão da apoptose ao impedir o recrutamento da caspase 8. Além disso, CD28 aumenta a expressão de Bcl-xL e reduz a permeabilidade da membrana celular, promovendo a sobrevivência dos linfócitos T (Jiang *et al.*, 2013; Kirchhoff *et al.*, 2000).

A sinalização de CD28 desempenha papel na diferenciação de células T *naïve* para a linhagem Th1 e Th2, dependente de IL-4, sinalização do TCR e indução de GATA-3 (Rodrigues-Palmeiro *et al.*, 1999). A sinalização fraca do TCR promove a produção de IL-4 e consequentemente a diferenciação para o subtipo Th2, em contrapartida, a sinalização forte do TCR promove a produção de IFN- γ e a diferenciação para o subtipo Th1 (Tao *et al.*, 1997).

Estudos anteriores demonstraram que a molécula coestimulatória CD28 tem papel crítico durante o desenvolvimento de células Tregs no timo. Camundongos deficientes em CD28 apresentavam números reduzidos de Tregs. Esses achados indicam que os sinais mediados por CD28 são fundamentais para a seleção e diferenciação das células T, contribuindo para o estabelecimento da tolerância imunológica (Tai *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009).

1.2.1 Variantes de nucleotídeo único do gene *CD28*

O gene *CD28* codifica uma glicoproteína que está expressa em células T e possui papel fundamental na coestimulação da resposta imune, promovendo a ativação, proliferação e sobrevivência das células T. SNVs no gene *CD28* podem influenciar na regulação da resposta imune, podendo estar associados à suscetibilidade a diversas doenças, como o câncer, infecções virais crônicas e doenças autoimunes (Alegre *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2014; Ihara *et al.*, 2001).

As variantes de nucleotídeo único (SNVs) representam o tipo mais comum de variação genética no genoma humano, consistem na substituição de um único nucleotídeo por outro em uma região específica do genoma (Human Genome

Structural Variation Working Group, 2007). Essas variantes podem exercer impacto significativo na regulação da resposta imunológica, influenciando na suscetibilidade individual ao desenvolvimento de diversas doenças. No contexto do câncer cervical, embora a infecção pelo HPV seja um fator necessário para a carcinogênese, ela não é suficiente, os fatores genéticos, incluindo os SNVs em genes relacionados à resposta imune, desempenham um papel importante na modulação do risco de progressão das lesões para o câncer (Chen *et al.*, 2021; Gheit, 2019; Hendrick, 2011).

Dentre os SNVs, destaca-se o rs3116496 que consiste na substituição de uma timina por citosina (T>C) no íntron 3 do gene *CD28*, sendo o mais estudado no contexto da suscetibilidade a doenças autoimunes e câncer. Sabe-se que variantes intrônicas podem influenciar no processo de *splicing* do RNA, levando a inclusão ou exclusão inadequada de éxons e consequentemente pode comprometer a expressão do receptor CD28 em células T, além da possibilidade de influência na ligação de fatores regulatórios ou microRNAs. A modulação da expressão pode influenciar negativamente na coestimulação durante a ativação das células T, interferindo na geração de uma resposta imune eficaz frente a infecção pelo HPV e células tumorais (Ahmed *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm investigado a associação do polimorfismo rs3116496 com o risco para diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer cervical (Chen *et al.*, 2011), câncer de pulmão (Karabon *et al.*, 2011), câncer colorretal (Wu *et al.*, 2015), câncer de mama (Chen *et al.*, 2012) e o carcinoma de células renais (Tupikowski *et al.*, 2015). Contudo, os resultados obtidos são inconsistentes e a limitação do poder estatístico de muitas dessas investigações tem dificultado a obtenção de conclusões definitivas e robustas (Baek *et al.*, 2015).

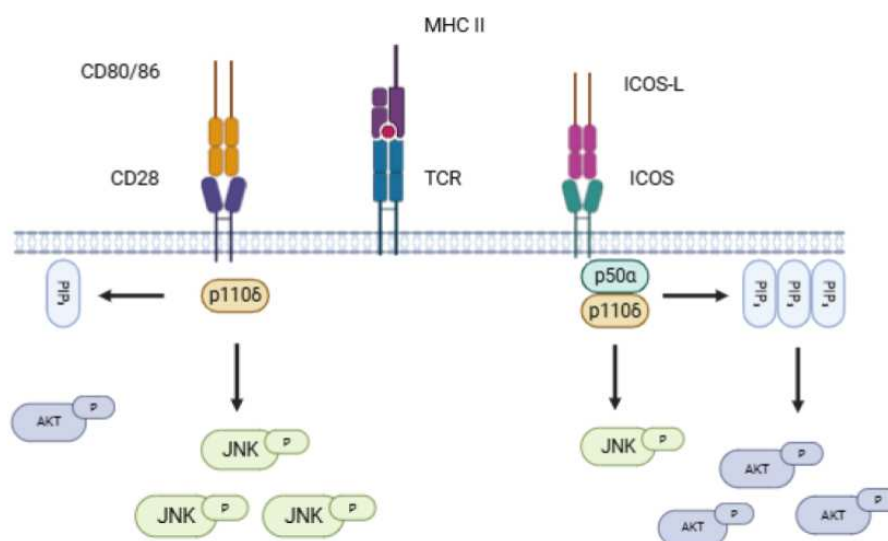
1.3 Inducible T-cell costimulator (*ICOS*)

O gene *ICOS* está localizado no cromossomo 2q33.2 próximo aos genes *CD28* e *CTLA-4*, e codifica a molécula coestimulatória *ICOS*, integrante da família coestimulatória B7-1/B7-2-*CD28/CTLA-4*. Sua expressão ocorre exclusivamente após a ativação das células T, mediada pelo complexo TCR/CD3. O ligante de *ICOS*, conhecido como *ICOS-L*, é expresso em APCs, incluindo células B, macrófagos, células dendríticas e também em células tumorais (Richter; Burdach, 2004; Rujas *et*

al., 2020). Além disso, as citocinas IL-12 e IL-23 são responsáveis por aumentar a expressão de ICOS (Liu *et al.*, 2015; Wassink *et al.*, 2004).

Os eventos de sinalização de ICOS e CD28 apresentam semelhanças, porém não são idênticos (Figura 4). A ativação de ambas as vias induz o recrutamento da fosfatidilinositol 3-quinase de classe IA (PI3K), essa molécula leva à produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ligado à membrana (PIP₃), culminando na ativação de Akt, uma quinase que promove a proliferação e sobrevivência celular. Além disso, ocorre o recrutamento das subunidades reguladoras p50 α e p85 α do PI3K e da subunidade catalítica p110 δ (Coley *et al.*, 2000; Riley *et al.*, 2002). Porém, a ativação de ICOS em células T CD4⁺ leva a uma maior produção de PIP₃ e induz uma fosforilação mais forte da quinase Akt em comparação com a ativação da via CD28 (Fos *et al.*, 2008). Além disso, o recrutamento de p50 α e p85 α demonstrou estar envolvido na diferenciação das células T auxiliares, independente de CD28 (Leavenworth *et al.*, 2015). A ativação da via ICOS induz fosforilação mais fraca da cinase N-terminal p46 c-Jun comparado com a coestimulação de CD28 (Arimura *et al.*, 2002).

Figura 4. Eventos da sinalização de CD28 e ICOS



A ativação da via ICOS/ICOS-L induz recrutamento da subunidade reguladora p50 α da PI3K por meio do motivo de sinalização YMFM, resultando em forte produção de PIP₃ e fosforilação aumentada Akt. A ativação da via CD28/CD80/86 induz menor produção de PIP₃ e fosforilação mais fraca de Akt. ICOS induz menor fosforilação da cinase-N-terminal (JNK) p46 da c-Jun. Adaptado de Wikenheiser; Stumhofer, 2016.

Os sinais coestimulatórios de ICOS desencadeiam a produção de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-21, TNF-alfa e IFN-gama por células T auxiliares (Th) CD4+, CD4+ forkhead box P3 (FoxP3+) Tregs e linfócitos T citotóxicos (CTL) CD8+, aumentando a proliferação e desenvolvimento de células de memória. A proliferação e sobrevivência de células T efectoras por meio da coestimulação ocorre através do recrutamento de fosfatidilinositol 3-quinase. Além disso, ICOS regula a diferenciação de células T em Th1, Th2 e Th17 e auxilia no estabelecimento de células T CD8+ de memória residentes em tecidos. Em comparação com CD28, a coestimulação de ICOS não induz a produção de IL-2 (Hutloff *et al.*, 1999; Mesturini *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2022; Solinas *et al.*, 2020).

A principal função da ativação da via ICOS/ICOS-L é a geração e manutenção dos centros germinativos (GCs) nos órgãos linfáticos, auxílio das células T às células B dependentes de células T e a troca de classe dos anticorpos, devido ao papel de ICOS na ativação, diferenciação e migração de células T foliculares auxiliares (Tfh) (Akiba *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2015).

A interação ICOS/ICOS-L possui efeitos opostos, estimulando respostas antitumorais, mas também potencializa a imunossupressão (Solinas *et al.*, 2020). ICOS promove o aumento da resposta de células T CD8+, sendo o principal mecanismo antitumoral induzido por ICOS. Em contrapartida, a via ICOS/ICOS-L contribui para a manutenção e função das células Tregs, essas células secretam TGF- β e IL-10 promovendo a supressão do sistema imunológico inato e adaptativo, contribuindo para a evasão da resposta antitumoral. As células Tregs ICOS+ têm função imunossupressora mais intensa do que as Tregs que não expressam ICOS (Burmeister *et al.*, 2008; Downs-Canner *et al.*, 2017; Mo *et al.*, 2017; Wallin *et al.*, 2001).

Mutações no gene *ICOS* estão associadas ao desenvolvimento de imunodeficiência e autoimunidade, em decorrência de defeitos na ativação e diferenciação de células T efectoras e células Tregs devido a defeitos em células T efectoras e células Tregs. Na imunodeficiência comum variável (IDCV), caracterizada pela diminuição na produção de imunoglobulinas, já foram descritas mutações que levam a perda da expressão da proteína ICOS na superfície das células T, comprometendo a função de células Tfh e ativação de células B. A deficiência de ICOS está associada com maior suscetibilidade a infecções respiratórias e maior predisposição à autoimunidade (Grimbacher *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2009).

A ativação da via ICOS/ICOS-L vêm sendo explorada como uma abordagem promissora para potencializar a resposta imune antitumoral. A modulação de ICOS juntamente com inibidores de ponto de verificação imunológicos vêm sendo estudados para melhorar a resposta e resultados em cânceres avançados ou metastáticos (Amatore *et al.*, 2020; Solinas *et al.*, 2020). Tang *et al.*, 2013 demonstraram que pacientes tratados com anticorpo anti-CTLA-4 apresentaram aumento significativo em células T CD4⁺ ICOS⁺ no sangue periférico, sugerindo que ICOS pode ser um promissor biomarcador para monitorar a resposta à terapia de CTLA-4.

1.3.1 Variante de nucleotídeo único do gene *ICOS*

A variante genética rs4404254 está localizada na região 3' não traduzida (3' UTR) do gene *ICOS* e consiste na substituição de uma timina por citosina (T>C). Sabe-se que as regiões 3' UTR dos mRNAs regulam diversos processos, como a localização, estabilidade e tradução dos mRNAs, além de ocorrer a ligação de miRNAs que atuam na regulação negativa da expressão proteica. Variantes genéticas presentes nessa região podem afetar a regulação realizada pelos miRNAs, influenciando na expressão de ICOS em células T (Mayr, 2019).

A variante rs4404254 de *ICOS* pode apresentar três possíveis genótipos: CC, CT e TT. Atualmente as evidências quanto ao impacto desse SNV de *ICOS* e o risco no desenvolvimento de neoplasias ainda são contraditórias. Ivansson *et al.*, 2010 observou que o genótipo CC do SNV rs4404254 de *ICOS* pode estar associado com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical. Enquanto que Jiang *et al.*, 2018 demonstraram que a variante rs4404254 de *ICOS* está associada com o desenvolvimento de câncer colorretal no subgrupo que nunca fumou. Por outro lado, Wu *et al.*, 2015 relataram que o mesmo SNV está relacionado à diminuição do risco de desenvolvimento do câncer colorretal.

Atualmente existem poucos estudos que investigam a associação do SNV rs4404254 de *ICOS* com o câncer, especialmente no contexto do câncer cervical. Além disso, os resultados disponíveis são divergentes sugerindo que a função da variante rs4404254 pode ser modulada por fatores étnicos ou ambientais. Dessa forma, são necessários novos estudos com populações diversas e amostras robustas para elucidar melhor a possível relação da variante genética com o câncer.

Nesse contexto, torna-se relevante avaliar a associação entre alelos, genótipos e haplótipos de variantes genéticas em genes que codificam moléculas coestimulatórias da resposta imune, considerando sua relação com a infecção por HPV, desenvolvimento de lesões cervicais e o câncer cervical em mulheres do sul do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação dos alelos, genótipos e haplótipos das variantes genéticas rs3116496 (T>C) de *CD28* e rs4404254 (T>C) de *ICOS* com a infecção pelo HPV, desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e no câncer cervical em uma amostra de mulheres do sul do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar uma possível correlação da infecção pelo HPV e a presença das lesões intraepiteliais cervicais com os dados sociodemográficos coletados das pacientes participantes da pesquisa, como faixa etária, estado civil, grau de escolaridade, renda familiar, hábito tabagista, entre outros;
- Investigar uma possível correlação da infecção pelo HPV e a presença das lesões intraepiteliais cervicais com dados sobre variáveis sexuais e reprodutivas coletados das pacientes participantes da pesquisa, como menarca, idade do primeiro intercuro sexual, uso de métodos contraceptivos, número de parceiros sexuais ao longo da vida, entre outros;
- Avaliar a frequência dos alelos, genótipos e haplótipos das variantes genéticas rs3116496 de *CD28* e rs4404254 de *ICOS*, em uma amostra da população feminina do sul do Brasil;
- Verificar se há associação dos alelos, genótipos e haplótipos das variantes genéticas rs3116496 de *CD28* e rs4404254 de *ICOS* com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau, lesões intraepiteliais cervicais de alto grau e o câncer cervical em uma amostra da população feminina do sul do Brasil;

3. REFERÊNCIAS

ACUTO, Oreste; MICHEL, Frédérique. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 939–951, dez. 2003.

ADEN, Durre *et al.* Navigating the landscape of HPV-associated cancers: From epidemiology to prevention. **Pathology - Research and Practice**, v. 263, p. 155574, nov. 2024.

AHMED, S. *et al.* Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. **Rheumatology**, v. 40, n. 6, p. 662–667, jun. 2001.

AKIBA, Hisaya *et al.* The Role of ICOS in the CXCR5+ Follicular B Helper T Cell Maintenance In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2340–2348, 15 ago. 2005.

AKSOY, Pinar; GOTTSCHALK, Elinor Y.; MENESES, Patricio I. HPV entry into cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 13–22, abr. 2017.

ALEGRE, Maria-Luisa; FRAUWIRTH, Kenneth A.; THOMPSON, Craig B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 3, p. 220–228, dez. 2001.

AMADOR-MOLINA, Alfredo *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.

AMATORE, Florent; GORVEL, Laurent; OLIVE, Daniel. Role of Inducible Co-Stimulator (ICOS) in cancer immunotherapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 20, n. 2, p. 141–150, 1 fev. 2020.

APT, Doris. *et al.* High Sp1/Sp3 Ratios in Epithelial Cells during Epithelial Differentiation and Cellular Transformation Correlate with the Activation of the HPV-16 Promoter. **Virology**, v. 224, n. 1, p. 281–291, out. 1996.

ARANDA-RIVERA, Ana Karina *et al.* Regulation of autophagy by high- and low-risk human papillomaviruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 2, p. e2169, mar. 2021.

ARIMURA, Yutaka *et al.* A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in Th cells and regulates their responses. **International Immunology**, v. 14, n. 6, p. 555–566, jun. 2002.

ASHRAFI, G. Hossein *et al.* E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain *via* its first hydrophobic domain. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2105–2112, nov. 2006.

BAEK, Jihae *et al.* The association of CD28 polymorphism, rs3116496, with Cancer: A meta-analysis. **Computers in Biology and Medicine**, v. 61, p. 172–177, 1 jun. 2015.

BAKER, T. S. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophysical Journal**, v. 60, n. 6, p. 1445–1456, dez. 1991.

BOESTEANU, Alina C.; KATSIKIS, Peter D. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. **Seminars in Immunology**, v. 21, n. 2, p. 69–77, abr. 2009.

BOOMER, J. S.; GREEN, J. M. An Enigmatic Tail of CD28 Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 8, p. a002436–a002436, 1 ago. 2010.

BORDIGNON, Valentina. *et al.* How human papillomavirus replication and immune evasion strategies take advantage of the host DNA damage repair machinery. **Viruses**, v. 9, n. 12, 2017.

BRANCACCIO, Rosario N. *et al.* Generation of a novel next-generation sequencing-based method for the isolation of new human papillomavirus types. **Virology**, v. 520, p. 1–10, jul. 2018.

BRAVO, Ignacio G.; ALONSO, Ángel. Mucosal Human Papillomaviruses Encode Four Different E5 Proteins Whose Chemistry and Phylogeny Correlate with Malignant or Benign Growth. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 13613–13626, 15 dez. 2004.

BRAVO, Ignacio G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, Marta. Papillomaviruses. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015.

BURMEISTER, Yvonne *et al.* ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 2, p. 774–782, 15 jan. 2008.

CARRENO, Beatriz M.; COLLINS, Mary. The B7 Family of Ligands and Its Receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 29–53, abr. 2002.

CHEN, Ann Ying-An *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms of Immunity-Related Genes and Their Effects on Immunophenotypes in Different Pig Breeds. **Genes**, v. 12, n. 9, p. 1377, 31 ago. 2021.

CHEN, Lieping; FLIES, Dallas B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, abr. 2013.
CHEN, Shuang *et al.* Investigation of CD28 Gene Polymorphisms in Patients with Sporadic Breast Cancer in a Chinese Han Population in Northeast China. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e48031, 25 out. 2012.

CHEN, X. *et al.* Association of CD28 gene polymorphism with cervical cancer risk in a Chinese population: CD28 polymorphism and cervical cancer. **International Journal of Immunogenetics**, v. 38, n. 1, p. 51–54, fev. 2011.

CONNOR, M. O. *et al.* Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPV. **Human Papillomaviruses**, p.21-40, 1995.

COYLE, Anthony J. *et al.* The CD28-Related Molecule ICOS Is Required for Effective T Cell–Dependent Immune Responses. **Immunity**, v. 13, n. 1, p. 95–105, jul. 2000.

CRUZ, Linda; MEYERS, Craig. Differential Dependence on Host Cell Glycosaminoglycans for Infection of Epithelial Cells by High-Risk HPV Types. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68379, 4 jul. 2013.

DELLA FERA, Ashley. *et al.* Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 321, feb. 2021.

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

DOORBAR, John. *et al.* Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 2-23, mar. 2015.

DOWNS-CANNER, Stephanie *et al.* Suppressive IL-17A+Foxp3+ and ex-Th17 IL-17A^{neg}Foxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14649, 14 mar. 2017.

EGAWA, Nagayasu *et al.* Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863–3890, 16 jul. 2015.

ENGELHARDT, John J.; SULLIVAN, Timothy J.; ALLISON, James P. CTLA-4 Overexpression Inhibits T Cell Responses through a CD28-B7-Dependent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 1052–1061, 15 jul. 2006.

ESENSTEN, Jonathan H. *et al.* CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 973–988, may 2016.

FAVRE, M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 15, n. 5, p. 1239–1247, may 1975.

FOS, Camille *et al.* ICOS Ligation Recruits the p50 α PI3K Regulatory Subunit to the Immunological Synapse. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 1969–1977, 1 ago. 2008.

GANTI, Ketaki *et al.* The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3530–3551, 2 jul. 2015.

GHEIT, Tarik. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 355, 8 maio 2019.

GRIMBACHER, Bodo *et al.* Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. **Nature Immunology**, v. 4, n. 3, p. 261–268, mar. 2003.

HAEDICKE, Juliane; IFTNER, Thomas. Human papillomaviruses and cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 108, n. 3, p. 397–402, 2013.

HASAN, Uzma 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, 1 mar. 2007.

HEDRICK, P. W. Population genetics of malaria resistance in humans. **Heredity**, v. 107, n. 4, p. 283–304, oct. 2011.

HERFS, Michael *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10516–10521, 26 jun. 2012.

HIBMA, Marilyn H. The Immune Response to Papillomavirus During Infection Persistence and Regression. **The Open Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 241–248, 28 dez. 2012.

HONG, Shiyuan *et al.* STAT-5 Regulates Transcription of the Topoisomerase II β -Binding Protein 1 (TopBP1) Gene To Activate the ATR Pathway and Promote Human Papillomavirus Replication. **mBio**, v. 6, n. 6, p. e02006-15, 31 dez. 2015.

HOPPE-SEYLER, Karin; BOSSLER, Felicitas; BRAUN, Julia A.; *et al.* The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 158–168, 2018.

HUTLOFF, Andreas *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 263–266, jan. 1999.

IHARA, Kenji *et al.* Association studies of *CTLA-4*, *CD28*, and *ICOS* gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. **Immunogenetics**, v. 53, n. 6, p. 447–454, 1 ago. 2001.

ILAHI, Naureen Ehsan; BHATTI, Attya. Impact of HPV E5 on viral life cycle via EGFR signaling. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103923, fev. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer. Tipos de câncer. Câncer de corpo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Available at:

<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/corpo-do-utero>. Access at: 11 mai. 2025.

IVANSSON, Emma L.; JUKO-PECIREP, Ivana; GYLLENSTEN, Ulf B. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 3, p. 544–548, mar. 2010.

JIANG, Jiakai *et al.* Association between ICOS polymorphisms and risk of colorectal cancer: a case-control study involving 2,606 subjects. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 11, n. 5, p. 2822–2830, 2018.

JIANG, Tingwang. Enhanced proliferation and defective activation-induced cell death of CD4+ T cells in childhood asthma. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 32, n. 1, 2 jul. 2013.

KARABON, Lidia *et al.* CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphism associations with non-small-cell lung cancer. **Human Immunology**, v. 72, n. 10, p. 947–954, out. 2011.

KINES, Rhonda C.; SCHILLER, John T. Aproveitando o tropismo natural do papilomavírus humano para atingir tumores. **Vírus**, v. 14, n. 8, pág. 1656, 2022.

KINES, Rhonda C.; THOMPSON, Cynthia D.; LOWY, Douglas R.; *et al.* The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20458–20463, 2009.

KIRCHHOFF, S. *et al.* Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 10, p. 2765–2774, out. 2000.

KLINGELHUTZ, Aloysius J.; FOSTER, Scott A.; MCDOUGALL, James K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 79–82, mar. 1996.

LEAVENWORTH, Jianmei W. *et al.* A p85 α -osteopontin axis couples the receptor ICOS to sustained Bcl-6 expression by follicular helper and regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 96–106, jan. 2015.

LINSLEY, P. S.; CLARK, E. A.; LEDBETTER, J. A. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 13, p. 5031–5035, jul. 1990.

LIU, Danya *et al.* Inhibition of Donor-Reactive CD8+ T Cell Responses by Selective CD28 Blockade Is Independent of Reduced ICOS Expression. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130490, 22 jun. 2015.

MARSH, Elizabeth K. *et al.* Mitotic control of human papillomavirus genome-containing cells is regulated by the function of the PDZ-binding motif of the E6 oncoprotein. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19491–19506, 21 mar. 2017.

MAYR, Christine. What Are 3' UTRs Doing? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 10, p. a034728, out. 2019.

MCBRIDE, Alison A.; WARBURTON, Alix. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. e1006211, 6 abr. 2017.

MCBRIDE, Alison A. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 95–108, 2022.

MESTURINI, Riccardo *et al.* ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN- γ and modulates activation of human naïve CD4⁺ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 10, p. 2601–2612, out. 2006.

MO, Lijun *et al.* Depletion of regulatory T cells by anti-ICOS antibody enhances anti-tumor immunity of tumor cell vaccine in prostate cancer. **Vaccine**, v. 35, n. 43, p. 5932–5938, out. 2017.

MOODY, Cary A.; LAIMINS, Laimonis A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, ago. 2010.

MOODY, Cary. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 261, 19 set. 2017.

MÜNGER, K. *et al.* Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 13, p. 4099–4105, dez. 1989.

NOBRE, Rui Jorge *et al.* E7 Oncoprotein of Novel Human Papillomavirus Type 108 Lacking the E6 Gene Induces Dysplasia in Organotypic Keratinocyte Cultures. **Journal of Virology**, v. 83, n. 7, p. 2907–2916, abr. 2009.

PANGARKAR, Meena. The Bethesda System for reporting cervical cytology. **Cytojournal**, v. 19, p. 28, apr. 2022.

PAL, Asmita; KUNDU, Rita. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3116, 21 jan. 2020.

PEDROS, Christophe *et al.* A TRAF-like motif of the inducible costimulator ICOS controls development of germinal center TFH cells via the kinase TBK1. **Nature Immunology**, v. 17, n. 7, p. 825–833, jul. 2016.

PENG, Changwei *et al.* Engagement of the costimulatory molecule ICOS in tissues promotes establishment of CD8⁺ tissue-resident memory T cells. **Immunity**, v. 55, n. 1, p. 98–114.e5, jan. 2022.

RICHTER, G.; BURDACH, S. ICOS: A New Costimulatory Ligand/Receptor Pair and Its Role in T-Cell Activation. **Oncology Research and Treatment**, v. 27, n. 1, p. 91–95, 2004.

RILEY, James L. *et al.* Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11790–11795, 3 set. 2002.

RODRÍGUEZ-PALMERO, Marta *et al.* Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 12, p. 3914–3924, dez. 1999.

RUJAS, Edurne *et al.* Structural characterization of the ICOS/ICOS-L immune complex reveals high molecular mimicry by therapeutic antibodies. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5066, 8 out. 2020.

RUFFIN, Mack T; BAILEY, Joanne M; ROULSTON, Diane; *et al.* Human papillomavirus in amniotic fluid. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 6, n. 1, p. 28, 2006.

SABAT, Robert *et al.* Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 331–344, out. 2010.

SAPP, Martin. *et al.* Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 9, p. 2407–2412, 1 set. 1995.

SASAGAWA, Toshiyuki; TAKAGI, Hiroaki; MAKINODA, Satoru. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807–815, 2012.

SCARTH, James A. *et al.* The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 3, 10 fev. 2021.

SCHELHAAS, Mario *et al.* Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002657, 19 abr. 2012.

SCHIFFMAN, Mark; WENTZENSEN, Nicolas. Human Papillomavirus Infection and the Multistage Carcinogenesis of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 4, p. 553–560, 1 abr. 2013.

SCHLECHT, N. F. Human Papillomavirus Infection and Time to Progression and Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **CancerSpectrum Knowledge Environment**, v. 95, n. 17, p. 1336–1343, 3 set. 2003.

SCOTT, Matthew L. *et al.* Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. **Journal of Virology**, v. 94, n. 2, p. e01582-19, 6 jan. 2020.

SHAFTI-KERAMAT, Saeed *et al.* Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 77, n. 24, p. 13125–13135, 15 dez. 2003.

SHIN, Myeong-Kyun *et al.* Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Overrides the Tumor Suppressor Activity of p21Cip1 in Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 69, n. 14, p. 5656–5663, 15 jul. 2009.

SILVEIRA, F. A. *et al.* The association of HPV genotype with the regression, persistence or progression of low-grade squamous intraepithelial lesions. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 99, n. 3, p. 702–706, dez. 2015.

SOLINAS, Cinzia; GU-TRANTIEN, Chunyan; WILLARD-GALLO, Karen. The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. **ESMO Open**, v. 5, n. 1, p. e000544, 2020.

Stanley, Margaret. “Immune Responses to Human Papillomavirus and the Development of Human Papillomavirus Vaccines”. *Human Papillomavirus*, **Elsevier**, 2020, p. 283–97.

STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 6, p. 1456–1460, 2007.

STANLEY, Margaret. Host defence and persistent human papillomavirus infection. **Current Opinion in Virology**, v. 51, p. 106–110, dez. 2021.

STONE, Erica L. *et al.* ICOS Coreceptor Signaling Inactivates the Transcription Factor FOXO1 to Promote Tfh Cell Differentiation. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 239–251, fev. 2015.

TAI, Xuguang *et al.* CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. **Nature Immunology**, v. 6, n. 2, p. 152–162, fev. 2005.

TANG, Derek *et al.* Increased Frequency of ICOS+ CD4 T Cells as a Pharmacodynamic Biomarker for Anti-CTLA-4 Therapy. **Cancer Immunology Research**, v. 1, n. 4, p. 229–234, 1 out. 2013.

TAO, X. *et al.* Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 159, n. 12, p. 5956–5963, 15 dez. 1997.

THE HUMAN GENOME STRUCTURAL VARIATION WORKING GROUP *et al.* Completing the map of human genetic variation. **Nature**, v. 447, n. 7141, p. 161–165, 10 maio 2007.

THOMAS, Rajan M.; GAO, Ling; WELLS, Andrew D. Signals from CD28 Induce Stable Epigenetic Modification of the IL-2 Promoter. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4639–4646, 15 abr. 2005.

TIAN, Tian *et al.* Potential role of naturally acquired immunity against HPV in the control of HPV related diseases. **The Lancet Regional Health - Western Pacific**, v. 13, p. 100220, ago. 2021.

TORRISI, A. *et al.* Colposcopy, cytology and HPV-DNA testing in HIV-positive and HIV-negative women. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 21, n. 2, p. 168–172, 2000.

TUMMERS, Bart; VAN DER BURG, Sjoerd. High-Risk Human Papillomavirus Targets Crossroads in Immune Signaling. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2485–2506, 21 maio 2015.

TUPIKOWSKI, K. *et al.* CTLA-4 and CD28 genes' polymorphisms and renal cell carcinoma susceptibility in the Polish population – a prospective study. **Tissue Antigens**, v. 86, n. 5, p. 353–361, nov. 2015.

VAN DOORSLAER, Koenraad.; MCBRIDE, Alison. Molecular archeological evidence in support of the repeated loss of a papillomavirus gene. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33028, sep. 2016.

VAN DOORSLAER, Koenraad *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 8, p. 989–990, 1 ago. 2018

VATS, A. *et al.* Human papillomavirus E6 and E7: What remains? **Tumour Virus Research**, v. 11, p. 200-213, jun. 2021.

WALLIN, Jeffrey J. *et al.* Enhancement of CD8+ T Cell Responses by ICOS/B7h Costimulation. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 132–139, 1 jul. 2001.

WALUNAS, Theresa L. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**, v. 1, n. 5, p. 405–413, ago. 1994.

WASSINK, Lianne *et al.* ICOS Expression by Activated Human Th Cells Is Enhanced by IL-12 and IL-23: Increased ICOS Expression Enhances the Effector Function of Both Th1 and Th2 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 1779–1786, 1 ago. 2004.

WEBER, Jan P. *et al.* ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 2, p. 217–233, 9 fev. 2015.

WIKENHEISER, Daniel J.; STUMHOFER, Jason S. ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? **Frontiers in Immunology**, v. 7, 10 ago. 2016.

WILCZYNSKI, S.P.; OFT, M.; COOK, N.; *et al.* Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. **Human Pathology**, v. 24, n. 1, p. 96–102, 1993.

WOLF, Anna Maria *et al.* Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 606–612, fev. 2003.

WU, Dongjuan *et al.* Five functional polymorphisms of B7/CD28 co-signaling molecules alter susceptibility to colorectal cancer. **Cellular Immunology**, v. 293, n. 1, p. 41–48, jan. 2015.

XING, Jing *et al.* The Expression of CD28 and Its Synergism on the Immune Response of Flounder (*Paralichthys olivaceus*) to Thymus-Dependent Antigen. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 765036, 11 nov. 2021.

YANG, E. J. *et al.* Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. **Modern Pathology**, v. 28, n. 7, p. 994–1000, jul. 2015.

YANG, J. *et al.* Paradoxical Functions of B7: CD28 Costimulation in a MHC Class II-Mismatched Cardiac Transplant Model. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 12, p. 2837–2844, dez. 2009.

YONG, Patrick F. K.; SALZER, Ulrich; GRIMBACHER, Bodo. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. **Immunological Reviews**, v. 229, n. 1, p. 101–113, maio 2009.

YU, Lulu; MAJERCIK, Vladimir; ZHENG, Zhi-Ming. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4943, 29 abr. 2022

ZHOU, Qingfeng *et al.* Human papillomavirus DNA in surgical smoke during cervical loop electrosurgical excision procedures and its impact on the surgeon. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 3643–3654, 29 abr. 2019.

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

The article was written according to STROBE (Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology).

Journal recommendation for publication: *Viruses*

CD28 rs3116496 VARIANT IS ASSOCIATED WITH HIGH-GRADE CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS IN HPV-INFECTED WOMEN

The pathogenesis of cervical cancer is linked to persistent infection by Human Papillomavirus (HPV). However, this alone is not sufficient for carcinogenesis. T cells contribute to antitumor immunity by regulating and activating the costimulatory molecules CD28 and ICOS. The expression of the molecules can be influenced by single nucleotide variants (SNVs). This study evaluated the association of the SNVs rs3116496 in *CD28* and rs4404254 in *ICOS* with HPV infection, the development of cervical intraepithelial lesions, and cervical cancer. A total of 450 women were included, divided into HPV-positive (n=263) and HPV-negative (n=187) groups. The HPV-positive women were further categorized into: no lesion (n=116), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) (n=21), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (n=61), and cervical cancer (n=65). Peripheral blood and cervical secretion samples were collected at public health system units (SUS) and the Cancer Hospital of Londrina. These samples were used for genomic DNA extraction, SNV analysis via quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), and HPV detection through PCR. Statistical analyses were conducted using SPSS Statistics (p<0.05). Sociodemographic, behavioral, and sexual characteristics showed significant associations with HPV infection and the presence of cervical lesions. The SNV rs3116496 *CD28* was associated with HSIL in both codominant (OR: 2.029; 95% CI: 1.028–4.007; p=0.041) and dominant genetic models (OR: 2.085; 95% CI: 1.089–3.989; p=0.027). Haplotypes did not show significant associations with HPV infection or cervical lesions. While the study's limited sample size, particularly in the LSIL group, may affect the statistical power of the findings, the comprehensive collection of demographic, behavioral and sexual data enhances the robustness of the analysis, suggesting a potential role for the C allele of rs3116496 variant in the immunopathogenesis of cervical cancer in the Brazilian population.

Keywords: Human papillomavirus; Cluster of Differentiation 28; Inducible T-cell costimulator; Checkpoint molecules; Immunogenetics; Co-stimulatory molecules;

INTRODUCTION

Cervical cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality in women, especially in low- and middle-income countries (Arbyn et al., 2020; Ferlay et al., 2021). Its pathogenesis is primarily associated with persistent infection by oncogenic subtypes of Human Papillomavirus (HPV); however, persistent infection alone is not sufficient for carcinogenesis. Intrinsic cofactors such as immunological, hormonal, socioeconomic, environmental, and genetic factors play a fundamental role in the progression from infection to cancer development (Gheit, 2019).

HPV remains a major global public health concern. The World Health Organization (WHO) estimates that the majority of sexually active individuals will be infected with HPV at some point in their lives (WHO Fact Sheet, 2016). Although HPV infection is highly prevalent, most cases are transient and resolve spontaneously without clinical signs or symptoms. In some instances, however, the infection becomes persistent and may lead to the development of cervical intraepithelial lesions, which can progress to cervical cancer (Pangarkar, 2022).

T cell-mediated immune response is essential for controlling HPV infection and preventing neoplastic progression. In this context, the costimulatory molecules CD28 (Cluster of Differentiation 28) and ICOS (Inducible T-cell COStimulator) play a critical role in the activation, proliferation, differentiation, and survival of T cells, being fundamental for the development of an effective immune response for viral clearance and control of malignant transformation. These molecules are homologous in structure and function and are located at the same chromosomal locus (2q33.2) (Chen, 2004; Hutloff et al., 1999). However, while CD28 is constitutively expressed, the costimulatory molecule ICOS is expressed exclusively after T cell activation mediated by the TCR/CD3 complex (Rujas et al., 2020).

Single nucleotide variants (SNVs) in genes encoding CD28 and ICOS receptors may influence the efficiency of the immune response and, consequently, susceptibility to cancer by modulating the expression or function of these molecules.

Among the SNVs in the *ICOS* gene, rs4404254 has been one of the most investigated regarding its association with cancer, autoimmune diseases, and chronic infections (Ivansson et al., 2010; Wu et al., 2015). It consists of a thymine (T) to cytosine (C) substitution in the 3' untranslated region (3'UTR) of the gene, which is involved in the regulation of mRNA localization, stability, and translation. This region also contains microRNA (miRNA) binding sites that mediate post-transcriptional repression, potentially influencing ICOS expression in T cells.

In the *CD28* gene, the rs3116496 SNV has been widely studied in relation to susceptibility to cervical cancer, lung cancer, colorectal cancer, breast cancer, and renal cell carcinoma (Alegre et al., 2001; Baek et al., 2014; Ihara et al., 2001). This variant consists of a thymine (T) to cytosine (C) substitution in intron 3 of the *CD28* gene. Since intronic regions can affect RNA splicing—leading to inappropriate exon inclusion or exclusion—this variant may impair the expression of the molecule in T cells (Ahmed et al., 2001; Baek et al., 2014; Mayr, 2019).

Considering that persistent HPV infection is the most common infection worldwide, and that cervical cancer is the third most frequent type of cancer among women in Brazil, it is essential to develop studies focused on the immunogenetic mechanisms involved in the progression of cervical lesions to cervical cancer (INCA, 2023; World Health Organization, 2020).

In this context, the present study aims to evaluate the association of the rs3116496 T>C variant in the *CD28* gene and the rs4404254 T>C variant in the *ICOS* gene with HPV infection, the development of cervical intraepithelial lesions, and cervical cancer, given that these molecules play a fundamental role in costimulation and modulation of T cell activation.

In the present study we investigated how the rs3116496 T>C variant in the *CD28* gene and the rs4404254 T>C variant in the *ICOS* gene are associated with HPV infection, the progression of cervical intraepithelial lesions, and the development cervical cancer. These genes play a fundamental role in the costimulation and modulation of T cell activation, which are essential for an effective immune response. Persistent HPV infection, potentially influenced by these genetic variants, may contribute to an increased risk of developing high-grade lesions and cervical cancer, making these SNVs potential biomarkers of susceptibility and disease progression.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample Characterization

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina – Paraná (PR), Brazil (CAAE 38937520.2.0000.5231). The samples were obtained from women over 18 years of age who were assisted by cervical cancer prevention programs at primary healthcare units (UBS) in northern Paraná and at the Cancer Hospital of Londrina. Participation was voluntary and occurred upon agreement and signature of the informed consent form (Appendix A). Following consent, we collected peripheral blood and cervical secretion samples containing cells from the uterine cervical epithelium, as well as the completion of a sociodemographic questionnaire (Appendix B). The questionnaire gathered information on sociodemographic factors (age, smoking status, ethnicity, educational level, marital status, and monthly income) and reproductive and sexual behavior (use of contraceptive methods, age at menarche, age at first sexual intercourse, number of lifetime sexual partners, knowledge about HPV and its transmission, prior gynecological exams, and family history of cervical cancer).

Peripheral blood samples were obtained via venipuncture into EDTA-containing tubes transported under refrigeration, and stored at -20°C after processing for DNA extraction. Cervical secretion samples were collected during Pap smear examinations using sterile brushes and stored in Falcon tubes containing 2 mL of TE buffer solution (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM). These samples were processed for DNA extraction and subsequently stored at -20°C. After HPV detection, samples were classified based on the presence or absence of infection and divided into two groups: HPV-negative (n=187), which served as the control group, and HPV-positive (n=263). The HPV-positive samples were further subdivided according to cervical cytology into: no cervical lesions (n=116), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) (n=21), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (n=61), and cervical cancer (n=65).

2.2 DNA EXTRACTION

Genomic DNA from peripheral blood was isolated using the Biopur Mini Spin Plus Extraction Kit (Mobius Life Science, Pinhais, Paraná, Brazil), while genomic DNA from cervical secretion samples was isolated using the Qlamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

The extracted DNA fragments were quantified by spectrophotometry using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), at wavelengths of 260 nm (for DNA) and 280 nm (for proteins). DNA concentration (ng/μL) was determined, and purity was assessed by calculating the A260/A280 ratio. Only DNA samples with a ratio equal to or greater than 1.7 were included in the analyses.

2.3 HPV DETECTION

2.3.1 Amplification of HPV Nucleotide Sequences

HPV DNA detection was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, employing the forward primer MY09 (5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3') and the reverse primer MY11 (5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'), based on GenBank Accession Number AJ236888, which amplify a conserved 450 bp region of the HPV L1 gene. This was followed by a nested PCR using the product from the first reaction and the primers GP5+ (5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3') and GP6+ (5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'). All reactions included a negative control (no DNA) and a positive control (HeLa cell DNA) to ensure the absence of contamination and to verify the proper functioning of the PCR in the presence of the virus. After performing the PCRs for HPV and β-globin detection, the products were subjected to electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel at 110 V, followed by silver nitrate staining. The polyacrylamide gel was analyzed using a white light transilluminator and documented by photo documentation.

2.5 ANALYSIS OF GENETIC VARIANTS OF *CD28* AND *ICOS*

The analysis of genetic variants for genotyping the *CD28* (rs3116496 T>C) and *ICOS* (rs4404254 T>C) genes was performed by real-time PCR using validated 40X hydrolysis probe assays (TaqMan™ System, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The reactions were carried out using DNA samples (1 ng/μL), TaqMan™ Universal PCR Master Mix (TaqMan™ System), and the specific probe for each genetic variant [rs3116496 (Assay ID C__25922478_10); rs4404254 (Assay ID C__27916485_10)], following the reagent volumes and cycling conditions recommended by the manufacturer.

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using SPSS Statistics version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), considering $p < 0.05$ as statistically significant. The frequency of variant alleles was calculated using the formula $[1 \times (h + 2H)] / 2N$, where h represents the heterozygous genotype, H the homozygous genotype, and N the sample size of each population. The chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test was used to evaluate differences in the frequency distributions of sociodemographic data, reproductive and sexual behavior characteristics, as well as genetic variants between groups related to HPV infection and lesion grade. The chi-square test (χ^2) was also used to determine deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and genotype distribution among the studied groups. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated to analyze susceptibility. Binary and multinomial logistic regression analyses were performed to assess the impact of genetic variants, their genotypes, and haplotypes on HPV infection and lesion development, adjusting for confounding factors. Haplotype inference and analysis of recombination events between SNV alleles in the CD28 and ICOS genes were performed using PHASE software, version 2.1.1.

3. RESULTS

3.1 Association of Sociodemographic, Reproductive, and Sexual Behavior Characteristics with HPV Infection

The study involved 450 women, with 187 (41.55%) testing HPV-negative and 263 (58.45%) testing HPV-positive. Among the groups HPV-positive, participants were further categorized into: without cervical lesions (n=116), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) (n=21), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (n=61), and cervical cancer (n=65).

Statistically significant differences were identified among the groups analyzed. These differences were observed for several factors: age group ($p=0.003$), smoking status ($p=0.002$), ethnicity ($p=0.046$), marital status ($p=0.001$), personal income ($p=0.001$), age at menarche ($p<0.001$), number of lifetime sexual partners ($p=0.021$), knowledge about HPV ($p<0.001$), and family history of cancer ($p=0.004$), as detailed in Tables 1 and 2.

3.2 Association of Sociodemographic, Reproductive, and Sexual Behavior Characteristics with the Presence of Cervical Lesions

Sociodemographic, reproductive, and sexual behavior variables were analyzed in association with the presence of cervical lesions, classified as no lesion, LSIL, HSIL, and cervical cancer. Statistically significant differences were observed between some of the groups analyzed, including age ($p<0.001$), ethnicity ($p=0.006$), income ($p<0.001$), smoking status ($p<0.001$), education level ($p<0.001$), marital status ($p=0.001$), contraceptive use ($p=0.029$), age at menarche ($p<0.001$), number of lifetime sexual partners ($p<0.001$), knowledge about HPV ($p<0.001$), knowledge about HPV transmission ($p<0.001$), number of pregnancies ($p=0.005$), and family history of cervical cancer ($p<0.001$) (Tables 1 and 2).

3.3 Distribution of Alleles, Genotypes, and Haplotypes of the rs3116496 Variant in *CD28* and rs4404254 in *ICOS* and Susceptibility to HPV Infection, Development of Cervical Lesions, and Cervical Cancer

Women were genotyped for the SNV rs3116496 in the *CD28* gene and rs4404254 in the *ICOS* gene. Each SNV was analyzed in both HPV-positive and HPV-negative groups, as well as in groups with different cervical lesions (LSIL, HSIL,

and cancer), to test for Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypic frequencies did not meet equilibrium in the non-infected, infected, and lesion groups ($p < 0.05$).

Table 3 presents allele and genotype distributions among these groups. There were no statistically significant differences in the distribution of *CD28* rs3116496 alleles ($p = 0.390$), nor in the distribution of *ICOS* rs4404254 alleles ($p = 0.974$) between the HPV infection groups. Similarly, no significant association was observed in the allele distributions of rs3116496 ($p = 0.068$) and rs4404254 ($p = 0.124$) among the cervical lesion groups.

The genotype distribution of *CD28* rs3116496 between HPV infection groups showed no statistical significance in codominant ($p = 0.386$), dominant ($p = 0.251$), and recessive ($p = 0.683$) models. Similarly, the *ICOS* rs4404254 genotype distribution showed no significant differences according to the HPV infection groups in the codominant ($p = 0.718$), dominant ($p = 0.750$), and recessive ($p = 0.552$) models. In relation to lesion grades and the genotypic distribution of rs3116496 in the *CD28*, no statistically significant associations were found in the codominant ($p = 0.116$), dominant ($p = 0.106$), and recessive ($p = 0.178$) models. When evaluating the genotype distribution of the SNV rs4404254 in the *ICOS* gene in relation to cervical lesion grades, we observed no statistically significant association between the codominant ($p = 0.305$), dominant ($p = 0.448$), and recessive ($p = 0.093$) genetic models and the different cervical lesion grades (Table 3).

Binary and multinomial logistic regression analyses were conducted to assess the influence of these SNVs on susceptibility to HPV infection and the development of cervical lesions and cancer (Table 4). In the codominant model analysis of SNV rs3116496 in the *CD28*, women with the TC genotype (OR = 2.029; 95% CI = 1.028–4.007; $p = 0.041$) had a higher likelihood of developing HSIL compared to those with the TT genotype. This association was also observed in the dominant model of rs3116496, where the combination of TC+CC genotypes (OR = 2.085; 95% CI = 1.089–3.989; $p = 0.027$) was associated with an increased risk of HSIL compared to the TT genotype.

Due to the small sample size in some genotype groups—particularly those with the homozygous variant genotype—binary and multinomial logistic regression analyses adjusted for confounding factors were performed only under the dominant genetic model for the SNVs, in order to ensure statistical robustness. As shown in Table 5, no statistically significant associations ($p > 0.05$) were found between the

SNVs rs3116496 (*CD28*) and rs4404254 (*ICOS*) with HPV infection, development of cervical intraepithelial lesions, or cervical cancer, after adjustment for confounding variables.

The combination of the genetic variants rs3116496 in *CD28* and rs4404254 in *ICOS* was analyzed, and four haplotypes were inferred in the *CD28/ICOS* order: TT, TC, CT, and CC. Only haplotypes with a frequency greater than 5% were selected for haplotype analysis: TT, TC, and CT. The comparison of haplotype frequencies for rs3116496 and rs4404254 between HPV-infected and non-infected groups, as well as among cervical lesion groups, showed no statistically significant differences ($p > 0.05$) (Table 6). Similarly, when analyzing the association of haplotypic genetic models with HPV infection and cervical lesion development, no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$) (Tables 7 and 8). Binary and multinomial logistic regression analyses adjusted for confounding factors were performed using the haplotype models, and no significant associations were found between the haplotypes and HPV infection or cervical lesion groups (Table 9).

4. DISCUSSION

The present study analyzed the association of alleles, genotypes, and haplotypes of the SNVs rs3116496 (T>C) in *CD28* and rs4404254 (T>C) in *ICOS* with HPV infection, the development of cervical lesions, and cervical cancer in a female population from southern Brazil. To our knowledge, this is the first study to investigate these genetic variants in this specific population and context.

The results support and are consistent with the existing literature, indicating that sociodemographic, behavioral, and sexual factors act as cofactors associated with HPV infection and the development of cervical lesions, which may progress to cervical cancer (Roik *et al.*, 2018). Variables such as age group, ethnicity, smoking habits, marital status, personal income, age at menarche, number of lifetime sexual partners, knowledge about HPV, and family history of cervical cancer were associated with HPV infection. Meanwhile, age group, ethnicity, income, smoking, education level, marital status, contraceptive use, age at menarche, number of lifetime sexual partners, knowledge about HPV, knowledge about HPV transmission, number of pregnancies, and family history of cervical cancer were associated with the development of cervical lesions or cervical cancer.

It is known that the adaptive immune response mediated by T lymphocytes plays a crucial role in the antiviral immune response against HPV and in the antitumor response, preventing the progression of cervical intraepithelial lesions to cervical cancer (Chen *et al.*, 2004). The activation and function of T lymphocytes depend on co-stimulation by co-stimulatory molecules such as CD28 and ICOS. SNVs in the *CD28* gene (rs3116496 T>C) and *ICOS* gene (rs4404254 T>C) may influence the expression and function of these molecules during T lymphocyte activation, thereby altering the antiviral and antitumor immune responses.

In this study, when analyzing the genetic variant rs3116496 (T>C) of the *CD28* gene, it was observed that women carrying the TC genotype had a significantly higher probability of developing HSIL compared to those with the homozygous TT genotype. In the dominant genetic model, the combination of TC+CC genotypes was also associated with an increased risk of HSIL in relation to the TT genotype, suggesting that the presence of the C allele may play a potential risk role in the development of more severe cervical intraepithelial lesions. These findings reinforce the hypothesis that SNVs in the *CD28* gene may modulate T-cell activation and consequently influence the immune response against HPV infection. The C allele of the *CD28* rs3116496 SNV may be associated with alterations in the expression or function of the CD28 receptor, impacting the co-stimulatory signaling essential for T-cell activation, thereby influencing the balance between effector and regulatory immune responses and, consequently, immune surveillance against infected and transformed cervical cells.

Our results are consistent with evidence described in the literature, where the C allele has been identified as a potential risk marker in different tumor contexts. Studies in Asian populations reported that the C allele is associated with increased susceptibility to breast cancer development (Chen *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2017). Regarding cervical cancer, it has been reported that the TT genotype was associated with a lower risk of cervical cancer in Chinese and Swedish populations (Chen *et al.*, 2012; Ivansson *et al.*, 2010). On the other hand, Guzman *et al.* (2008) identified in Brazilian women that the combination of the TT genotype of *CD28* with the IFN+847AA polymorphism increased the risk of cervical cancer, highlighting that the effects of this genetic variant may vary according to the genetic and ethnic background of the population.

Regarding the genetic variant rs4404254 (T>C) of *ICOS*, our study did not find a significant association with HPV infection or the development of cervical lesions, which may progress to cervical cancer. Similarly, a study conducted in a Chinese cohort also reported no significant association between the *ICOS* rs4404254 SNV and the risk of developing hepatocellular carcinoma (Yang et al., 2019). However, there is evidence that this SNV may exert influence in specific contexts. A study conducted in colorectal cancer patients observed that SNVs located in the 3'-UTR region of the *ICOS* gene, including rs4404254, were associated with a protective effect against colorectal cancer development. In that study, the C allele of rs4404254 (T>C) appeared to reduce the binding of microRNAs such as miR-186-5p, miR-1279, miR-3692-3p, and miR-2117 to the *ICOS* 3'-UTR, resulting in increased expression of this receptor in T cells, thereby enhancing T-cell activation and generating a more effective immune response against carcinogenesis (Wu et al., 2014). Therefore, these conflicting findings may suggest that the genetic variant rs4404254 exerts variable effects depending on the type of cancer and the ethnic background of the studied population, highlighting the need for further studies in different clinical settings.

Although our study did not identify significant associations between *CD28* and *ICOS* haplotypes with HPV infection or the presence of cervical lesions, it is important to highlight that these genes are located within the same chromosomal locus (region 2q33), forming a gene block that encodes co-stimulatory receptors crucial for the activation and regulation of T cell-mediated immune responses. Thus, nearby genetic variants may be co-inherited, suggesting that epistatic or regulatory effects among these variants could synergistically or antagonistically contribute to susceptibility to HPV infection, progression of cervical lesions, and the development of cervical cancer. Additional studies involving the analysis of *CD28* and *ICOS* haplotypes are needed to further elucidate the potential genetic interactions involved in antiviral responses and HPV-associated carcinogenesis.

This study has some limitations, such as the sample size, especially in the LSIL group, which may reduce the statistical power of the analyses. However, biologically, the low number of LSIL samples may be explained by the fact that cervical lesions can progress directly to HSIL (Doobar; Griffin, 2019). Further studies are needed in the Brazilian female population to obtain more reliable results regarding population heterogeneity. Our study has strengths, such as the collection of

sociodemographic, behavioral, and sexual data from participants, allowing statistical analyses to be performed controlling for confounding factors during the SNV analysis.

5. CONCLUSION

Although further studies are needed to confirm our findings, it was observed that the C allele of the genetic variant rs3116496 (T>C) in the *CD28* gene is associated with the development of HSIL in a cohort of the Brazilian population, suggesting that this variant may be involved in the immunopathogenesis of cervical lesion development.

Table 1. Sociodemographic characteristics of participants according to HPV infection status and presence of cervical lesions

Variables		HPV				p-value	Lesion grade (Infected patients)								p-value
		Uninfected (n=187)		Infected (n=263)			No lesion (n=116)		LSIL (n=21)		HSIL (n=61)		Cancer (n=65)		
		N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%	
Age range (years)	≤ 24	13	7.0	34	1.0	0.003*	27	57.45	7	14.89	13	27.66	0	0.0	<0.001*
	25 – 34	48	25.7	60	2.9		76	70.37	6	5.55	21	19.45	5	4.3	
	35 – 44	49	26.2	63	2.0		77	68.75	6	5.35	16	14.29	13	11.61	
	45 – 54	49	26.2	40	15.3		63	70.78	3	3.37	11	12.35	12	13.48	
	≥ 55	28	15.0	63	24.0		45	49.46	5	5.49	7	7.9	34	37.36	
Smoking status	No	157	84.40	181	70.99	0.002*	233	68.94	14	4.14	41	12.03	50	14.79	<0.001*
	Yes	27	14.52	68	26.66		50	52.63	11	1.57	23	24.22	11	11.58	
	Ex-smoker	2	1.87	6	2.35		2	25.0	2	25.0	3	37.5	1	12.5	
Ethnicity	Caucasian	100	53.5	113	45.01	0.046*	147	69.01	11	5.16	25	11.74	30	14.09	0.006*
	No caucasian	84	44.9	138	54.99		136	61.26	15	6.77	37	16.66	34	15.31	
Education stage ^a	Incomplete elementary school	59	32.24	93	37.2	0.224	80	52.63	9	5.92	26	17.10	37	24.35	<0.001*
	Complete elementary school	15	8.19	34	13.6		31	63.27	2	4.08	6	12.25	10	20.40	
	Incomplete high school	32	17.49	31	12.4		44	69.84	6	9.52	9	14.29	4	6.35	
	Complete high school	60	32.79	72	28.8		100	75.75	8	6.06	15	11.37	9	6.82	
	Incomplete undergraduate degree	5	2.73	7	2.8		9	75.0	0	0.0	3	25.0	0	0.0	
	Complete undergraduate degree	12	6.56	13	5.2		18	72.0	2	8.0	2	8.0	3	12.0	
Marital status	Married	137	73.26	145	56.42	0.001*	192	68.08	13	4.60	41	14.53	36	12.76	<0.001*
	Single	19	10.16	54	21.01		42	57.53	5	6.85	18	24.66	8	10.96	
	Divorced	22	11.77	40	15.57		41	66.12	4	6.45	7	11.29	10	16.12	
	Widowed	9	4.81	18	7.00		13	48.15	4	14.82	1	3.70	9	33.33	
Monthly income ^b	≤ 1 minimum wage	45	26.16	68	40.97	<0.001*	70	61.95	7	6.19	32	28.32	4	3.54	<0.001*
	1 - 3 min. wages	111	64.54	82	49.40		163	84.45	12	6.22	18	9.33	0	0.0	
	3 - 5 min. wages	12	6.99	15	9.03		22	81.49	3	11.11	2	7.40	0	0.0	
	≥ 5 min. wages	4	2.32	1	0.600		4	8.0	0	0.0	1	20.0	0	0.0	

^aBased on Brazilian educational system. ^bBased on Brazilian minimum wage (approximately U\$ 287.00). Data presented as absolute number and percentage. Analysis carried out using the two-tailed Chi-square (X²) test or Fisher test, with p<0.05 being adopted as the significance level * (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions). Bold values represent statistical significance (p<0.05).

Table 2. Reproductive and sexual behavior characteristics of participants according to HPV infection status and presence of cervical lesions

Variables		HPV				p-value	Lesion grade (Infected patients)								p-value
		Uninfected (n=187)		Infected (n=263)			No lesion (n=116)		LSIL (n=21)		HSIL (n=61)		Cancer (n=65)		
		N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%	
Oral contraceptive usage	No	122	65.95	149	57.76	0.193	188	69.37	16	5.90	39	14.39	28	10.34	0.029*
	Yes	63	34.05	109	42.24		97	56.39	11	6.39	29	16.87	35	20.35	
Age at menarche (years)	≤11	37	20.0	44	22.44	<0.001*	55	67.90	7	8.64	19	23.46	0	0.0	<0.001*
	12	48	25.95	52	26.54		77	77.0	5	5.0	17	17.0	1	1.0	
	13	48	25.95	42	21.42		65	72.22	9	10.0	15	16.67	1	1.11	
	≥14	52	28.10	58	29.60		87	79.09	6	5.46	15	13.64	2	1.81	
Age at first sexual intercourse (years)	≤17	98	53.26	159	62.60	0.094	155	60.32	19	7.39	44	17.12	39	15.17	0.058
	≥18	86	46.74	95	37.40		129	71.28	8	4.42	23	12.70	21	11.60	
Sexual partners during the lifetime	1	72	39.13	47	25.0	0.021*	100	84.03	7	5.89	11	9.24	1	0.84	<0.001*
	2	36	19.56	31	16.48		50	74.62	6	8.96	11	16.42	0	0.0	
	3	24	13.04	28	14.90		35	67.30	6	11.54	10	19.23	1	1.92	
	4	16	8.70	23	12.23		27	69.24	3	7.69	8	20.51	1	2.56	
	≥5	36	19.57	59	31.39		69	72.63	5	5.26	20	21.05	1	1.06	
Knowledge about HPV	No	36	19.57	55	28.65	<0.001*	64	70.33	7	7.69	17	18.69	3	3.29	<0.001*
	Heard about	102	54.25	86	45.75		150	79.78	12	6.38	25	13.29	1	0.53	
	Yes	46	25.0	54	28.13		69	71.14	7	7.22	21	21.64	0	0.0	
Knowledge about HPV transmission	No	81	44.02	81	42.64	0.963	112	69.14	13	8.03	33	20.37	4	2.46	<0.001*
	Yes	103	55.98	109	57.36		167	79.52	13	6.19	30	14.29	0	0.0	
Number of pregnancies	0	15	8.02	32	12.26	0.120	34	73.91	1	2.17	10	21.74	1	2.18	0.005*
	1	32	17.11	55	21.07		61	70.13	2	2.29	14	16.09	10	11.49	
	2	59	31.55	63	24.13		81	66.39	9	7.37	15	12.29	17	13.93	
	3	45	24.06	51	19.54		62	64.59	8	8.34	16	16.66	10	10.41	
	4	21	11.21	25	9.57		24	52.17	4	8.69	8	17.39	10	21.73	
	≥5	16	8.54	35	13.04		26	50.98	3	5.89	6	11.76	16	31.37	
Familial cervical cancer	No	157	85.32	185	73.41	0.004*	234	68.43	23	6.73	62	18.12	23	6.72	<0.001*
	Yes	27	14.68	67	26.59		47	50.0	2	2.12	4	4.26	41	43.62	

Data presented as absolute number and percentage. Analysis carried out using the two-tailed Chi-square (χ^2) test* or Fisher test †, with $p < 0.05$ being adopted as the significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions). Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$).

Table 3. Association of *CD28* and *ICOS* polymorphisms with HPV infection and cervical lesion status

Genotype		HPV				p-value	Lesion grade (Infected patients)								p-value
		Uninfected (n=187)		Infected (n=263)			No lesion (n=116)		LSIL (n=21)		HSIL (n=61)		Cancer (n=65)		
		N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%	
CD28 rs3116496															
Codominant	TT	136	72.72	178	67.69	0.386	84	72.42	13	61.91	34	55.74	47	72.31	0.116
	TC	44	23.53	77	29.27		28	24.13	8	38.09	23	37.70	18	27.69	
	CC	7	3.75	8	3.04		4	3.45	0	0.0	4	6.56	0	0.0	
Dominant	TT	136	72.72	85	32.32	0.251	84	72.41	13	61.90	34	55.74	47	72.31	0.106
	TC+CC	51	27.27	178	67.68		32	27.58	8	38.09	27	44.26	18	27.69	
Recessive	TT+TC	180	96.25	255	96.96	0.683	112	96.55	21	100.0	57	93.44	65	100.0	0.178
	CC	7	3.74	8	3.04		4	3.44	0	0.0	4	6.56	0	0.0	
Alleles	T	316	84.49	433	82.32	0.390	196	84.49	34	80.95	91	74.60	112	86.15	0.068
	C	58	15.51	93	17.68		36	15.51	8	19.05	31	25.40	18	13.85	
ICOS rs4404254															
Codominant	TT	96	51.34	131	49.81	0.718	58	50.0	13	61.91	26	42.62	34	52.31	0.305
	TC	70	37.44	107	40.69		47	40.52	8	38.09	25	40.98	27	41.54	
	CC	21	11.22	25	9.50		11	9.48	0	0.0	10	16.40	4	6.15	
Dominant	TT	96	51.33	131	49.81	0.750	58	50.0	13	61.90	26	42.62	34	52.30	0.448
	TC+CC	91	48.66	132	50.19		58	50.0	8	38.09	35	57.38	31	47.69	
Recessive	TT+TC	166	88.77	238	90.49	0.552	105	90.52	21	100.0	51	83.61	61	93.85	0.093
	CC	21	11.23	25	9.50		11	9.48	0	0.0	10	16.39	4	6.15	
Alleles	T	262	70.05	369	70.15	0.974	163	70.26	34	80.95	77	63.12	95	73.08	0.124
	C	112	29.95	157	29.85		69	29.74	8	19.05	45	36.88	35	26.92	

Data presented as absolute number and percentage. Analysis carried out using the two-tailed Chi-square (χ^2) test* or Fisher test †, with $p < 0.05$ being adopted as the significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions). Bold values represent statistical significance ($p < 0.050$).

Table 4. Association of *CD28* and *ICOS* polymorphisms with HPV infection and cervical lesion status evaluated by logistic regression

		HPV		Lesion grade (Infected patients)					
Genotype		Infected		LSIL		HSIL		Cancer	
		OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value	OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value	OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value	OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value
<i>CD28</i> rs3116496									
Codominant	TT	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
	TC	1.337 (0.868-2.060)	0.188	1.07E-8 (1.07E-8-1.07E-8)	-	2.029 (1.028-4.007)	0.041*	1.149 (0.575-2.294)	0.696
	CC	0.873 (0.309-2.467)	0.798	1.846 (0.694-4.914)	0.220	2.471 (0.584-10.449)	0.219	9.15E-9 (0.000-)	0.998
Dominant	TT	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
	TC+CC	1.273 (0.843-1.924)	0.251	1.615 (0.612-4.263)	0.333	2.085 (1.089-3.989)	0.027*	1.005 (0.510-1.982)	0.988
Recessive	TT+TC	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
	CC	0.807 (0.287-2.265)	0.683	8.828E-9 (8.828E-9-8.829E-9)	-	1.965 (0.474-8.146)	0.352	8.828e-9(0.000-)	0.998
<i>ICOS</i> rs4404254									
Codominant	TT	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
	TC	0.872 (0.461-1.650)	0.675	0.759 (0.290-1.985)	0.575	1.187 (0.607-2.320)	0.617	0.980 (0.519-1.849)	0.950
	CC	1.120 (0.751-1.671)	0.578	3.96E-9 (3.96E-9-3.96E-9)	-	2.028 (0.766-5.367)	0.155	0.620 (0.183-2.101)	0.443
Dominant	TT	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
	TC+CC	1.063 (0.731-1.547)	0.750	0.615 (0.237-1.596)	0.318	1.346 (0.721-2.514)	0.351	0.912 (0.497-1.674)	0.766
Recessive	TT+TC	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
	CC	0.830 (0.450-1.533)	0.552	4.44E-9 (4.44E-9-4.44E-9)	-	1.872 (0.746-4.694)	0.181	0.626 (0.191-2.051)	0.439

Data are presented as absolute numbers and percentages. Binary and multinomial logistic regression analyses were performed to assess the association between the SNVs rs3116496 (*CD28*) and rs4404254 (*ICOS*) with HPV infection and the development of cervical lesions. LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions. Bold values indicate statistical significance ($p < 0.05$)*. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table 5. Association of *CD28* and *ICOS* polymorphisms under the dominant genetic model with HPV infection and cervical lesions, evaluated by adjusted logistic regression

Genotype	HPV			Lesion grade (Infected patients)								
	Infected		Adj <i>p</i> -value	LSIL		Adj <i>p</i> -value	HSIL		Adj <i>p</i> -value	Cancer		Adj <i>p</i> -value
	OR (CI95%)			OR (CI95%)			OR (CI95%)			OR (CI95%)		
CD28 rs3116496												
Dominant	TT	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-	
	TC+CC	0.953 (0.577-1.574)	0.852	0.798 (0.249-2.562)	0.705	0.669 (0.311-1.438)	0.303	1.011 (0.078-13.101)	0.993			
ICOS rs4404254												
Dominant	TT	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-	
	TC+CC	0.778 (0.493-1.228)	0.281	2.552 (0.795-8.199)	0.116	0.803 (0.397-1.626)	0.543	4.812 (0.404-57.284)	0.214			

Data are presented as absolute numbers and percentages. Binary and multinomial logistic regression analyses were performed to assess the association between the SNVs *rs3116496* (*CD28*) and *rs4404254* (*ICOS*) with HPV infection and the development of cervical lesions. Analyses related to HPV infection were adjusted for age, smoking status, income, number of lifetime sexual partners, ethnicity, marital status, and age at first sexual intercourse (sexarche). Analyses related to cervical lesion status (LSIL, HSIL, and cancer) were adjusted for age, smoking status, marital status, use of hormonal contraceptives, family history of cervical cancer, and number of lifetime sexual partners. LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions. Bold values indicate statistical significance ($p < 0.05$). (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table 6. Comparison of the frequency of haplotypes of *CD28* SNV rs3116496 and *ICOS* SNV rs4404254 in HPV and cervical lesion groups.

Haplotypes <i>CD28</i> and <i>ICOS</i>		HPV				<i>p</i> -value	Lesion grade (Infected patients)								<i>p</i> -value
		Uninfected (n=187)		Infected (n=263)			No lesion (n=116)		LSIL (n=21)		HSIL (n=61)		Cancer (n=65)		
		N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%	
TT		191	51.77	288	56.58	0.352	131	58.22	21	50.0	58	50.0	78	57.78	0.721
TC		124	33.60	151	29.66		63	28.0	13	30.95	41	35.34	40	29.63	
CT		54	14.63	70	13.76		31	13.78	8	19.04	17	14.66	17	12.59	

Data presented as absolute number and percentage. Analysis carried out using the two-tailed Chi-square (X^2) test*, with $p < 0.05$ being adopted as the significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions). Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$). SNVs alleles in haplotype structures follow the order rs3116496 T>C and rs4404254 T>C.

Table 7. Association of haplotype models of *CD28* SNV rs3116496 and *ICOS* SNV rs4404254 with HPV infection.

Haplotypes CD28 and ICOS	HPV				p-value
	Uninfected (n=187)		Infected (n=263)		
	N	%	N	%	
TT/TT	58	31.01	84	31.94	0.229
TT/OTHERS	75	40.11	121	46.00	
OTHERS/OTHERS	54	28.88	58	22.06	
TC/TC	24	12.83	18	6.84	0.098*
TC/OTHERS	76	40.64	115	43.72	
OTHERS/OTHERS	87	46.53	130	49.42	
CT/CT	5	2.67	4	1.52	0.613*
CT/OTHERS	42	22.46	65	24.71	
OTHERS/OTHERS	140	74.87	194	73.76	

Data presented as absolute number and percentage. Analysis carried out using the two-tailed Chi-square (X^2) test, with $p < 0.05$ being adopted as the significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$). SNVs alleles in haplotype structures follow the order rs3116496 T>C and rs4404254 T>C.

Table 8. Association of haplotype models of *CD28* SNV rs3116496 and *ICOS* SNV rs4404254 with cervical lesion status.

Haplotype models	No Lesion (n=116)		LSIL (n=21)		HSIL (n=61)		Cervical cancer (65)		<i>p</i> -value
	N	%	N	%	N	%	N	%	
TT/TT	39	33.62	5	23.80	8	14.81	24	36.92	0.498
TT/OTHERS	53	45.68	11	52.40	27	50.0	30	46.15	
OTHERS/OTHERS	25	21.55	5	23.80	19	35.18	11	16.92	
TC/TC	7	6.03	1	4.76	7	11.47	3	4.61	0.745
TC/OTHERS	49	42.24	11	52.40	27	44.26	28	43.07	
OTHERS/OTHERS	60	51.72	9	42.85	27	44.26	34	52.30	
CT/CT	3	2.58	0	0.0	1	1.63	0	0.0	0.584
CT/OTHERS	25	21.55	8	38.09	15	24.60	17	26.15	
OTHERS/OTHERS	88	75.85	13	61.90	45	73.77	48	73.84	

Analysis by two-sided Chi-square (χ^2) test* ($p < 0.05$ as significance level). Data presented as absolute number and percentage. HPV (Human Papillomavirus). SNVs alleles in haplotype structures follow the order rs3116496 (T>C) and rs4404254 (T>C). Some participants didn't complete genotyping for all genetic variants analyzed, so their haplotypes were incomplete and they weren't counted.

Table 9. Association of *CD28* and *ICOS* polymorphism haplotypes with HPV infection and cervical lesion status, analyzed through adjusted logistic regression.

Haplotype models	HPV		Lesion grade (Infected patients)					
			LSIL		HSIL		Cancer	
	Infected OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value	OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value	OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value	OR (CI95%)	Adj <i>p</i> -value
TT CARRIES	0.787 (0.470-1.320)	0.364	1.118 (0.443-2.820)	0.813	1.022 (0.550-1.901)	0.944	1.606 (0.717-3.598)	0.249
OTHER/OTHER	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
TC CARRIES	1.151 (0.726-1.823)	0.550	1.430 (0.628-3.257)	-	1.166 (0.673-2.021)	0.585	0.699 (0.373-1.308)	0.262
OTHER/OTHER	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-
CT CARRIES	0.967 (0.569-1.644)	0.903	1.781 (0.773-4.107)	0.176	0.707 (0.364-1.374)	0.306	1.027 (0.495-2.310)	0.944
OTHER/OTHER	Reference	-	Reference	-	Reference	-	Reference	-

Data are presented as absolute numbers and percentages. Binary and multinomial logistic regression analyses were performed to assess the association between the **haplotypes** of the SNVs rs3116496 (*CD28*) and rs4404254 (*ICOS*) with HPV infection and the development of cervical lesions. Analyses related to HPV infection were adjusted for age, smoking status, income, number of lifetime sexual partners, ethnicity, marital status, and age at first sexual intercourse (sexarche). Analyses related to cervical lesion status (LSIL, HSIL, and cancer) were adjusted for age, smoking status, use of hormonal contraceptives and family history of cervical cancer. LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions. Bold values indicate statistical significance ($p < 0.05$). (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

REFERENCES OF THE ARTICLE

- AHMED, S. *et al.* Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. **Rheumatology**, v. 40, n. 6, p. 662–667, jun. 2001.
- ARBYN, Marc *et al.* Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e191–e203, fev. 2020.
- BAEK, Jihae *et al.* The association of CD28 polymorphism, rs3116496, with Cancer: A meta-analysis. **Computers in Biology and Medicine**, v. 61, p. 172–177, 1 jun. 2015.
- CHEN, Lieping. Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 5, p. 336–347, maio 2004.
- CHEN, Xiaojun *et al.* Genetic susceptibility of cervical cancer. **Journal of Biomedical Research**, v. 25, n. 3, p. 155–164, maio 2011.
- DOORBAR, J; GRIFFIN, H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. **Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)**, v. 7, p. 176–179, jun. 2019.
- FERLAY, Jacques *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.
- GHEIT, Tarik. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 355, 8 maio 2019.
- Guzman, Valeska B., et al. “New Approach Reveals CD28 and IFNG Gene Interaction in the Susceptibility to Cervical Cancer.” **Human Molecular Genetics**, vol. 17, no. 12, Jun. 2008, pp. 1838–44.
- HUTLOFF, Andreas *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 263–266, jan. 1999.
- IVANSSON, Emma L.; JUKO-PECIREP, Ivana; GYLLENSTEN, Ulf B. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 3, p. 544–548, mar. 2010.
- MAYR, Christine. What Are 3' UTRs Doing? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 10, p. a034728, out. 2019.
- PANGARKAR, Meena. The Bethesda System for reporting cervical cytology. **Cytojournal**, v. 19, p. 28, apr. 2022.

RUJAS, Edurne *et al.* Structural characterization of the ICOS/ICOS-L immune complex reveals high molecular mimicry by therapeutic antibodies. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5066, 8 out. 2020.

WU, Dongjuan *et al.* Five functional polymorphisms of B7/CD28 co-signaling molecules alter susceptibility to colorectal cancer. **Cellular Immunology**, v. 293, n. 1, p. 41–48, jan. 2015.

YANG, Jing *et al.* Investigation of *ICOS*, *CD28* and *CD80* polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma: a case–control study in eastern Chinese population. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 7, p. BSR20181824, 31 jul. 2019

YAN, Yuxiang; ZHANG, Xianbo. The association between *CD28* gene rs3116496 polymorphism and breast cancer risk in Chinese women. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 6, p. BSR20170884, 22 dez. 2017.

5. CONCLUSÃO

- Os resultados deste estudo demonstraram que os fatores sociodemográficos, comportamentais e sexuais estão significativamente associados à infecção pelo HPV e ao desenvolvimento de lesões cervicais, em concordância com os dados previamente descritos na literatura.
- Em relação às variantes genéticas analisadas, observou-se que as mulheres portadoras do alelo C do SNV rs3116496 (T>C) de *CD28* apresentaram maior suscetibilidade ao desenvolvimento de HSIL, sugerindo um possível papel deste SNV na modulação da resposta imune frente à infecção por HPV.
- Por outro lado, a análise do SNV rs4404254 (T>C) de *ICOS* não apresentou nenhuma associação significativa, assim como a análise dos haplótipos de *CD28* e *ICOS*, que também não mostraram associação significativa com a infecção pelo HPV, desenvolvimento de lesões cervicais e o câncer cervical.
- Os resultados obtidos reforçam a importância de investigações sobre SNVs em genes coestimulatórios, como potenciais moduladores da resposta imune antiviral e da carcinogênese. No entanto, é importante ressaltar que nosso estudo apresenta limitações inerentes ao tamanho amostral e à análise restrita a duas variantes genéticas de *CD28* e *ICOS*. Evidenciando a necessidade de estudos adicionais, com amostras maiores e em diferentes populações, para elucidar de forma mais abrangente o papel dos SNVs dos genes *CD28* e *ICOS* na suscetibilidade à infecção pelo HPV e no risco de desenvolvimento do câncer cervical.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer cervical é a terceira causa de morte em mulheres no Brasil e a infecção persistente por subtipos oncogênicos do Papilomavírus Humano é o principal fator etiológico para a carcinogênese, constituindo um problema de saúde pública. Os achados reforçam o papel dos SNVs na suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais que podem progredir para o câncer cervical dependendo de cofatores intrínsecos ao indivíduo. Assim, o estudo contribui para a compreensão da influência de variantes genéticas em genes que codificam moléculas coestimulatórias da resposta imune no processo de carcinogênese cervical, destacando a importância de estudos genéticos no delineamento de biomarcadores moleculares no câncer. Além disso, há necessidade de investigações futuras em amostras populacionais ampliadas, a fim de ampliar os conhecimentos imunogenéticos envolvidos na infecção por HPV e desenvolvimento de lesões cervicais e o câncer cervical.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Impacto de Polimorfismos Genéticos em *PDCDL1*, *ICOS*, *CD28*, *IL17/IL17RA*, *IL18*, Expressão de miRNAs e Expressão Tecidual de PD-L1 na Suscetibilidade, Progressão e Prognóstico do Câncer do Colo do Útero”

Prezada Senhora:

Gostaríamos de convidá-la para participar da pesquisa “Impacto de Polimorfismos Genéticos em *PDCDL1*, *ICOS*, *CD28*, *IL17/IL17RA*, *IL18*, Expressão de miRNAs e Expressão Tecidual de PD-L1 na Suscetibilidade, Progressão e Prognóstico do Câncer do Colo do Útero”, a ser realizada “no Laboratório de genética molecular e imunologia da UEL”. O objetivo da pesquisa é “detectar a presença do vírus HPV, que pode causar câncer de colo de útero, em amostra ginecológica, e também avaliar possíveis variações genéticas no sistema imune das mulheres que podem favorecer a infecção e o desenvolvimento de lesões de colo de útero”. Sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: 1) você responderá a um questionário sobre dados como idade, escolaridade, renda familiar, hábito tabagista, idade da primeira menstruação e da primeira relação sexual, número de gestações e partos, entre outros; 2) você doará o material ginecológico que seria descartado após a confecção da lâmina do exame de Papanicolaou (caso você esteja em consulta na UBS) ou material ginecológico restante das análises patológicas (caso você esteja em consulta no Hospital do Câncer de Londrina); 3) doará 5mL de sangue periférico, que serão coletados por equipe capacitada; 4) permitirá a consulta de dados de seu prontuário médico para análise de resultados de exames prévios.

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

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

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

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

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar Karen Brajão de Oliveira karen.brajao@uel.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

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

Londrina, ____ de _____ de 20__.

Pesquisador Responsável

RG: _____

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

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

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

APÊNDICE B - Questionário Socioepidemiológico

Nº LAB

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

Data: ____/____/____

Reg. Nº _____

1. Telefone: _____

Email: _____

2. Conhece o HPV???

☐) Nunca ouvi falar☐) Já ouvi falar mas não sei o que é☐) Conheço

3. Conhece as formas de transmissão ou formas de contrair o vírus?

☐) Não ☐) Sim Qual ou quais:

4. Idade _____ anos DN, _____

5. Etnia: _____

Branca / parda / negra / asiática / indígena

6. 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

7. Você fuma?

☐) Não☐) Sim Tempo: _____☐) Ex-fumante tempo que fumou _____
Quando parou _____

8. Qual o seu grau de escolaridade?

☐) Fundamental Incompleto☐) Fundamental Completo☐) Médio Incompleto ☐) Médio completo☐) Superior incompleto ☐) Sup. completo

9. Estado Civil:

☐) Solteira☐) Casada / união estável☐) Divorciada/separada ☐) Viúva

10. Qual sua profissão? _____

11. Faz o uso de anticoncepcional? ☐) N ☐) S

Qual _____

12. Faz uso de preservativo ? ☐) N ☐) S

13. Nº Gestações: _____

14. Números de Partos Normais: _____

15. Numero de cesárea: _____

16. Abortos: _____

17. Idade da 1ª relação sexual: _____ anos

18. Idade da 1ª menstruação: _____ anos

19. Número de parceiros sexuais:

durante a vida: _____

nos últimos 6 meses: _____ .

20. Já realizou outros exames preventivos?

☐) Sim ☐) Não

21. Com qual frequência realiza os preventivos?

Último exame: _____

22. Existem casos de câncer de colo de útero em sua família?

☐) Sim ☐) Não

Em caso de resposta "SIM" descrever o grau de parentesco: _____

23. PESO _____

24. Altura _____

25. IMC: _____

26. Circunferência abdominal: _____

27. Faz algum tipo de tratamento para outra doença?
Qual? _____

28. Está na menopausa? _____

29. Faz reposição hormonal? _____

Medicação: _____

28. Faz uso de bebida alcoólica? _____

Com qual frequência? _____

Pesquisador: _____

ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



Conselho de Ética em
Pesquisa - Universidade
Estadual de Londrina

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Variantes polimórficas nos genes IL10, CTLA4 e PDCD1 e expressão de miRNAs: associação com risco, progressão e prognóstico no câncer de colo de útero

Pesquisador: Karen Brajo de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38937520.2.0000.5231

Instituição Proponente: OCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.368-250

Apresentação do Projeto:

Destaca a pesquisadora que: "O papilomavírus humano (HPV) é o agente etiológico da infecção viral mais frequente do trato anogenital e possui papel central no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e do câncer cervical. No Brasil, o número de casos novos de câncer cervical estimados para cada ano do triênio 2020-2022 é de 18.590. Embora ao longo da vida sexual a maioria das mulheres seja infectada por algum dos tipos do HPV, apenas uma pequena porcentagem desenvolve a doença invasiva. A regressão ou progressão das lesões depende em grande parte da ação do sistema imunológico, cujas células e moléculas neste microambiente desempenham um papel de fundamental importância na tumorigênese. Considerando-se que variantes de sequência de DNA podem acontecer em todo o genoma, e que dependendo da localização, elas podem modificar a expressão gênica e a produção, estrutura e função das proteínas, assim como os miRNAs desempenham importante papel na regulação da resposta imunológica. Portanto, este estudo transversal será realizado com mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero de unidades básicas de saúde (UBS), localizadas na região Norte do Paraná e no Hospital do Câncer de Londrina. A adesão das pacientes neste projeto de pesquisa ocorrerá de forma voluntária, após receberem as informações e explicações sobre o estudo e seus objetivos" e será investigado "[...] o papel da regulação da resposta inflamatória e como variantes genéticas de moléculas reguladoras da resposta imune

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3373-9405

CEP: 86.057-970

E-mail: cep2008@uel.br