

**RENATE VON LINSINGEN**

**POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS E DO GENE *MICA*  
EM PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho.  
Co-orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho.

**CURITIBA**

**2008**

**Universidade Federal do Paraná**

***Sistema de Bibliotecas***

**LINSINGEN, RENATE VON LINSINGEN**

Polimorfismos de genes de citocinas e do gene *mica* em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical.

124f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho

**Dissertação (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica). Programa de Pós-Graduação em Genética.**

1. Neoplasia Intra-epitelial Cervical 2. Citocinas 3. MICA I. Título II. Bicalho, Maria da Graça. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica). Programa de Pós-Graduação Genética.



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado a que se submeteu **RENATE VON LINSINGEN**, para fins de obter o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de junho de 2008

Banca Examinadora:

*efoBicalho*  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho  
Orientadora e Presidente

*Ricardo Alberto Moliterno*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno – Depto. Análises Clínicas, UEM  
Membro

*Luis Martins Colaco*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luis Martins Colaco – Depto. de Patologia Clínica, UFPR  
Membro

*Eledir Chautard Freire-Maia*  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eledir Chautard Freire-Maia – Depto. Genética, UFPR  
Membro

*Valéria Sperandio Roxo*  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Sperandio Roxo – Depto. Genética, UFPR  
Membro

*Nelson Valente Martin*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Nelson Valente Martin – Escola Paulista Medicina  
Membro *ad hoc*

Visto: *Maria Luiza Petzl-Erler*  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Petzl-Erler  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

## DEDICATÓRIA

*Durante os anos de execução deste trabalho, dois fatos em especial, de forma absolutamente opostas, marcaram a minha existência. Experimentei a dor da perda de um ente querido e recebi a dádiva de gerar uma nova vida.*

*Ao meu pai Roland e ao meu filho Bruno,*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade.

À CAPES e ao Convênio Funpar-LIGH.

Às pacientes.

Agradecimentos especiais:

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho, minha orientadora, pelo auxílio, dedicação, entusiasmo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Newton Sérgio de Cavalho, meu co-orientador, pelo estímulo à realização deste trabalho e orientação.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eni Picchioni-Bompeixe, pela colaboração na execução do trabalho e inquestionável amizade.

Ao Dr. Carlos Afonso Maestri pela gentileza em ceder suas pacientes.

Ao Prof. Dr. Rui Fernando Pilloto, pela orientação no Ambulatório de Genética Médica.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 CONTEXTO .....	01
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	03
2.1 CARCINOMA DE COLO UTERINO E SUAS LESÕES PRECURSORAS .....	03
2.1.1 Epidemiologia .....	03
2.1.2 Histopatologia e Classificação Citológica .....	04
2.1.3 Fatores de Risco .....	06
2.1.3.1 Cofatores ambientais ou exógenos .....	07
2.1.3.2 Cofatores do hospedeiro .....	09
2.1.3.2.1 Resposta imune do hospedeiro contra o HPV .....	09
2.1.3.2.2 Os mecanismos do HPV de Evasão do Sistema Imune .....	11
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO .....	12
2.2.1 Estrutura e Classificação do HPV .....	12
2.2.2 Infecção por Papilomavírus Humano .....	14
2.2.3 Patogênese e Efeito Oncogênico .....	16
2.2.3.1 Efeitos das oncoproteínas E6 e E7 .....	17
2.3 CITOCINAS .....	21
2.3.1 Definição e Classificação das Citocinas .....	21
2.3.2 A Citocina IL-6 e o Gene <i>IL6</i> .....	23
2.3.2.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene <i>IL6</i> .....	24
2.3.2.2 Polimorfismos e níveis de expressão do gene <i>IL6</i> .....	25
2.3.3 O Fator Transformante de Crescimento $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e o Gene <i>TGFB1</i> .....	25

2.3.3.1	Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene <i>TGFB1</i> .....	25
2.3.3.2	Biossíntese e função biológica do TGF- $\beta$ 1 .....	27
2.3.3.3	Polimorfismos e níveis de expressão do gene <i>TGFB1</i> .....	28
2.3.4	A Interleucina10 (IL-10) e o Gene <i>IL10</i> .....	29
2.3.4.1	Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene <i>IL10</i> .....	30
2.3.4.2	Biossíntese e função biológica da IL-10 .....	31
2.3.5	O Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o Gene <i>TNF</i> .....	33
2.3.5.1	Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene <i>TNF</i> .....	34
2.3.5.2	Biossíntese e função biológica do TNF .....	36
2.3.6	O Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) e o Gene <i>IFNG</i> .....	39
2.3.6.1	Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene <i>IFNG</i> .....	39
2.3.6.2	Biossíntese e função biológica do IFN- $\gamma$ .....	40
2.3.7	Citocinas e HPV .....	41
2.3.7.1	Polimorfismo dos genes de Citocinas e HPV .....	43
2.4	O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) E O GENE <i>MICA</i> .....	45
2.4.1	Estrutura Gênica, Proteína, Receptor e Expressão do Gene <i>MICA</i> .....	47
2.4.2	Biossíntese e Função Biológica de <i>MICA</i> .....	51
2.4.3	O Polimorfismo de <i>MICA</i> e a NIC .....	52
2.5	JUSTIFICATIVA.....	53
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	55
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	56
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	56
4.3	GENOTIPAGEM DE CITOCINAS .....	57
4.3.1	O <i>Cytokine Genotyping Tray</i> .....	57
4.3.2	PCR-SSP .....	58
4.3.2.1	Metodologia .....	58
4.3.2.2	Amplificação dos alelos por PCR-SSP .....	58
4.4	Tipagem Do Gene <i>MICA</i> .....	59
4.4.1	Técnica PCR-SSOP .....	59
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
4.5.1	Freqüências Alélicas e Genotípicas .....	62

4.5.2 Comparação entre as Amostras Paciente e Controle .....	63
<b>5 RESULTADOS</b> .....	65
5.1 GENE <i>IL6</i> .....	65
5.1.2 Freqüências Alélicas do Gene <i>IL6</i> .....	65
5.1.2 Freqüências Genotípicas do Gene <i>IL6</i> .....	65
5.2 GENE <i>TGFB1</i> .....	66
5.2.1 Freqüências Alélicas do Gene <i>TGFB1</i> .....	66
5.2.2 Freqüências Genotípicas do Gene <i>TGFB1</i> .....	67
5.3 GENE <i>TNF</i> .....	68
5.3.1 Freqüências Alélicas do Gene <i>TNF</i> .....	68
5.3.2 Freqüências genotípicas do Gene <i>TNF</i> .....	69
5.4 GENE <i>IFNG</i> .....	69
5.4.1 Freqüências Alélicas do Gene <i>IFNG</i> .....	69
5.4.2 Freqüências Genotípicas do Gene <i>IFNG</i> .....	70
5.5 GENE <i>IL10</i> .....	71
5.5.1 Freqüências Alélicas do Gene <i>IL10</i> .....	71
5.5.2 Freqüências Genotípicas do Gene <i>IL10</i> .....	72
5.6 EQUÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	72
5.7 GENE <i>MICA</i> .....	73
5.7.1 Freqüências Alélicas do gene <i>MICA</i> .....	74
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	77
6.1 POLIMORFISMO DOS GENES DE CITOCINAS E NIC .....	77
6.2 POLIMORFISMO DO GENE <i>MICA</i> E NIC .....	85
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	91
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92
<b>ANEXOS</b> .....	120



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - MAPA FÍSICO O GENOMA DO HPV 16.....	13
FIGURA 02 - HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV.....	16
FIGURA 03 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>IL6</i> NO CROMOSSOMO 7.....	24
FIGURA 04 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>TGFB1</i> NO CROMOSSOMO 19.....	26
FIGURA 05 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>IL10</i> NO CROMOSSOMO 1.....	30
FIGURA 06 - ESTRUTURA DO GENE <i>IL10</i> .....	30
FIGURA 07 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>TNF</i> NO CROMOSSOMO 6.....	34
FIGURA 08 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA REGIÃO DO MHC NO CROMOSSOMO ONDE SITUAM-SE OS LOCOS <i>TNF-LTA</i> .....	34
FIGURA 09 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>IFNG</i> NO CROMOSSOMO 12.....	39
FIGURA 10 - MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) HUMANO.....	46
FIGURA 11 - GENES E PSEUDOGENES DA FAMÍLIA <i>MIC</i> AO LONGO DA REGIÃO DE CLASSE I DO MHC HUMANO.....	48
FIGURA 12 - LOCALIZAÇÃO DE <i>MICA</i> E <i>MICB</i> EM COSMÍDEOS CLONADOS.....	49
FIGURA 13 - ESTRUTURA DO COMPLEXO NKG2 E <i>MICA</i> .....	51
FIGURA 14 - GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APLICADOS EM CINCO FILEIRAS.....	61
FIGURA 15 - GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APLICADOS EM CINCO FILEIRAS, APRESENTANDO PROBLEMAS DE AMPLIFICAÇÃO.....	61
FIGURA 16 - GRÁFICO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DE <i>MICA</i> EM PACIENTES COM NIC E CONTROLES.....	75
FIGURA 17 - DETALHAMENTO DAS FREQUÊNCIAS DAS AMBIGÜIDADES (X*) NA TIPAGEM DOS AGRUPAMENTOS ALÉLICOS <i>MICA</i> EM PACIENTES COM NIC E CONTROLES.....	75
FIGURA 18 - GRÁFICO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>MICA</i> COM $P \leq 0,05$ EM PACIENTES COM NIC E CONTROLES.....	76

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - FUNÇÕES DA ONCOPROTEÍNA E7 .....	18
QUADRO 02 - FUNÇÕES DA ONCOPROTEÍNA E6 .....	20
QUADRO 03 - SNPs E AMINOÁCIDOS NAS POSIÇÕES +869 E +915 DO GENE <i>TGFB1</i> .....	29
QUADRO 04 - GENÓTIPOS, HAPLÓTIPOS E FENÓTIPOS PARA PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ 1 NAS POSIÇÕES +869 E +915 .....	29
QUADRO 05 - PROGRAMA PCR ONE LAMBDA (OLI-1) .....	59
QUADRO 06 - VALORES PARA CÁLCULO DE <i>ODDS RATIO</i> .....	63
QUADRO 07 - VALORES DE $p$ RESULTANTES DO CÁLCULO DE $\chi^2$ PARA AS AMOSTRAS PACIENTE E CONTROLE NOS GENES DE CITOCINAS ESTUDADOS .....	73
QUADRO 08 - RELAÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DOS ALELOS <i>MICA</i> CONSIDERANDO-SE AS AMBIGÜIDADES DE TIPAGEM .....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - CITOCINAS RELACIONADAS COM NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAIS E INFECÇÃO PELO HPV .....	44
TABELA 02 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>IL-6</i> (-174G/C) EM MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	65
TABELA 03 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>IL6</i> (-174G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	66
TABELA 04 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>TGFB1</i> (+869T/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	66
TABELA 05 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>TGFB1</i> (+915G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	67
TABELA 06 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>TGFB1</i> (+869T/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	67
TABELA 07 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>TGFB1</i> (+915G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	68
TABELA 08 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>TNF</i> (-308G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	68
TABELA 09 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>TNF</i> (-308G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	69
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>IFNG</i> (+874T/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	70
TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>IFNG</i> (+874T/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	70
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>IFNG</i> (+874A/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	71
TABELA 13 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	71
TABELA 14 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>IL10</i> (-1082 G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHO	- Anticoncepcional Hormonal Oral
APC	- <i>Antigen Presenting Cell</i>
ASCUS	- <i>Atypic Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
BEC	- Boletim Epidemiológico de Curitiba
BD	- Doença de Beçhet
CC	- Carcinoma Cervical
CMV	- Citomegalovírus
CPH	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
EBV	- Vírus Epstein-Barr
HSIL	- <i>High Squamous Intra-epithelial Lesion</i>
HPV	- <i>Human Papillomavirus</i>
HR- HPV	- HPV de alto risco
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSP	- <i>Heat Shock Protein</i>
IARC	- <i>International Agency of Research in Cancer</i>
ICESC	- <i>International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer</i>
IL-10	- Interleucina 10
IL-6	- Interleucina 6
IFN- $\gamma$	- Interferon Gama
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSV-2	- Vírus herpes simples tipo II
LC	- <i>Langerhans Cell</i>
LPL	- Lipoproteína lipase
LR- HPV	- HPV de baixo risco
LSIL	- <i>Low Squamous Intra-epithelial Lesion</i>
LT	- Linfotóxina
LT CD4+	- Linfócito T CD4+
LT CD8+	- Linfócito T CD8+

MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIC	- MHC Class I Chain-related gene
MICA	- MHC class I Chain-related gene A
MS	- Ministério da Saúde
NIC	- Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	- <i>Natural Killer Cell</i>
NKG2D	- <i>Natural Killer group 2D receptor</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAPE	- <i>Streptoavidina-Phycoeritrina</i>
SIL	- <i>Squamous Intra-epithelial Lesion</i>
SSOP	- <i>Sequence-Specific Oligonucleotide Probing</i>
SSP	- <i>Sequence-Specific Primer</i>
TCR	- <i>T cell Receptor</i>
TNF	- <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TGF- $\beta$ 1	- <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
T $\gamma\delta$	- Linfócitos T gama -delta
Th1	- T helper do tipo I
Th2	- T helper do tipo II
WHO	- <i>World Health Organization</i>

## RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é uma infecção comum em mulheres em todo o mundo. Contudo, apenas uma pequena porcentagem de mulheres, com infecção persistente por genótipos oncogênicos de HPV, irão desenvolver lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e cervical câncer (CC). Os componentes genéticos e imunológicos individuais parecem ser determinantes importantes na relação entre a infecção persistente pelo HPV e a carcinogênese. Várias citocinas estão relacionadas com o desenvolvimento do câncer. A variação inter-individual na expressão de citocinas é geneticamente determinada e os polimorfismos em regiões regulatórias são importantes na produção de baixos, intermediários e altos níveis de citocinas. Neste estudo foi investigada a influência dos polimorfismos dos genes *IL6* (-174); *TGFB1* (+869 e +915); *IL10* (-1082); *TNF* (-308) e *IFNG* (+874) em pacientes com NIC. O gene *MICA* é altamente polimórfico. Estes polimorfismos podem levar a diferentes graus de afinidade da ligação ao receptor NKG2D (Natural Killer grupo 2D). Embora os efeitos destes polimorfismos na ativação imune não sejam conhecidos totalmente, eles poderiam levar a diferentes graus de ativação de células imunológicas e prejudicar a eliminação tumoral. Foi nosso objetivo calcular as freqüências alélicas dos polimorfismos genéticos de *MICA* nas amostras de pacientes com NIC e controles. Cem mulheres com NIC e cinquenta controles saudáveis foram analisadas neste estudo. A genotipagem de citocinas foi realizada através do método de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*) utilizando-se o kit "Cytokine Genotyping Tray" (*One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA*). Este kit de genotipagem identifica aqueles genótipos responsáveis por modificar os níveis de secreção de citocinas, cujas alterações têm sido relacionadas com o desenvolvimento de SIL. Para a caracterização dos alelos de *MICA* foi utilizada a técnica de PCR-SSOP, realizada através do Kit LABType *MICA* (*One Lambda Inc*). As freqüências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. As comparações entre os grupos foram realizadas através de tabelas de contingência 2x2 ( $\chi^2$ /Teste Exato de Fisher) e *Odds Ratio* foram calculados utilizando-se o VassarStat, *web site* para cálculos estatísticos. Não foram observadas diferenças nas freqüências genotípicas entre pacientes e controles de *IL6* (-174); *TGFB1* (+869 e +915) e *TNF* (-308). Com relação ao gene *IL10* (-1082 G/A), o genótipo G/G foi observado em maior freqüência no grupo controle, 18% versus 7,0% em pacientes com NIC ( $p=0,05$ ; OR=2,92 (IC=1,02-8,37)). Uma maior freqüência de genótipo *IFNG* (AA) foi observada em pacientes com NIC II versus o grupo controle ( $p=0,05$ ; OR=2,43 (IC=1,06-5,54)). Quando foram comparados os grupos de NIC entre si, foi observada uma freqüência maior do genótipo em NIC II versus NIC III ( $p=0,05$ ; OR=2,45 (IC=1,06-5,68)). Com relação ao gene *MICA*, o agrupamento alélico observado em maior freqüência no grupo paciente com NIC foi o *MICA* (\*002/\*020) (23,07%) ( $p=0,02$ ; OR=2,57 (IC=1,11-5,97)) e no grupo controle foi o alelo *MICA* \*008 (30%) ( $p=0,04$ ; OR=2,21 (IC=1,01-4,81)).

.

Palavras-Chave: Neoplasia Intra-epitelial Cervical, Citocinas, MICA.

## ABSTRACT

Human Papillomaviruses (HPV) is a common infection in women worldwide. However, only a small percentage of women, who are persistently infected with oncogenic genotypes, will develop high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) and cervical cancer. The genetic background and the host immune response are believed to be important determinants in the relation between HPV persistent infection and carcinogenesis. Several of these cytokines have been implicated in the development of cancer. The inter-individual variation among subjects in cytokine expression is genetically determined and the regulatory regions polymorphisms, are important in determining low, medium or high cytokine production. In this study, we investigated the influence of *IL6* (-174); *TGFB1* (+869 and +915); *IL10* (-1082); *TNF* (-308) and *IFNG* (+874) gene polymorphisms in patients with CIN. *MICA* is a highly polymorphic gene. These polymorphisms can result in differences in NKG2D receptor binding levels. Although *MICA* polymorphisms effects in immune regulation are not fully understood, they could interfere in immune cell activation and immune surveillance mechanism. It was our objective to determine the allelic frequencies of *MICA* gene polymorphism in CIN patients and controls. One hundred CIN women and 50 healthy controls were enrolled in this study. Cytokine genotyping was performed by the PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer) method, using the "Cytokine Genotyping Tray" (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA). This cytokine genotyping tray identifies those genotypes whose expression levels have been related with intraepithelial lesions development. For *MICA* alleles characterization was used the Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes (PCR-SSOP), through Kit LABType *MICA* (One Lambda Inc). The allelic and genotypic frequencies were obtained by direct counting. Comparisons between groups were performed using 2x2 contingency ( $\chi^2$ /a two-tailed Fisher Exact Probability Test) and Odds Ratio were calculated using the VassarStats web site for statistical computation. There was no difference in the genotypic frequencies between patients and controls for *IL6* (-174), *TGFB1* (+869 and +915) and *TNF* (-308). Concerning *IL10* (-1082 G/A), the G/G genotype was significantly more common in the control group, 18% versus 7.0% in CIN patients, ( $p=0.05$ ; OR= 2.92 (CI=1,02-8,37)). A higher frequency of the *IFNG* (AA) genotype was observed in CIN II versus control group ( $p=0.05$ ; OR=2.43 (CI=1.06-5.54)). When comparisons were performed between CIN groups, a higher frequency of AA genotype in CIN II versus CIN III was observed ( $p=0.05$ ; OR=2.45 (CI=1.06-5.68)). Concerning *MICA* gene, the allelic group found in a higher frequency in CIN patient sample was *MICA* (\*002/\*020) (23.07%) ( $p=0.02$ ; OR=2.57 (CI=1.11-5.97)) and in control sample was the allele *MICA* \*008 (30%) ( $p=0.04$ ; OR=2.21 (CI=1.01-4.81)).

Key-Words: HPV, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Cytokines, MICA.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTO

A infecção por papilomavírus humano (HPV) é o fator de risco mais importante na etiopatogênese do carcinoma cervical (CC) e de suas lesões precursoras, as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). O CC está caracterizado por uma fase pré-maligna bem definida passível de diagnóstico através dos exames citológico, colposcópico ou histopatológico do material cervical. Estas modificações epiteliais representam um espectro de anormalidades histológicas variando de NIC I a III.

Os HPVs apresentam diversidade genética, aproximadamente 40 tipos infectam a área genital, alguns com potencial oncogênico. Os HPVs tipos 16 e 18 foram categorizados em 1995 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) como carcinogênicos em humanos (WHO.IARC, 1995).

A infecção persistente por tipos virais oncogênicos, em associação com outros cofatores, do hospedeiro e/ou exógenos, predispõe ao desenvolvimento de lesões de alto grau do colo uterino apenas em uma pequena proporção de mulheres portadoras do HPV.

A maioria das mulheres (70 a 90%) infectadas por tipos de HPV causadores de CC não desenvolve a doença. Geralmente a infecção desaparece sem nenhum tratamento e o vírus é eliminado devido à ação do sistema imune, em um período de 12 a 24 meses após o início da infecção.

Há evidências de que o sistema imune do hospedeiro desempenhe um importante papel no controle da infecção pelo HPV. Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção viral leva à produção e liberação de várias citocinas que têm ação sobre a expressão gênica e crescimento de linhagens celulares infectadas por HPV. O nível de produção de citocinas é dependente do genótipo e as variantes polimórficas destes genes podem levar a alterações na expressão gênica modificando o nível do produto final e, conseqüentemente, a resposta imune ao vírus, podendo ser consideradas um dos mecanismos associados à progressão da doença.



As moléculas A relacionadas à cadeia MHC de classe I, (MICA), são antígenos induzidos pelo *stress*, reconhecidas inicialmente por células T $\gamma\delta$ , sem necessidade de reconhecimento e apresentação de antígenos (ROCK *et al.*, 1994; SCHILD *et al.* 1994; MORITA *et al.*, 1995).

A expressão de MICA em tecidos normais está restrita principalmente ao tecido epitelial intestinal (GROH *et al.*, 1996). Contudo foi observado que linhagens celulares de diversos tumores epiteliais expressam MICA (GROH *et al.*, 1996, GROH *et al.*, 1998). Evidências preliminares sugerem que MICA pode estar associada aos estágios iniciais de desenvolvimento tumoral (GROH *et al.*, 2005).

No presente estudo foi investigada a influência das variantes polimórficas -174 (G/C) do gene *IL6*; +869 (T/G) e +915 (G/C) do gene *TGFB1*; -1082 (A/G) do gene *IL10*; -308 (A/G) do gene *TNF* e +874 (T/A) do gene *IFNG*, responsáveis pela produção das citocinas: Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-10 (IL-10), Fator Transformante do Crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), respectivamente; e do gene A relacionado à cadeia MHC de classe I (*MICA*) no desenvolvimento e progressão da NIC.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CARCINOMA DE COLO UTERINO E SUAS LESÕES PRECURSORAS

#### 2.1.1 Epidemiologia

O CC é a segunda neoplasia mais comum entre as mulheres no mundo. É estimado que tenham ocorrido 493.000 novos casos e 274.000 mortes no ano de 2002 (PARKIN *et al.*, 2005). Quase 80% dos novos casos ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres. Para os países em desenvolvimento estima-se que o CC seja responsável por 15% dos tumores em mulheres e para os países desenvolvidos esta taxa cai para 3,6%. As taxas de incidência e mortalidade por 100.000 são respectivamente, África Oriental (42,7 e 34,6), América do Sul (28,6 e 12,9) e América do Norte (7,7 e 2,3) (PARKIN *et al.*, 2005).

A infecção cervical pelo HPV é a doença viral sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo, sendo reconhecida pela OMS como o principal fator causal das lesões precursoras do CC. A maioria das mulheres é infectada logo após o início da atividade sexual (COLLINS *et al.*, 2002), com maior prevalência em jovens abaixo de 25 anos. Um segundo pico de infecção ocorre em mulheres de maior idade, próximo àquela de maior incidência de CC (FRANCESCHI *et al.*, 2006; CASTLE *et al.*, 2005).

A incidência de CC torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos, denotando um efeito tardio da infecção pelo HPV. A mortalidade por CC é substancialmente menor que a incidência, sendo de 5,60/100.000 mulheres no Brasil. Em países desenvolvidos a sobrevida média estimada varia de 59 a 69% após cinco anos do diagnóstico inicial, no entanto em países em desenvolvimento, onde os casos são diagnosticados em estádios relativamente avançados, a sobrevida média é de cerca de 49%, sendo esta mesma porcentagem estimada para o Brasil (MS.INCA, 2006).

O número de casos novos de CC esperados para o Brasil em 2008 é de

18.680, com um risco estimado de 19,18 casos por 100 mil mulheres. Com relação à incidência por região, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CC ocupa a primeira posição em incidência de tumores malignos na região Norte (22,20/100.000). Representa o segundo tumor em incidência, abaixo apenas da neoplasia maligna da mama, nas regiões Sul (24,44/100.000), Centro-Oeste (19,44/100.000), e Nordeste (17,58/100.000). Na região Sudeste ocupa a terceira posição em incidência (17,83/100.000), com os tumores de mama e de cólon ocupando a primeira e segunda posições. Este comportamento evidencia a urbanização e desenvolvimento do Sudeste Brasileiro, que se reflete em maior informação da população com relação aos métodos de prevenção e detecção precoce do CC. A dificuldade de acesso explicaria a alta taxa de incidência de lesões em estágio avançado na região Norte (MS.INCA, 2006).

No Estado do Paraná esperam-se 1.350 novos casos para o ano de 2008, com um risco estimado de 25,11/100.000 mulheres e em Curitiba, sua capital, 210 novos casos com risco de 23,10/100.000 mulheres (MS.INCA, 2008). Em uma pesquisa realizada em 2006 nas capitais brasileiras, 86,4% das mulheres com idade entre 25 e 59 anos tinham realizado um exame preventivo de CC no último ano (Curitiba foi a 3ª capital com maior frequência) (BEC, 2007). Este dado pode explicar a alta taxa de incidência como sendo reflexo de um maior acesso das pacientes aos recursos diagnósticos, porém há necessidade de maior atuação em medidas preventivas.

### 2.1.2 Histopatologia e Classificação Citológica

O CC é uma doença crônica que ocorre a partir de mudanças intra-epiteliais as quais podem, em um período médio de cinco a seis anos, transformar-se em processo invasor.

As lesões cervicais precursoras do CC apresentam-se em diferentes graus evolutivos, do ponto de vista cito-histopatológico e vários sistemas de classificação têm sido propostos. O sistema baseado em quatro níveis evolutivos classifica as lesões em displasias leves, moderadas, severas e carcinoma *in situ*. Foi muito utilizado no passado, porém o termo displasia atualmente não é mais utilizado. O sistema de três níveis denomina as lesões de NIC (neoplasia intra-epitelial cervical) I, II, III.

Em 1988, um novo sistema de classificação citológica conhecido como classificação de Bethesda foi desenvolvido. Neste sistema a NIC de grau I é denominada lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LSIL) e as NICs II e III são classificadas como lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (HSIL). As lesões previamente classificadas como *borderline* ou de categoria indeterminada são classificadas como células escamosas atípicas de significância indeterminada (ASCUS).

Durante o XVII Congresso Brasileiro de Citopatologia em 2002, a nomenclatura em citopatologia ginecológica foi atualizada ([www.citopatologia.org.br](http://www.citopatologia.org.br)) e as atipias celulares epiteliais cervicais classificadas em:

- 1) lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL) (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I);
- 2) lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais grau II e III);
- 3) lesão intra-epitelial de alto grau, não podendo excluir invasão;
- 4) carcinoma epidermóide invasor.

O carcinoma invasor de colo uterino, em cerca de 90% dos casos, evolui a partir da NIC, mas nem toda NIC progride para um processo invasor, porém todas as NIC devem ser consideradas lesões significativas e como tal devem ser orientadas (CONDUTAS DO INCA/MS).

Com base neste conhecimento a abordagem clínica e terapêutica destas pacientes é delineada conforme a classificação histológica da lesão e consiste em avaliar a persistência ou progressão de LSIL para HSIL, ou eliminação da LSIL, que ocorre na maioria dos casos, através de exames citológicos e histológicos seriados. As lesões classificadas como NIC II podem representar tanto uma infecção aguda pelo HPV que poderá regredir, como um pré-câncer incipiente com destino a persistência e alto risco de invasão. Até mesmo alguns tipos de HPV de baixo grau são capazes de produzir lesões diagnosticadas como NIC II, portanto este nível de anormalidade não é suficiente para prever o risco de CC (MOSCICKI *et al.*, 2006).

O pré-câncer é o precursor intra-epitelial do câncer invasivo, é o equivalente ao diagnóstico histológico de NIC III. HSIL e CC são caracterizados por aneuploidia e

instabilidade genética, e estudos *in vitro* demonstram que estas seriam conseqüências da expressão inapropriada dos oncogenes virais E6 e E7 com ativação da telomerase e amplificação centrossomal.

Embora a regressão de lesões NIC III seja teoricamente possível, esta tendência não é observada em seguimentos em curto prazo e estudos observacionais destas lesões não seriam éticos.

Nota-se, portanto, que nos casos de NIC II, onde o nível de anormalidade não é suficiente para prever o risco de progressão a NIC III e CC, e nos quais não é ético o seguimento em longo prazo, há a necessidade de um outro fator preditivo de risco de CC para auxiliar no delineamento de uma abordagem terapêutica mais precisa.

### 2.1.3 Fatores de Risco

Vários são os fatores de risco conhecidos, que aumentam a chance de desenvolver CC e suas lesões precursoras, e o conhecimento dos mesmos torna-se primordial para a detecção precoce da doença em mulheres com alta probabilidade de desenvolvê-la.

O fator de risco mais importante para CC é a infecção genital por papilomavírus humano (HPV). Estudos demonstram uma prevalência de DNA-HPV em 99,7% dos carcinomas cervicais (BOSCH *et al.*, 1995; WALLBOOMERS *et al.*, 1999). No entanto sabe-se que apenas as infecções virais definidas como persistentes seriam consideradas de importância para a oncogênese.

A persistência viral pode ser definida como a detecção do mesmo tipo de HPV, duas ou mais vezes, em avaliações periódicas em um intervalo de no mínimo dois anos. Felizmente a maioria dos HPV, mesmo os considerados de alto risco, não tem capacidade de permanecer no hospedeiro por muito tempo e são considerados transientes. Não há concordância entre os autores sobre a passagem do estado de infecção transiente para persistente. A média de tempo para eliminação do vírus em mulheres infectadas varia de quatro a seis meses até um a dois anos em diferentes estudos, dependendo das estratégias de seguimento e definições (por exemplo, a necessidade de 1 ou 2 testes de DNA-HPV negativos para definir a eliminação do vírus). Apesar desta variação, a

maioria dos estudos demonstra que aproximadamente 90% das pacientes infectadas eliminam o vírus após dois anos de seguimento.

Outros potenciais fatores de risco associados ao desenvolvimento do CC, também denominados cofatores, podem ser divididos em três grupos: (1) cofatores ambientais ou exógenos, incluindo o uso de anticoncepcionais orais, tabagismo, e infecção concomitante pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou outros agentes sexualmente transmissíveis; (2) cofatores virais, tais como infecção por determinados tipos de HPV, carga viral, integração viral e coinfeção com mais de um tipo de HPV; (3) cofatores do hospedeiro: multiparidade, hormônios endógenos, resposta imunológica e susceptibilidade genética.

O início precoce da atividade sexual, história de múltiplos parceiros e parceiros de alto risco (homens cuja parceira anterior tinha carcinoma de colo uterino, homens com carcinoma de pênis ou homens que tiveram contato com prostitutas), também são fatores de risco conhecidos para o CC (MS.INCA, 2006).

Um estudo recente (HEMMINKI & CHEN, 2006) sugere um papel da história familiar na qual mulheres cuja mãe ou irmãs tiveram CC são mais sujeitas ao desenvolvimento da doença. Esta tendência familiar pode ser causada por uma condição herdada que levaria a uma menor capacidade destas mulheres em combater a infecção por HPV.

#### 2.1.3.1 Cofatores ambientais ou exógenos

Em publicação recente a IARC classificou o uso de contraceptivos orais combinados como carcinogênico para a cérvix uterina. Uma meta-análise de CC e AHO (anticoncepcionais hormonais orais) demonstrou que o risco para CC invasivo aumenta com o uso prolongado de AHO. O risco em mulheres que utilizaram AHO por mais de 10 anos é aproximadamente o dobro quando comparado com mulheres que nunca fizeram uso destas substâncias (SMITH *et al.*, 2003). O uso de anticoncepcionais orais poderia influenciar a progressão da infecção por promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 envolvidos na carcinogênese (CASTELLSAGUE e MUNOZ, 2003).

O tabagismo parece também aumentar o risco de CC em mulheres

positivas para o HPV, sendo esta associação observada em vários estudos. Subprodutos carcinogênicos do tabaco foram encontrados no muco cervical de fumantes, entre eles a nicotina e a cotidina. Estas substâncias podem danificar diretamente o DNA das células cervicais ou comprometer a resposta imunológica local, facilitando a persistência do HPV (CASTELLSAGUE e MUNOZ, 2003). O benzopireno (BaP), o principal carcinógeno encontrado na fumaça do cigarro interage com o HPV, elevando o título viral dos HPVs 16, 18 e 31 (ALAN *et al.*, 2007). Alterações encontradas no sistema imune periférico de pacientes fumantes incluem o aumento do número de linfócitos T citotóxico/supressores, a diminuição do número de linfócitos T Helper, significativo decréscimo de células natural killer e baixo nível sanguíneo de imunoglobulinas, exceto IgE, a qual é elevada (JOHNSON *et al.*, 1990). Outros possíveis mecanismos incluem a redução da resposta imune na cérvix, com a redução do número de células de Langerhans (TAY *et al.*, 1987; POPPE *et al.*, 1990) e efeitos relacionados ao metabolismo dos hormônios femininos.

Em 2004, a IARC classificou o tabagismo como causa de CC. O ICESCC (*International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer*) publicou em 2006 o resultado de uma análise de 24 estudos epidemiológicos, no qual mulheres fumantes apresentaram um aumento significativo do risco relativo de CC, comparado com mulheres não fumantes (RR = 1,60; 95% IC: 1,48- 1,73). Este risco diminui em mulheres que abandonaram o hábito e aumenta com a quantidade de cigarros/d (+ 15 cigarros /d versus nenhum), mas não demonstra relação com a duração do hábito de fumar.

O papel específico de outros agentes infecciosos na patogênese do CC foi pesquisado em muitos estudos epidemiológicos. Os agentes infecciosos que foram relacionados com significância nestes estudos foram: HSV-2 (vírus herpes simples tipo II), *Chlamydia trachomatis* e HIV. Os dois primeiros como resultado de uma resposta inflamatória, com a produção de radicais livres e desenvolvimento de instabilidade genética, e no HIV, devido ao estado de imunossupressão, o que reforça a importância de cofatores imunológicos do hospedeiro na carcinogênese pelo HPV.

O baixo nível sócio-econômico também tem sido relacionado como um fator de risco para o CC. Muitas mulheres com baixo nível sócio-econômico não

têm acesso adequado aos serviços de saúde. Tais mulheres também podem apresentar subnutrição o que também poderia aumentar o risco. Mulheres com dieta pobre em vitamina A e C podem ter um risco maior de desenvolver CC, assim como as mulheres obesas.

### 2.1.3.2 Cofatores do hospedeiro

Mulheres que tiveram múltiplas gestações a termo também têm um risco maior de desenvolver a doença, conforme alguns estudos. O maior risco de CC em mulheres com elevado número de gestações poderia estar relacionado com a manutenção prolongada da zona de transformação na exocérvix ou a alterações hormonais como níveis aumentados de estrogênio e progesterona (HILDESHEIN *et al.*, 2001; MUNOZ *et al.*, 2002; CASTELLSAGUE e MUNOZ, 2003).

#### 2.1.3.2.1 Resposta imune do hospedeiro contra o HPV

O HPV infecta primeiramente a camada basal de queratinócitos, tendo como alvo as células tronco, mas a expressão de altos níveis de proteínas virais somente é encontrada nas camadas superficiais do epitélio escamoso, os estratos espinhoso e granuloso (MIDDLETON *et al.*, 2003; STERLING *et al.*, 1993). A infecção e a replicação viral são absolutamente dependentes das etapas de diferenciação dos queratinócitos sendo que o ciclo de infecção do vírus acompanha a diferenciação da célula hospedeira. O tempo desde a infecção inicial até a liberação do vírus é de aproximadamente três semanas, tempo requerido para um queratinócito da camada basal completar a sua diferenciação e sofrer descamação naturalmente.

A infecção pelo HPV não é acompanhada por inflamação, não havendo citólise ou efeito citopático letal, como consequência da replicação, empacotamento e liberação das partículas virais. Desta forma, o sistema imune não é sinalizado quanto à presença do vírus no organismo e isto pode resultar em cronicidade e persistência da infecção. O período entre a infecção e o aparecimento das lesões é altamente variável, de semanas a meses, sugerindo que o vírus pode desenvolver mecanismos efetivos de evasão do sistema imune.

A maioria das infecções pelo HPV são eliminadas do organismo sendo a



média de tempo requerida de 8-14 meses para os HPV de alto risco, particularmente o HPV 16 (FRANCO *et al.*, 1999; GIULIANO *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2005). Quando o sistema imune falha em eliminar ou controlar a infecção, a mesma persiste com altos níveis de replicação do DNA viral do HPV de alto risco (HR-HPV). Os indivíduos com infecção persistente têm uma probabilidade maior de progressão da lesão para HSIL e carcinoma invasivo.

Os fatores que contribuem para a persistência viral não foram completamente elucidados, mas parecem ter pouca ou nenhuma associação com o comportamento sexual. Há evidências de que a resposta imune do hospedeiro possa ser um dos principais fatores a influenciar a história natural da infecção pelo HPV (SCOTT *et al.*, 1999), devido ao fato que a vigilância imunológica afeta a susceptibilidade às lesões e sua regressão (WU *et al.*, 1994). Embora a resposta imune à infecção pelo HPV não esteja completamente compreendida, evidências provenientes de estudos em murinos e humanos com infecções por patógenos intra-celulares apontam para a importância das células T e células acessórias estimuladas por citocinas, para o início e manutenção de uma resposta imune efetiva para tais patógenos.

Os linfócitos T são as principais células no sistema imune adaptativo e classificam-se em linfócitos T CD4+ (LT CD4+) e linfócitos T CD8+ (LT CD8+). A ativação do LT CD4+ resulta na secreção de uma variedade de citocinas. O padrão de expressão destas citocinas define dois subtipos de LT CD4+, conhecidos como Th1 e Th2. As células Th1 secretam citocinas responsáveis pela ativação de células citotóxicas efetoras (macrófagos, células Natural Killer e LT CD8+) gerando a resposta imune mediada por células a patógenos intra-celulares. As células Th2 secretam citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos B a plasmócitos, promovendo a imunidade humoral.

O exame histológico das lesões provenientes da infecção pelo HPV em regressão e das persistentes, apesar do tratamento, revela diferentes populações celulares. Nas verrugas genitais em regressão observa-se um infiltrado de LT CD4+, LT CD8+ e macrófagos no estroma e epitélio, enquanto que em lesões que não regredem há ausência de células imunológicas no sítio da infecção, poucos LT CD8+ intraepiteliais e células mononucleares no estroma (STANLEY, 2006). A maior incidência de infecções pelo HPV em indivíduos imunossuprimidos também

ilustra a importância do mecanismo de resposta imune mediada por célula na resolução e controle das infecções (CHIRGWIN, *et al.*, 1995; FENNEMA, *et al.*, 1995; RUCHTER, *et al.*, 1996).

#### 2.1.3.2.2 Os mecanismos do HPV de evasão do sistema imune

Teoricamente, o vírus deveria ser detectado pela célula apresentadora de antígenos (APC) do epitélio escamoso, a Célula de Langerhans (LC). A LC ativada deveria migrar para um linfonodo, processando os antígenos e apresentando-os à célula T imatura. A célula T diferenciada em T efetora, migraria para o sítio da infecção e destruiria o queratinócito infectado.

Há várias razões para isto não ocorrer. O ciclo de infecção do HPV é, por si próprio, um mecanismo de evasão do sistema imune inibindo a detecção do vírus pelo hospedeiro, sendo que para a maioria das infecções há pouca ou nenhuma liberação de citocinas pró-inflamatórias, importantes para a ativação das células dendríticas e os sinais essenciais para a resposta imune no epitélio escamoso estão ausentes (KUPPER e FULBRIDGE, 2004).

Contudo mesmo na ausência de citólise e morte celular induzida pelo vírus, os queratinócitos infectados pelo HPV deveriam ativar um efetivo sistema de defesa antiviral: a secreção de interferon tipo 1. Os interferons de tipo 1, interferon- $\alpha$  e interferon- $\beta$ , têm atividade antiviral, antiproliferativa, antiangiogênica e propriedades imunoestimulatórias que ativam as células dendríticas imaturas (LE BON, *et al.*, 2002; THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005). Os HPVs de alto risco (HR-HPVs) são capazes de diminuir a expressão de genes induzíveis pelo interferon- $\alpha$ , e as oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 interagem diretamente com componentes das vias de sinalização do interferon, inibindo-as (RONCO *et al.*, 1998; BARNARD e McMILLAN, 1999).

Também não é observada ativação de LCs e células dendríticas estromais em resposta às proteínas do capsídeo do HPV. Desta forma as células dendríticas estariam expostas a baixos níveis de proteínas virais, em um meio não inflamatório por tempo prolongado, propiciando ao HPV evadir-se eficientemente da resposta imune inata e postergando a ativação da resposta imune adaptativa.

Felizmente, na maioria dos casos uma resposta imune eficiente é

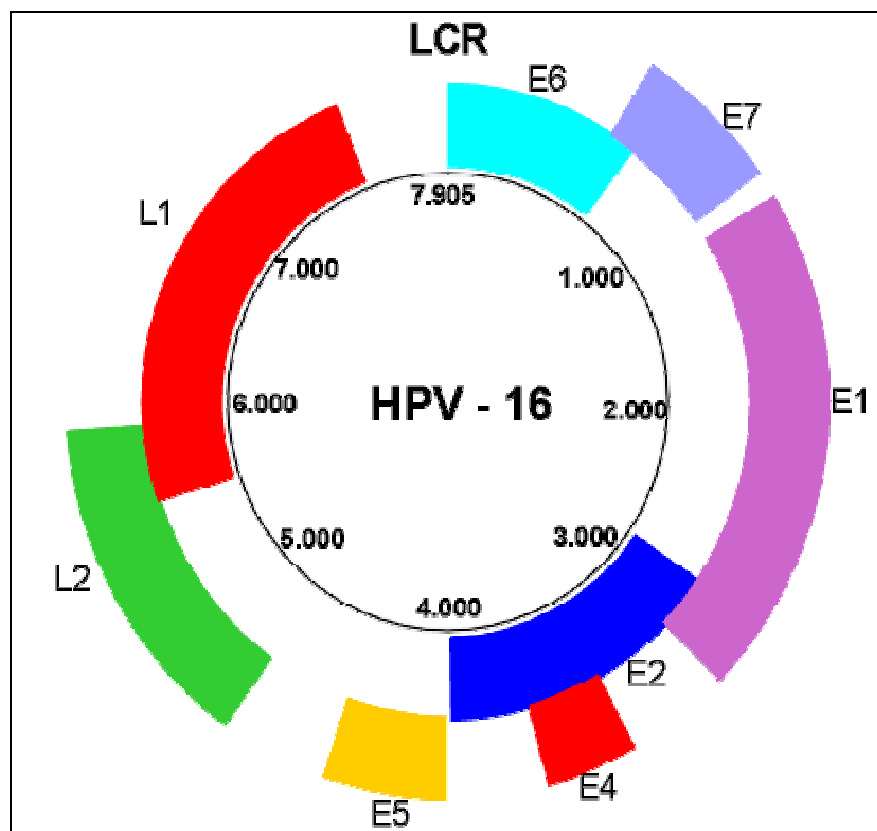
estabelecida contra o HPV a qual parece ser caracterizada por imunidade mediada por células, associada à regressão da lesão e também pela produção de anticorpo neutralizante. Este anticorpo é dirigido contra epítomos conformacionais da proteína L1, localizada na superfície externa da partícula viral, porém sua produção ocorre em níveis baixos, reflexo do ciclo viral intracelular exclusivo, com ausência de viremia, além da produção das partículas virais se dar em células epiteliais e, portanto distante de APCs e de macrófagos (VILLA et al, 2005). A produção deste anticorpo e a resposta mediada por células são capazes de proteger de infecções virais subseqüentes (STANLEY, 2002).

## 2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

### 2.2.1 Estrutura e Classificação do HPV

Os HPVs são vírus sem envelope, com cerca de 55 nm de diâmetro, com um capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros, constituídos de DNA dupla fita, circular, que contém cerca de 8.000 pares de bases. Anteriormente classificados como pertencentes à família *Papovaviridae* e subfamília *Papillomavirus*, nos últimos anos foram reconhecidos como uma família própria: a *Papillomaviridae* (de VILLIERS, 2001). O genoma do HPV divide-se em três regiões: região precoce (E), região tardia (L) e região reguladora (URR). A região precoce contém 7 a 8 genes (E1,E2, E3,E4, E5, E6, E7 e E8) e a região tardia 2 genes (L1 e L2). A primeira contém o DNA para a replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). E3 e E8 não têm ação conhecida, estando presentes em apenas uma minoria dos HPVs. Os genes L1 e L2 codificam para duas proteínas do capsídeo. A região regulatória que separa estes conjuntos de genes é constituída por 1.000 pb e contém elementos reguladores da expressão e replicação gênicas e do empacotamento de partículas virais (Figura 01).

FIGURA 01 - MAPA FÍSICO DO GENOMA DO HPV TIPO 16



Nota: E: Região precoce  
L: Região tardia  
FONTE: [www.ipoportor.min-saude.pt](http://www.ipoportor.min-saude.pt)

Há mais de 200 papilomavírus reconhecidos, classificados em tipos, subtipos e variantes com base em homologia de DNA. Um novo genótipo é definido se possuir menos de 90% de homologia com a seqüência nucleotídica de L1, após o seqüenciamento completo do genoma. Os subtipos são definidos quando apresentam entre 2 a 10% de divergência com a seqüência nucleotídica de L1, enquanto as variantes apresentam menos de 2% de divergência.

Filogeneticamente os tipos que infectam a área genital pertencem ao gênero alfa e os associados com epidermodisplasia verruciforme cutânea, ao gênero beta. Os diferentes tipos têm tropismo por infectar diferentes tecidos, por exemplo, tipos epidérmicos (HPV 1-4, 10, 26-29, 37, 38, 46, 47, 49, 50, 57), e tipos genitais (HPV 6, 11, 16, 18, vários 30s, 40s, 50s, 60s, 70s). Aproximadamente 40 tipos infectam a área genital. Destes, alguns têm potencial oncogênico, particularmente os HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 54, 56, 58,

59, 60 e 66 (GARLAND, 2002). Os tipos oncogênicos prevalentes mundialmente são: 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52 e 35 (SMITH *et al.*, 2007). Os tipos genitais de HPV podem ser classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino em:

Tipos de baixo risco (LR): (HPVs 6, 11, 40, 42, 43 e 44), causadores de verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino.

Tipos de alto risco (HR): HPVs tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68 encontrados em lesões de alto grau e carcinoma invasor.

Tipos de risco indeterminado: (26, 34, 53, 54, 55, 61, 62, 66, 73, 82, 83 entre outros) (JACOBS *et al.*, 1997, 2000; GRAVITT *et al.*, 1998; GRAVITT *et al.*, 2001; KJAER., 2001; PEYTON *et al.*, 2001; SCHLECHT *et al.*, 2001; GIULIANO *et al.*, 2002; MOLANO *et al.*, 2002; VAN DEN BRULE *et al.*, 2002; MUNOZ *et al.*, 2003). Em uma publicação recente, MUNOZ *et al.* (2006) propõem que os HPVs tipos 26, 53, 66, 68, 73 e 82 deveriam ser considerados como provavelmente carcinogênicos, visto que foram encontrados associados com CC.

Os HR-HPV são detectados em 50-80% das lesões de alto grau (NIC-II e NIC-III) e em 99,7% dos casos de câncer invasor do colo uterino.

### 2.2.2 Infecção por Papilomavírus Humano

A infecção por HPV é o fator de risco mais importante na etiopatogênese do CC. Este vírus é transmitido de uma pessoa para a outra através do contato sexual com a pele da região afetada, não sendo necessário o contato com fluidos corporais. A maioria dos casos de infecção por HPV é assintomática, no entanto as lesões podem surgir em um período de três semanas até oito meses após a infecção, sendo a média de três meses após a infecção. Os HPVs podem causar verrugas ou papilomas que são tumores benignos. Os que ocorrem nas áreas genitais masculinas ou femininas e na região anal são denominados condiloma acuminado e são causados em sua maioria pelos HPVs 6 e 11. Estes raramente são relacionados ao CC e são classificados como tipos LR-HPV. Outros tipos podem causar verrugas em outras áreas do organismo, como mãos, pés, língua e lábios.

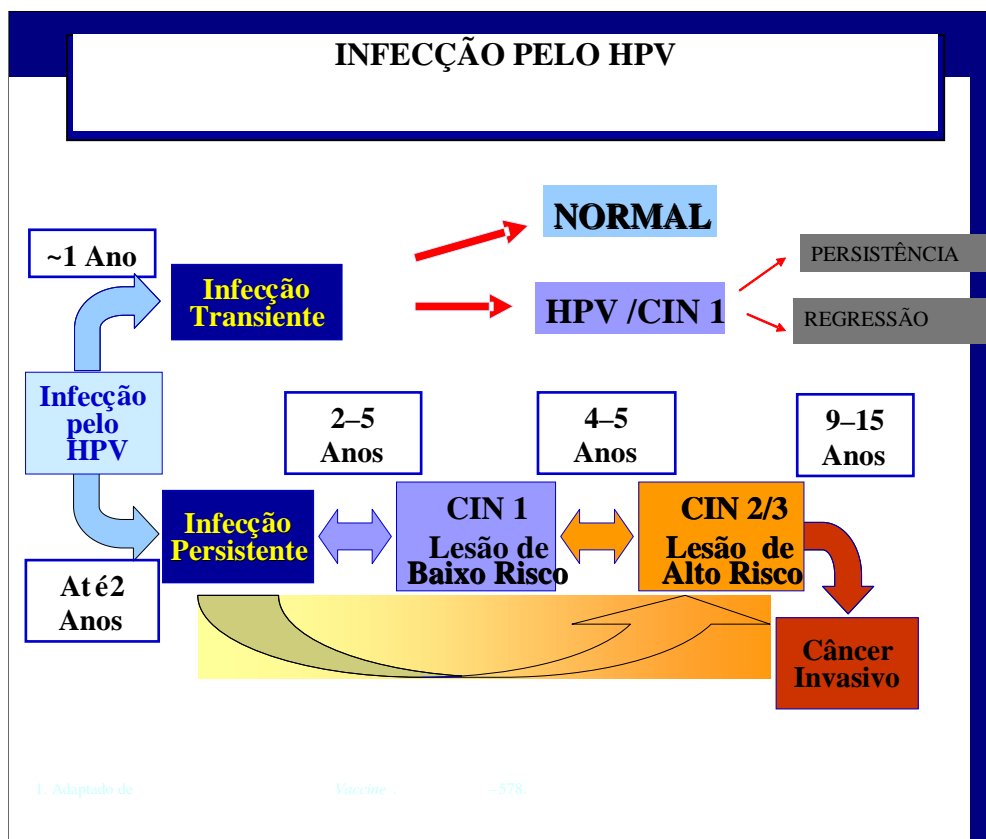
A infecção por HPV tem um padrão transitório. A maioria das mulheres

infectadas por tipos de HPV causadores de CC não desenvolve a doença (70 a 90%). Geralmente a infecção desaparece sem nenhum tratamento e o vírus é eliminado devido à ação do sistema imune, em um período de 12 a 24 meses após o diagnóstico inicial (HO *et al.*, 1998). A persistência do HPV em 10 a 30% dos casos é mais comum com os tipos oncogênicos e está associada ao desenvolvimento de lesão escamosa intra-epitelial (SIL) (KOUTSKY *et al.*, 1997), (Figura 02). HO *et al.* (1998), em um estudo com 608 mulheres, determinaram que a duração média das novas infecções por HPV foi de oito meses. A persistência da infecção por seis meses ou mais estava associada à idade, tipos de HPV associados com CC e infecção por múltiplos tipos de HPV. O risco de alterações citológicas (Papanicolaou alterado) estava associado com tipos de HPV conhecidos como de alto risco.

Baseado em estudos de coorte o tempo entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de NIC III é de 9-15 anos, com a infecção ocorrendo no final da segunda década de vida ou no início da terceira e o diagnóstico de NIC III, com um pico próximo de 25-30 anos.

Observando a faixa etária predominante das lesões NIC III (27-30a) e a média de idade das pacientes com CC invasivo (5ª década) sugere-se que as pacientes permanecem um longo período no estado pré-canceroso NIC III. Os fatores de risco desencadeantes do processo de invasão não são compreendidos.

FIGURA 02 - HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV



FONTE: Paglusi, 2004. Adaptado

### 2.2.3 Patogênese e Efeito Oncogênico

Os HPVs são epiteliotrópicos (infectam células epiteliais escamosas) em sítios epiteliais e mucosos. Duas moléculas da família das integrinas  $\alpha 6\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 4$ , expressas na superfície das células basais, foram identificadas como os receptores de HPV (EVANDER *et al.*, 1997). Os genes E1 e E2 são os responsáveis pela replicação do DNA viral a qual ocorre nas células das camadas basais epiteliais, às expensas da maquinaria celular, onde os DNAs replicados permanecem em múltiplas cópias estáveis, garantindo a persistência nas células do epitélio proliferativo (HO *et al.*, 1998; LOWY e HOWLEY, 2001).

O HPV afeta as células tronco, onde baixos níveis de DNA são sintetizados, com um número de 50 a 100 genomas epissomais por célula. O vírus autorreplica-se, expressando as proteínas precoces na camada proliferativa e mais tarde nas células mais diferenciadas, onde ocorre a síntese do capsídeo e as partículas virais são estruturadas (FRASER e TINDLER, 1992), resultando em

alto nível de replicação do genoma viral.

Por razões desconhecidas, a infecção cervical pelo HPV tende a causar lesões em uma área conhecida como junção escamo-colunar ou zona de transformação, área onde o epitélio estratificado escamoso não queratinizado da exocérvix contacta e gradualmente substitui o epitélio colunar da endocérvix, em um processo conhecido como metaplasia.

O genoma do HPV pode replicar-se como um epissomo extra-cromossomal ou plasmídeo em lesões benignas associadas aos HPVs de baixo risco, e em displasias leves e moderadas associadas aos HPVs de alto risco. No entanto o DNA viral está freqüentemente integrado ao genoma da célula hospedeira em lesões de NIC de alto grau e no carcinoma *in situ*. Na maioria dos carcinomas, os genomas virais são integrados no DNA celular em sítios cromossômicos específicos em diferentes cromossomos. Ganhos ou perdas cromossômicas podem levar a distúrbios em oncogenes ou genes supressores tumorais, com resultante carcinogênese. O sítio de integração viral, embora não específico, geralmente ocorre próximo às regiões regulatórias da transcrição de E1 e E2. Este processo leva a um aumento da expressão dos oncogenes virais E6 e E7 os quais estão fortemente associados ao processo de carcinogênese (GARLAND, 2002). Na maioria dos CCs a integração viral é encontrada em apenas um sítio cromossômico nas células tumorais, concordando com a idéia que o CC é uma doença clonal (VINOKUROVA *et al.*, 2005).

Múltiplos processos celulares são modificados pela ação dos produtos virais antes do início da malignização. O efeito oncogênico do HPV nas células é exercido através de duas oncoproteínas virais precoces E6 e E7 e parte de E5 dos HPVs de alto risco. As células infectadas tornam-se geneticamente instáveis devido à interferência das oncoproteínas virais em diversos mecanismos celulares, como o reparo do DNA, o controle do ciclo celular, o fuso mitótico, a apoptose ou a estabilização dos telômeros.

#### 2.2.3.1 Efeitos das oncoproteínas E6 e E7

As oncoproteínas virais E6 e E7 são essenciais na indução e manutenção da transformação celular devido a sua interferência com o controle do ciclo celular e



apoptose (INCASSATI *et al.*, 2006). Estas oncoproteínas ligam-se a sítios específicos nas proteínas p53, produto do gene *TP53* (“tumor protein p53”) (WERNESSE *et al.*, 1990) e pRb, produto do gene *RB1* (retinoblastoma 1) (DYSON *et al.*, 1989) levando a alterações no ciclo celular, com proliferação celular anormal.

A oncoproteína E7 é uma pequena fosfoproteína nuclear constituída por 3 regiões conservadas (CR1, CR2 e CR3) (LIU *et al.*, 2006). O gene do retinoblastoma (*RB1*) é um importante gene supressor tumoral que está deletado ou mutado em muitas linhagens celulares tumorais. A perda do gene ou a incapacidade de sintetizar a p105-RB é correlacionada com o aumento da proliferação celular e a oncogênese.

O produto do gene *RB1*, a proteína pRb e os membros de sua família, p107 e p130 são alvos da oncoproteína HPV E7. Em seu estado hipofosforilado, as proteínas da família pRb podem ligar-se a fatores de transcrição, como os membros da família E2F e reprimir a transcrição de genes envolvidos na síntese de DNA e na progressão do ciclo celular (DYSON, 1998). A fosforilação de pRb por uma quinase G1 dependente de ciclina, libera E2F e permite a progressão do ciclo celular para a fase S. A pRb que normalmente previne a célula da entrada no ciclo celular e regula a transição G1/S, quando ligada à E7, deixa a proteína E2F livre para comandar a divisão celular (DYSON *et al.*, 1998; MUNGER *et al.*, 2004). Esta proteína pertence a uma importante família de fatores de transcrição, permitindo a ativação de complexos ciclina-CDK que levam à progressão irrestrita da fase G1 para S do ciclo celular, resultando em proliferação celular anormal (KLINGELHUTZ *et al.*, 1996). Além da inativação de membros da família pRb, numerosas funções de E7 foram descritas (Quadro 1).

QUADRO 1 - FUNÇÕES DA ONCOPROTEÍNA E7

Imortalização celular
Ativação de ciclinas E e A
Inativação da pRb
Indução da apoptose
Inibição de inibidores de quinase ciclina-dependente
Aumento da integração de DNA exógeno e mutagênese
Degradação de tirosina-quinase Blk

O gene *p53* regula a progressão do ciclo celular e a apoptose após um dano celular. Quando o dano ao DNA é moderado, há uma parada prolongada no ciclo celular durante a qual o DNA é reparado, mas quando o dano é severo a apoptose é induzida. A apoptose tem um importante papel no desenvolvimento do organismo, na homeostasia celular e na patofisiologia de muitas doenças. No sistema imune a apoptose é freqüentemente induzida por receptores de superfície celular. Muitos destes receptores pertencem à família de receptores TNF, incluindo TNFR1 (Receptor 1 do fator de necrose tumoral), Fas, DR4 (“*death receptor 4*”) e DR5 (“*death receptor 5*”). A ligação do receptor à seus respectivos ligantes: TNF, FasL e TRAIL (“*TNF-related apoptosis inducing ligand*”) induz à morte celular através da ativação das caspases. Muitos vírus incluindo o HPV desenvolveram estratégias para bloquear a apoptose, persistindo na célula infectada por longo período.

A atividade supressora tumoral de *p53*, que normalmente levaria a célula alterada à apoptose, é perdida quando há a ligação da oncoproteína E6. Esta proteína forma um complexo com a proteína E6-AP (E6 associated protein ligase), um membro da família E3 de ubiquitinas ligases, que somente liga-se à *p53* quando esta está associada à E6. O complexo E6/E6-AP leva *p53* à degradação proteolítica através da via da ubiquitina, diminuindo os níveis de *p53* nas células infectadas (WERNESSE *et al.*, 1990; THOMAS *et al.*, 1999, SHEFFNER e WHITAKER, 2003). A E6 interfere em outras proteínas pró-apoptóticas, Bak, FADD e procaspase 8 (GARNETT *et al.*, 2006; THOMAS e BANKS, 1999).

Recentemente o produto do gene *Notch1* foi identificado como novo alvo da *p53*. *Notch1* é um oncogene envolvido no desenvolvimento de leucemias de células T humanas (ELLISEN *et al.*, 1991), mas também age na diferenciação dos queratinócitos (RANGARAJAN *et al.*, 2001). O nível de expressão da proteína ErbB2 também é influenciado pela degradação de *p53* e a interferência desta com o complexo E6/E6-AP contribui para a carcinogênese cervical (NARISAWA-SAITO *et al.*, 2007). Outros alvos da E6 também contribuem para a transformação celular (Quadro 2).

A E6 induz a atividade da telomerase, ativando o promotor da telomerase transcriptase reversa (VELDMAN *et al.*, 2003). A telomerase humana é um

complexo ribonucleoprotéico composto de uma transcriptase catalítica reversa (hTERT) e um componente RNA (hTR). A hTERT é expressa apenas em células específicas da linhagem germinativa, células tronco e células neoplásicas. Alta atividade da telomerase é observada em mais de 85% das células neoplásicas humanas, indicando um papel importante na tumorigênese (PENDINO *et al.*, 2006). A imortalização das células é uma das principais características dos tumores malignos. Normalmente as células senescentes entram em apoptose quando um nível crítico de encurtamento dos telômeros é atingido. A maioria das células neoplásicas humanas têm seus telômeros regenerados pela reativação da expressão da telomerase, um processo conhecido como *expressão de novo*, visto que a expressão do gene *TERT*, responsável pela atividade da telomerase é restrita a células-tronco e células germinativas em tecidos não neoplásicos.

Um outro mecanismo de regeneração de telômeros chamado de via ALT (*“Alternative Lengthening of Telomeres”*) tem merecido considerável atenção, devido ao desenvolvimento de resistência dos tumores a novas drogas terapêuticas, com mecanismo de ação baseado na atividade da telomerase (DUNHAM *et al.*, 2000, CHANG *et al.*, 2003).

O modo de ação de pRB e p53 na regulação do ciclo celular sugerem que a inativação ou modulação da atividade destas duas proteínas podem resultar na proliferação celular das células basais, alterando a sua diferenciação, permitindo então a expansão de um *“pool”* de células epiteliais para a replicação de partículas virais.

#### QUADRO 2 - FUNÇÕES DA ONCOPROTEÍNA E6

Imortalização celular
Degradação de p53
Efeito anti-apoptótico
Desestabilização cromossômica
Aumento da Integração de DNA exógeno e mutagênese
Ativação da telomerase
Bloqueio das funções do Interferon

A porta de entrada do HPV no organismo é a mucosa epitelial cervical que se comporta como interface entre o vírus e o ambiente externo de um lado e o sistema imune de outro, o qual é ativado na presença de uma infecção viral. Os interferons são citocinas que exibem potentes propriedades antivirais, antiproliferativas e imunomodulatórias. Os vírus, assim como os tumores, são capazes de desenvolver mecanismos de escape do sistema imune. O IFN- $\alpha$  é utilizado para o tratamento de pacientes com infecções pelo HPV e a avaliação deste tipo de tratamento tem demonstrado que os vírus desenvolvem mecanismos para evitar os efeitos do interferon. Shneider *et al* (1987) também observaram uma fraca resposta ao tratamento com IFN- $\alpha$ , em lesões por HPV 16 e 18 em comparação às lesões por HPVs 6 e 11.

Os queratinócitos infectados pelo HPV podem modificar a resposta imune de diversas maneiras: através da secreção de várias citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF, TGF- $\beta$ ) (WOODWORTH e SIMPSON, 1993) e receptores solúveis para TNF (MALEJCYK *et al.*, 1996), ou através da produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) em carcinomas escamosos, caracterizando uma fuga aos mecanismos de defesa da resposta imune mediada por célula T (KIM *et al.*, 1995).

## 2.3. CITOCINAS

### 2.3.1 Definição e Classificação das Citocinas

Citocinas são polipeptídeos regulatórios de baixo peso molecular ou glicoproteínas, secretadas pelos linfócitos e várias outras células do organismo em resposta a um número variado de estímulos. Foram originalmente identificadas, descritas e denominadas de acordo com seu papel sobre células linfematopoéticas (METCALF, D.; 1989), mas sabe-se que apresentam uma gama de funções, atuando em processos fisiológicos, patológicos e regulando a diferenciação de diversas linhagens celulares. A atividade das citocinas foi primeiramente reconhecida em meados dos anos 60, quando observou-se que sobrenadantes derivados de cultura de linfócitos continham fatores que poderiam regular a proliferação, diferenciação e maturação de células do sistema imune (citado por KUBY, 1995).

Diferente dos hormônios, as citocinas têm uma atuação parácrina (atuação local, próxima às células que as produzem), ou autócrina (diretamente sobre as células que as produzem), e apenas ocasionalmente entram no sistema circulatório para agirem como mediadores endócrinos (MIYAJIMA *et al.*, 1992; KISHIMOTO *et al.*, 1994). Tais citocinas, como o fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a eritropoietina (EPO), e o fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF) estão normalmente presentes no sangue em quantidades detectáveis e aptas para atuar sobre células alvo distantes (STITES; TERR; PARSLOW, 2000).

As citocinas e seus receptores são classificados em famílias distintas de proteínas estruturalmente relacionadas e iniciam sua ação por ligação a receptores específicos na membrana da célula-alvo, desencadeando uma via de transdução de sinais, que levam a alterações da expressão gênica na célula alvo. A expressão de muitos receptores de citocinas é regulada por sinais específicos podendo ser uma outra citocina ou a mesma que se liga ao receptor. Podem ter ações pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas ou antagônicas e geralmente participam de um sistema de indução em cascata. Atuam como reguladores positivos ou negativos da resposta imune, inflamatória e reparadora do hospedeiro a lesões. Suas ações individuais na imunidade são complexas, uma vez que elas agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estádios de ativação (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Assim as citocinas podem ser geralmente caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatório) ou inibidores (antiinflamatório) (HAUSER, 1995), dependendo do subtipo de clone de linfócitos Th ativados.

A descoberta de duas populações de células T auxiliares (Th) CD4+, do tipo 1 e do tipo 2, derivadas da diferenciação de uma célula inicial comum (Th0) em camundongos e humanos, fornece algumas explicações para a expressão recíproca da resposta imune humoral e da mediada por células. (MOSMANN *et al.*, 1986; DEL PRETE *et al.*, 1991). Quando ativadas por antígenos/células apresentadoras de antígenos (APC), as células Th1 produzem interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e linfotóxina (LT) (MOSMANN *et al.*, 1986; CHERWINSKI *et al.*, 1987; COFFMAN *et al.*, 1988; MOSMANN; COFFMAN, 1989a; MOSMANN; COFFMAN, 1989b). As citocinas Th1 estão freqüentemente

associadas com resposta mediada por células, particularmente apropriada para destruir células infectadas por patógenos intracelulares. Também é responsável pela hipersensibilidade tardia e ativação das células T citotóxicas, e ainda pela produção de anticorpos opsonizantes. Estes anticorpos são capazes de revestir uma partícula, por exemplo, uma bactéria, favorecendo a sua fagocitose pelas células fagocíticas do sistema imune (citado por STITES; TERR; PARSLOW, 2000). Em contraste, as citocinas Th2 as quais incluem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (CHERWINSKI *et al.*, 1987; BROWN *et al.*, 1989), inibem as respostas mediadas por células, mas estimulam respostas de anticorpos promovendo a produção de quantidades relativamente elevadas de IgM, IgE, e isotipos IgG não ativadores do complemento; também estimulam a ativação e diferenciação de eosinófilos e atuam nas reações alérgicas (STITES; TERR; PARSLOW, 2000). Um terceiro tipo de célula T já foi identificado: células Th3 CD4+ que secretam TGF- $\beta$ , mas não secretam IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 ou IL-10, e parecem ser o único subtipo de célula T que apresenta função de Th nas mucosas e regulação negativa de células Th1 e de outras células do sistema imune (MOSMANN; SAD, 1996; RAGHUPATHY, 2001).

A secreção das diferentes citocinas contribui de forma eficaz para as diferenças entre os subtipos de células T. Assim, a regulação das respostas humoral e celular pode ser explicada em parte, pela regulação cruzada da diferenciação e ativação das células Th1 e Th2 no decorrer de uma resposta imune.

### 2.3.2 A Citocina IL-6 e o Gene *IL6*

A Interleucina-6 (IL-6) foi primeiramente descrita como Interferon-beta-2 (IFNB2). Tosato *et al.* (1988) identificaram um fator derivado de monócito o qual promovia o crescimento de células B infectadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV), demonstrando tratar-se do IFNB2 que então passou a ser conhecido como IL-6.

A IL-6 é geralmente considerada uma citocina pró-inflamatória, mas também possui propriedades anti-inflamatórias, como demonstrado em camundongos *knock-out* para o gene *IL6* (XING *et al.*, 1998).

### 2.3.2.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene *IL6*

O gene *IL-6* localiza-se no cromossomo humano 7 em 7p21 (CHEN *et al.*, 1987; FERGUNSON-SMITH, 1988) e consiste de 5 éxons e 4 íntrons (Figura 3). Transcreve para mRNA de 1,3-kb e traduz para uma proteína de 26-kDa, denominada IL-6, que é uma citocina multifuncional com peso molecular variando entre 22.000 e 30.000, devido em parte, a variações no grau de glicosilação e fosforilação de um único polipeptídeo (STITES *et al.*, 2000).

FIGURA 03 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *IL6* NO CROMOSSOMO 7



FONTE: Entrez Pubmed

Uma variedade de células, incluindo macrófagos e linhagens de células mielomonocíticas, hepatócitos, células T em repouso, células B ativadas ou infectadas pelo (EBV) e linhagens de plasmócitos expressam sítios de ligação de alta afinidade da IL-6 com  $K_d$  de  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$  M. As células alvo expressam  $10^2$  a  $10^4$  receptores para IL-6. O receptor consiste em duas cadeias de glicoproteína: a cadeia  $\alpha$  do IL-6R, com PM de 80.000, não possui o domínio citoplasmático e liga-se à IL-6 com baixa afinidade. O complexo resultante do IL-6R $\alpha$  com a IL-6 é então ligado com alta afinidade com a cadeia  $\beta$  do IL-6R (gp130), com PM de 130.000, que transduz um sinal para o citoplasma (BOULANGER *et al.*, 2003). A cadeia  $\beta$  do IL-6R funciona como uma subunidade transdutora de sinal comum a outras citocinas, entre elas a IL-11 e o LIF (fator inibidor de leucemia), podendo explicar a superposição observada nas atividades biológicas de citocinas estruturalmente diferentes. A expressão da IL-6 pode ser induzida em uma ampla variedade de células em resposta a vários estímulos, incluindo citocinas, produtos bacterianos e infecção viral (LE; VILCEK, 1989; KISHIMOTO *et al.*, 1992).

### 2.3.2.2 Polimorfismos e níveis de expressão do gene *IL6*

Observa-se a presença de uma variação polimórfica na região flanqueadora 5' do gene *IL6* na posição -174, onde dois alelos diferentes podem ser identificados (alelos G e C), resultando em três possíveis genótipos: G/G, G/C e C/C. Estas variações são funcionalmente importantes, porque influenciam a taxa de transcrição do gene e conseqüentemente, a concentração plasmática da proteína IL-6.

O mecanismo através do qual -174 G/C influencia o nível plasmático de IL-6 permanece controverso. Alguns pesquisadores, investigando diversas doenças, relatam um aumento no nível sérico de IL-6 associado com os genótipos G/G e G/C, comparado com o genótipo homozigoto C/C (FISHMAN *et al.*, 1998; REVIRON *et al.*, 2001; FLEX *et al.*, 2002; POLA *et al.*, 2002). Contudo, outros estudos demonstram um aumento no nível sérico de IL-6 associado com o genótipo homozigoto C/C, comparado com os genótipos G/G e G/C (BRULL *et al.*, 2001; KIPLINEN *et al.*, 2001; OLIVIERI *et al.*, 2002; REA *et al.*, 2003).

### 2.3.3 O Fator Transformante de Crescimento $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e o Gene *TGFB1*

O TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional que possui múltiplas formas (BARNARD *et al.*, 1990). Ela foi primeiramente descrita em murinos por De Larco e Todaro (1978) em linhagens celulares de sarcoma transformado por vírus. Os mesmos autores também foram os primeiros a caracterizá-la em extratos de placenta humana purificada.

Cinco isoformas foram identificadas, mas apenas as três primeiras TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3, com 70% a 76% de seqüências homólogas entre si são expressas em mamíferos. TGF- $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 são importantes reguladores da diferenciação celular e afetam o desenvolvimento e a embriogênese, enquanto os efeitos do TGF- $\beta$ 1 estão mais relacionados com o processo da inflamação.

#### 2.3.3.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene *TGFB1*

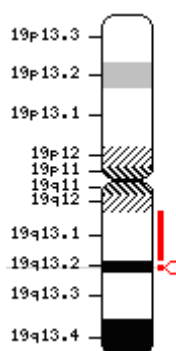
O gene que codifica o TGF- $\beta$ 1 pertence a uma grande família gênica com papel no crescimento, diferenciação e migração celular, assim como, na formação



da matriz extracelular (ECM) e na regulação da expressão de moléculas de superfície. Os genes para cada isoforma do TGF- $\beta$  nos mamíferos estão localizados em diferentes cromossomos, mas têm a mesma organização genômica, com sete éxons em posições homólogas. Análises de seqüências, para as regiões promotoras das três isoformas do TGF- $\beta$ , revelam pouca homologia e sugerem regulação diferencial da sua expressão (ROBERTS; SPORN, 1992).

O gene humano (*TGFB1*) que codifica o TGF- $\beta$ 1 está localizado no cromossomo 19 (Figura 4), em 19q13 (FUJII *et al.*, 1986). O seu promotor contém sítios de ligação para AP-1, NF-1, e Sp1 e regiões ricas em GC, mas não possui uma seqüência consenso TATA (KIM *et al.*, 1989b). Todas as posições são definidas com relação ao seu principal sítio de início de transcrição (posição +1). As primeiras +840 bases são uma região não transcrita e o códon 1 começa na posição +841 (KIM *et al.*, 1989a).

FIGURA 04 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *TGFB1* NO CROMOSSOMO 19



FONTE: Entrez Pubmed

As moléculas protéicas de TGF- $\beta$  são homo ou heterodímeros compostos de subunidades de 12,5 kDa, secretadas pela célula como complexos precursores latentes, que são clivados por proteases exógenas e dessa forma ativados (WAKEFIELD *et al.*, 1988). A forma biologicamente ativa é composta por 110 a 140 aminoácidos altamente conservados (MASSAGUE, 1990; KINGSLEY, 1994).

As citocinas da família TGF- $\beta$  compartilham uma estrutura tridimensional semelhante.

Os receptores para TGF- $\beta$  estão amplamente distribuídos na membrana e

são expressos pela maioria dos tipos celulares. Foram identificados três tipos, os quais foram nomeados tipos I, II e III, baseados nos seus tamanhos aproximados de 53, 70 a 80, e 200 a 300 kDa, respectivamente (MASSAGUE, 1990; LIN e LODISH, 1993; ATTISANO *et al.*, 1994). Os receptores do tipo I e II são proteínas transmembrânicas, com uma região extracelular relativamente pequena, rica em cisteína, uma hélice transmembrânica hidrofóbica e um domínio citoplasmático com atividade serina-treonina quinase. O receptor tipo II, que tem constitutivamente atividade de quinase, fosforila e ativa o receptor tipo I, que então propaga os sinais para os substratos intracelulares. Muitas células também expressam o receptor tipo III, também conhecido como betaglicano, que é um proteoglicano com um grande domínio extracelular, um único domínio transmembrânico e uma curta cauda citoplasmática sem motivo conhecido.

#### 2.3.3.2 Biossíntese e função biológica do TGF- $\beta$ 1

O TGF- $\beta$  é reconhecido primeiramente por sua variedade de ações imunossupressivas sobre as várias linhagens de leucócitos, e a deficiência desta citocina pode levar a uma patologia inflamatória grave e à morte (SHULL *et al.*, 1990). Também inibe a expressão de moléculas MHC classe II e aumenta a atividade do TNF, IFN- $\gamma$  e linfotoxina (LT) (TSUNAWAKI *et al.*, 1988). Muitas células normais expressam TGF- $\beta$  constitutivamente, e produzem-no em maiores quantidades quando estimuladas. Estas incluem plaquetas, macrófagos, linfócitos T e B, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, astrócitos e células microgliais. O TGF- $\beta$  suprime o sistema imune ao nível sistêmico, mas estimula a resposta inflamatória em nível local, e pode suprimir a proliferação e diferenciação dos linfócitos T e B e monócitos (MASSAGUE, 1990; KHERL *et al.*, 1991). Inibe a síntese mitogênica induzida de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, GM-CSF e TNF, suprime a hematopoese pela inibição da célula tronco e regula os receptores para SCF, IL-3 e GM-CFS nas células hematopoéticas (YELEVARTHI e HUNT, 1993). No sítio inflamatório, induz a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos (REIBMAN *et al.*, 1991; WAHL *et al.*, 1993), ativando essas células a produzirem citocinas inflamatórias (IL-1, TNF, IL-6) e aumentando a adesão leucocitária à parede dos vasos e matriz extracelular (WAHL, 1992).

### 2.3.3.3 Polimorfismos e níveis de expressão do gene *TGFB1*

A produção do TGF- $\beta$ 1 está sob controle genético e a variação individual nos níveis de produção do mesmo é influenciada pela existência de variações genéticas. Foram identificados cinco tipos de variações polimórficas no gene *TGFB1*: duas na região do promotor, nas posições -800 (G/A) e -509 (C/T); uma na posição +72 (inserção de C), em uma região não transcrita; e duas na seqüência sinal no primeiro éxon, nas posições +869 (T/C) e +915 (G/C), os quais foram analisados neste estudo. A mutação na posição +869 determina uma mudança do aminoácido leucina para prolina no códon 10, enquanto a da posição +915 altera o códon 25, substituindo a arginina para prolina (Quadro 3). Uma pessoa será considerada alta produtora de TGF- $\beta$ 1 se o códon 10 traduzir para o aminoácido leucina, e o códon 25 para a arginina. Ao contrário, para ser baixa produtora, deverá traduzir para prolina em ambos os códons (PERREY *et al.*, 1998). Em termos gerais, para uma população caucasóide, pode-se atribuir o estado de alto, intermediário e baixo produtor de TGF- $\beta$ 1, de acordo com os genótipos (PERREY *et al.*, 1998) (Quadro 4). AWAD *et al.* (1998) também estudaram a relação entre as variantes polimórficas de *TGFB1* e a produção de TGF- $\beta$ 1 por leucócitos de sangue periférico de 34 indivíduos saudáveis. Indivíduos com o genótipo homozigoto arginina/arginina no códon 25 tiveram uma média de produção de TGF- $\beta$ 1=10.037  $\pm$  745 pg/ml (alta produção), enquanto que os de genótipo prolina/arginina tiveram um valor médio de 6.729  $\pm$  883 pg/ml. De um modo geral a expressão do *TGFB1* é regulada nos níveis transcricional e pós-transcricional, dependendo do tipo celular e da isoforma específica, em resposta a uma variedade de estímulos externos.

A expressão do mRNA do *TFGB1* aumenta durante a fase secretória média do ciclo menstrual, alcança um pico máximo na fase secretória tardia e durante a gestação é semelhante ao nível observado na fase secretória média (VON WOLFF *et al.*, 2000).

QUADRO 03 - SNPs E AMINOÁCIDOS NAS POSIÇÕES +869 E +915 DO GENE *TGFB1*

<i>TGFB1</i>		
Posição	+869	+915
Códon	10	25
SNP	T ⇒ C	G ⇒ C
Aa	Leucina ⇒ Prolina	Arginina ⇒ Prolina

FONTE: Perrey *et al.*, 1998

QUADRO 04 - GENÓTIPOS, HAPLÓTIPOS E FENÓTIPOS PARA PRODUÇÃO DE TGF-β1 NAS POSIÇÕES +869 E +915

<i>TGFB1</i>		
Genótipos	Fenótipos	Haplótipos
<i>TG/TG</i>	Alto	<i>Leu/Leu Arg/Arg</i>
<i>TG/CG</i>	Alto	<i>Leu/Pro Arg/Arg</i>
<i>TG/CC</i>	Interm.	<i>Leu/Pro Arg/Pro</i>
<i>CG/CG</i>	Interm.	<i>Pro/Pro Arg/Arg</i>
<i>TG/TC</i>	Interm.	<i>Leu/Leu Arg/Pro</i>
<i>CG/CC</i>	Baixo	<i>Pro/Pro Arg/Pro</i>
<i>CC/CC</i>	Baixo	<i>Pro/Pro Pro/Pro</i>
<i>TC/TC</i>	Baixo	<i>Leu/Leu Pro/Pro</i>
<i>TC/CC</i>	Baixo	<i>Leu/Pro Pro/Pro</i>

FONTE: Perrey *et al.*, 1998

#### 2.3.4 A Interleucina 10 (IL-10) e o Gene *IL10*

Em 1988, Fiorentino *et al.* (1989) descreveram uma substância presente no sobrenadante de células Th2, que tinha a capacidade de inibir a produção de citocinas por células Th1 em cultura. Tal substância foi denominada Fator Inibidor da Síntese de Citocinas. A denominação "interleucina-10" foi proposta, uma vez que as análises imunológicas e bioquímicas indicaram que o Fator Inibidor da Síntese de Citocinas era uma nova citocina (MOORE *et al.*, 1990).

### 2.3.4.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene *IL10*

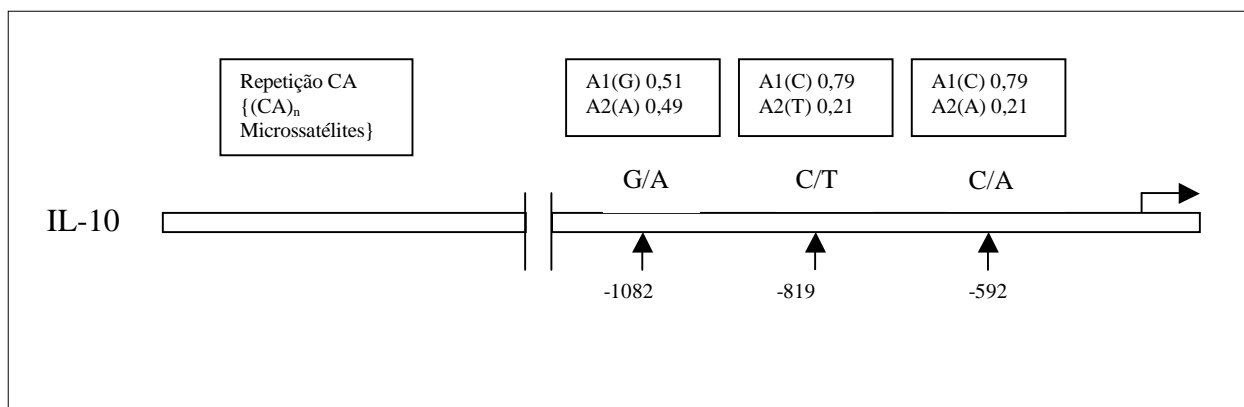
O gene *IL10* contém cinco éxons e localiza-se no cromossomo 1 (Figuras 5 e 6) entre 1q31 e 1q32 (ESKDALE *et al.*, 1997) ocupando aproximadamente 5,1 kb (KIM *et al.*, 1992).

FIGURA 05 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *IL10* NO CROMOSSOMO 1



FONTE: Entrez Pubmed

FIGURA 06 - ESTRUTURA DO GENE *IL10*



A estrutura primária da IL-10 do camundongo (mIL-10) e humana (hIL-10) foi determinada pela clonagem de cDNAs que codificam as citocinas (MOORE *et al.*, 1990; VIEIRA *et al.*, 1991). A IL-10 é constituída por quatro cadeias polipeptídicas do tipo  $\alpha$ -hélice. É uma estrutura homodimérica covalentemente associada, com 18 kDa, sem carboidratos detectáveis, semelhante ao interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (VIEIRA *et al.*, 1991; WALTER e NAGABHUSHAN, 1995; WALTER

*et al.*, 1995; ZDANOV *et al.*, 1995; ZDANOV, SCHALK-HIHI e WLODAWER, 1996; ZDANOV *et al.*, 1997; SYTO *et al.*, 1998) .

A proteína IL-10 exerce seus efeitos pleiotrópicos após a interação com o receptor específico para IL-10 que é expresso em pequeno número em células responsivas à IL-10 (LIU *et al.*, 1994; HO *et al.*, 1993).

A IL-10 se liga ao seu receptor, IL-10R1, de maneira homogênea com alta afinidade ( $k_d \sim 35\text{-}200$  pM. Assim como o IFN- $\gamma$ R e o IFN- $\alpha\beta$ R, o IL-10R1 utiliza uma subunidade acessória para a sinalização, IL-10R2 (BACH, AGUET e SCHREIBER, 1997; KOTENKO *et al.*, 2001). O IL-10R2 contribui pouco com a afinidade de ligação da IL-10; seu principal papel parece ser o recrutamento da quinase JAK (Tyk2) para o complexo de sinalização (KOTENKO *et al.*, 1997; SPENCER *et al.*, 1998 ). O IL-10R2 se expressa na maioria das células e tecidos (LUTFALLA, GARDINER; UZE, 1993; GIBBS e PENNICA, 1997).

#### 2.3.4.2 Biossíntese e função biológica da IL-10

Muito do que se conhece sobre IL-10 baseia-se em estudos com camundongos. Entre os clones de células T, a IL-10 é produzida após a estimulação antigênica, por células Th2 e Th0, mas não por células Th1 ou clones de células TCD8+ (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989; MOORE *et al.*, 1990; MOSMANN *et al.*, 1990; O'GARRA *et al.*, 1990). As células B humanas também produzem IL-10, especialmente após transformação pelo EBV (Vírus Epstein-Barr) (BENJAMIN, KNOBLOCH e DAYTON, 1992; BURDIN *et al.*, 1993). A IL-10 também é produzida por queratinócitos (RIVAS e ULLRICH, 1992; ENK e KATZ, 1992) e células dendríticas (IWASAKI e KELSALL, 1999; MCGUIRK *et al.*, 2002).

A IL-10 inibe a síntese de várias citocinas que são normalmente secretadas por monócitos/macrófagos ativados. Estas citocinas incluem IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, e IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF, LIF, e PAF (Fator ativador de plaquetas) (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991a; FIORENTINO *et al.*, 1991a; D'ANDREA *et al.*, 1993; DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1993; GRUBER, WILLIAMS e GERRARD, 1994).

Quando células Th1 são estimuladas por populações de células esplênicas ou macrófagos, a IL-10 bloqueia parcialmente a secreção de citocinas por estas células (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989). No entanto, células Th1 estimuladas por células apresentadoras de antígenos (APC) que não sejam os

macrófagos, por exemplo, células B, são resistentes aos efeitos da IL-10 (FIORENTINO *et al.*, 1991b). A produção de IL-10 por monócitos ativados por LPS, indica que a expressão da IL-10 pode ser regulada por “feedback” negativo nestas células. Dessa forma a secreção de IL-10 parece ser autolimitada (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991a) e a imunomodulação que afeta a expressão do gene da IL-10 acontece em nível transcricional (LE *et al.*, 1997).

A IL-10 inibe a expressão de antígenos MHC de classe II, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7), e CD86 (B7.2) em monócitos, mesmo após a indução destas moléculas por IL-4 ou IFN- $\gamma$ , reduzindo drasticamente a proliferação de células T antígeno-específicas (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991a,b; DING *et al.*, 1993; KUBIN, KAMOUN e TRINCHIERI, 1994). Ao contrário, a IL-10 estimula a expressão de Fc $\gamma$ RI (Receptor para a porção Fc da IgG) em monócitos humanos fato este correlacionado com o aumento da capacidade de monócitos/macrófagos fagocitarem partículas opsonizadas, bactérias ou fungos (CAPSONI *et al.*, 1995; SPITTLER *et al.*, 1995).

Células dendríticas humanas e murinas são definidas pela sua capacidade de ativar células T em repouso e iniciar uma resposta imune (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Em geral, os efeitos da IL-10, sobre as células dendríticas, são consistentes com inibição da resposta inflamatória Th1, e podem ser desencadeados pelo efeito inibitório sobre as “células dendríticas indutoras da inflamação” ou pela indução de células T antiinflamatórias estimuladas pelas “células dendríticas produtoras de IL-10” (MOORE *et al.*, 2001).

De modo oposto, a IL-10 estimula a resposta imune Th2, que inclui a produção de IL-4 e IL-5, que atuam na proliferação e diferenciação de células B (MOSMANN e COFFMANN, 1989a).

A inibição das células Th1 pela IL-10 parece ser mediada via inibição da síntese de IL-12, um co-estimulador que é necessário para a produção de citocinas Th1 em culturas mistas de células T e macrófagos (GERMANN, PARTENHEIMER e RUDE, 1990).

A presença da base nitrogenada A na posição -1082 foi correlacionada com baixa produção da IL-10 após estimulação de células T *in vitro* (TURNER *et al.*, 1997). Esta variante parece ter aplicabilidade clínica, visto que alguns alelos da região promotora podem determinar baixa, intermediária ou alta produção de IL-10 (ESKDALE *et al.*, 1998).

### 2.3.5 O Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o Gene *TNF*

No final do século XIX, William B. Cooley, um cirurgião do Hospital Memorial de Nova Iorque, juntamente com seus colaboradores, observaram que o desaparecimento de tumores malignos algumas vezes coincidia com o desenvolvimento de uma infecção bacteriana. A partir desta constatação, postulou-se que agentes infecciosos ou seus produtos poderiam, em alguns casos, combater o câncer. Algumas evidências sugeriram que a bactéria não eliminaria o tumor diretamente, mas contribuiria indiretamente, estimulando outros mecanismos fisiológicos capazes de provocar a regressão de um tumor cancerígeno (OLD, 1988).

Shear *et al.*, em 1943 (apud OLD, 1985), identificaram e purificaram o componente ativo das bactérias Gram-negativas, um lipopolissacarídeo (LPS), também chamado de endotoxina, que é um componente da parede celular bacteriana. O LPS foi considerado uma substância modelo que mimetiza as atividades biológicas observadas na septicemia (RIETSCHEL *et al.*, 1994).

Camundongos e coelhos foram tratados com o Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), resultando na liberação de uma substância/fator que produzia hemorragia e necrose em tumores, tendo sido denominada de "fator de necrose tumoral" (TNF) (CARSWEL *et al.*, 1975).

A caquexina, fator produzido por macrófagos ativados, conhecida por causar febre e fraqueza, inibe a lipoproteinase crucial para o armazenamento da gordura e está ausente em indivíduos caquéticos. A descoberta que a caquexina é idêntica ao TNF, demonstrou a importância dos membros desta família em doenças humanas (BEUTLER, MILSARK, e CERAMI 1985; BEUTLER e CERAMI, 1986). Esta toxicidade sistêmica, tanto do TNF quanto da linfotóxina-alfa (LT) e seus receptores, atuando como agentes antitumorais têm levado à investigações sobre a defesa do hospedeiro, inflamação, apoptose, autoimunidade e organogênese (LOCKSLEY, KILLEEN e LENARDO, 2001).



### 2.3.5.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene *TNF*

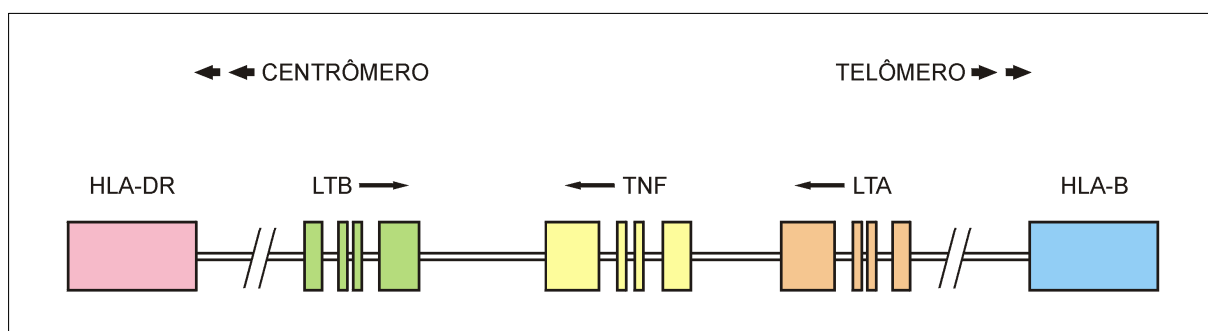
A família *TNF* inclui os genes: *LTB*, clonado por BROWNING *et al.* (1993), que codifica a linfotóxina- $\beta$ , *TNF* (anteriormente *TNF- $\alpha$* , *TNF-A*), que codifica a citocina TNF, e *LTA* (anteriormente referido como *TNFB*, *TNF- $\beta$*  e *LT- $\alpha$* ), que codifica a LT. Esses genes posicionam-se em tandem, ocupando um segmento de aproximadamente 7 kb na região de classe III do MHC (NEDWIN *et al.*, 1985; SHIRAI *et al.*, 1985; RINK e KIRCHNER, 1996) (Figura 7). O gene *TNF* é flanqueado pelos genes *LTB* e *LTA* (Figura 8).

FIGURA 07 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *TNF* NO CROMOSSOMO 6



FONTE: Entrez Pubmed

FIGURA 08 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA REGIÃO DO MHC NO CROMOSSOMO 6 ONDE SITUAM-SE OS LOCOS *TNF-LTA*



NOTA: Modificado de RINK, L.; KIRCHNER, H. Recent progress in the tumor necrosis factor- $\alpha$  field. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.111, p.199-209, 1996

Na região promotora do gene *TNF*, foram descritas em populações européias, na posição -308, substituições de guanina (alelo *TNF*\*-308G ou *TNF*\*1) por adenina (alelo *TNF*\*-308A ou *TNF*\*2). Este último alelo, menos freqüente, tem sido associado com alta produção da citocina TNF. Taxas estáveis de produção inter-individuais de TNF têm sido demonstradas bem como a associação com alelos *HLA-DR*.

A família gênica *TNF* assemelha-se em organização genômica, estruturando-se cada um dos genes em quatro éxons e três íntrons, compreendendo individualmente segmentos genômicos de 2,7 a 3,6 kb, com diferentes seqüências flanqueadoras nas extremidades 5' e 3', que ligam diferentes fatores transcricionais, o que se reflete em expressão gênica distinta (NEDWIN *et al.*, 1985; OLIFF, 1988; ECONOMOU *et al.*, 1989).

TNF é sintetizado inicialmente como um polipeptídeo de 26 kDa e 233 aminoácidos com uma pré-seqüência de 76 aminoácidos que é clivada por metaloproteinases altamente específicas, algumas horas depois de estar ancorado na membrana celular. Sem a pré-seqüência, seu peso molecular é 17 kDa e possui 157 resíduos de aminoácidos. Assim sendo, pode apresentar-se nas formas solúvel ou ligada à membrana (forma não processada com 233 aminoácidos e 26 kDa). Na forma biologicamente ativa é um homotrímero cuja massa molecular é 52 kDa, apresentando formato de cone triangular ou piramidal onde cada lado é formado por uma diferente subunidade monomérica. Os sítios de ligação aos receptores situam-se na metade inferior da estrutura piramidal, o que permite a ligação simultânea com mais de um receptor (NEDWIN *et al.*, 1985; JONES *et al.*, 1989).

Dois receptores de membrana para o TNF, denominados TNF-RI e TNF-RII, foram identificados molecularmente. Estas duas proteínas, com distintos pesos moleculares (55 kDa e 75 kDa, respectivamente), têm homologias significativas em seus domínios extra-celulares com seqüências ricas em cisteína (TARTAGLIA e GOEDDEL, 1992; GRELL *et al.*, 1995).

Particularmente em células T, TNF é a primeira citocina produzida após ativação, seguida por muitas outras. O envolvimento do TCR na indução do processamento do RNA pré-mensageiro de TNF, pode também intensificar outros níveis de regulação, incluindo transcrição, estabilidade do RNA, tradução e eventos pós-traducionais, conduzindo a uma apurada expressão do *TNF* (YANG *et al.*, 1998).

### 2.3.5.2 Biossíntese e função biológica do TNF

As células mais importantes, relacionadas à biossíntese do TNF, são os monócitos e os macrófagos ativados (CARSWELL *et al.*, 1975), mas o TNF também pode ser sintetizado por outros tipos de células, incluindo mastócitos (RICHARDS *et al.*, 1988; STEFFEN *et al.*, 1989; GORDON e GALLI, 1990), basófilos (STEFFEN *et al.*, 1989; OHNO *et al.*, 1990), eosinófilos (TAKANASKI *et al.*, 1994), células NK (PETERS *et al.*, 1986), células T e B (KOBAYASHI, ASADA e OSAWA, 1987).

Em termos evolutivos, o sistema imune de vertebrados difere dos invertebrados pela presença do sistema imune adaptativo, no qual o TNF tem um papel central. Tal fato envolveu a aquisição de dois genes ativadores de recombinação, *RAG1* e *RAG2*, há aproximadamente 450 milhões de anos, e que se expressam exclusivamente em linfócitos. Esses genes propiciaram mecanismos somáticos, que mediaram recombinações e mutações, que culminaram com o imenso repertório de receptores em linfócitos T e B. No entanto, tais linfócitos não podem atuar individualmente, e o TNF é um dos responsáveis por estimulá-los para que os mesmos respondam a estímulos antigênicos. Esta citocina participa dos eventos inflamatórios e imunológicos, estando relacionada a uma potente atividade imunomoduladora (STITES, TERR e PARSLOW, 2000).

A resposta imune ocorre efetivamente em órgãos linfóides secundários. O TNF tem também um papel distinto na organização e organogênese de tecidos linfóides secundários, tais como o baço e placas de Peyer (GUO *et al.*, 1999). A hierarquia temporal, do desenvolvimento do tecido linfóide, coloca em evidência a LT como participante essencial da organogênese do tecido linfóide, precedida pelo TNF que tem um papel mais abrangente na promoção de uma correta organização dos linfócitos em linfonodos e baço (KORNER *et al.*, 1997). Nos órgãos linfóides, os folículos e centros germinativos constituídos por agregados celulares, principalmente células B, mas também células T e células dendríticas foliculares (células mesenquimais que coletam os antígenos nos linfonodos de drenagem), interagem com clones de células B, e formam uma rede nos folículos, sob a influência de citocinas, como o TNF e LT (FU e CHAPLIN, 1999). Assim, um

processo seqüencial ordenado, orquestrado pelo TNF, promove interações entre células hematopoéticas e mesenquimais e estabelece restrição espacial, essencial para a definição dos órgãos linfóides (KORNER *et al.*, 1997).

Ao TNF têm-se atribuído propriedades anticancerígenas pelos efeitos citolíticos e/ou citostáticos diretos sobre as células tumorais (CARSWELL *et al.*, 1975).

O TNF também era conhecido como caquexina, baseado em experimentos realizados em coelhos infectados por parasitas. Os resultados mostraram que esses animais desenvolviam uma grave perda de peso associada com hipertrigliceridemia e deficiência de lipoproteína-lipase (LPL), uma enzima envolvida na hidrólise de triglicerídeos. Esse quadro clínico é conhecido como caquexia (BEUTLER *et al.*, 1985).

O TNF parece ser primariamente responsável por um fenômeno, conhecido como reação hemorrágica de Shwartzman, em que duas injeções sucessivas de LPS bacteriano, administradas a intervalo de 24 horas no mesmo local do tecido, produzem coagulação localizada e necrose tecidual. Esta reação ocorre porque a secreção do TNF pelos macrófagos, induzida pelo LPS, pode estimular as células endoteliais a produzirem prostaglandinas, IL-6 e uma proteína denominada fator pró-coagulante (ou fator tecidual III), que tem a capacidade de iniciar a cascata da coagulação. Esses efeitos locais de coagulação e inflamação bloqueiam o suprimento sanguíneo e podem ser responsáveis pela capacidade do TNF de causar infartos e necrose hemorrágica de tumores - a propriedade que levou à sua descoberta (STITES, TERR e PARSLOW, 2000). Em sinergia com outras citocinas, tais como IL-1, o TNF participa da inflamação aguda e dos danos microvasculares incluindo a coagulação intravascular, estimulação da adesão de neutrófilos e monócitos em células endoteliais, e na síntese do PAF e da prostaglandina-12 (PG-12). A formação de trombos ocorre pela atividade pró-coagulante de TNF, inibindo a proteína C e a trombomodulina (proteínas anticoagulantes), e conseqüentemente bloqueando a dissolução da fibrina (MANTOVANI *et al.*, 1997).

O IFN- $\gamma$  aumenta a expressão de genes *HLA* de classe II em uma variedade de tipos celulares em humanos e camundongos, e faz parte de um conjunto de interações entre citocinas em eventos imunológicos. Em vista disso,

TNF tem efeitos similares e aditivos em vários modelos *in vitro*. *In vivo*, TNF e IFN- $\gamma$  são dependentes um do outro (WATANABE e JACOB; 1991). O efeito sinérgico ou antagônico entre TNF e IFN- $\gamma$  depende do estágio de diferenciação e maturação celular. TNF pode tanto intensificar como inibir a expressão de moléculas HLA de classe II induzida por IFN- $\gamma$ . Em diferentes culturas de linhagens celulares mielóides (células U937), TNF induz fortemente a expressão de *HLA-DR*, enquanto que o efeito de IFN- $\gamma$  é fraco. Ao contrário, a combinação dessas duas citocinas pode levar a uma fraca indução de *HLA-DR*. Esta observação sugere que, pelo menos neste sub-conjunto de células, o IFN- $\gamma$  deve ter um efeito inibidor na indução da expressão de *HLA-DR* provocada pela atividade de TNF (WILLHEIM *et al.*, 1995).

Além de intensificar a expressão de moléculas HLA de classe II, TNF, LT e IFN- $\gamma$  podem aumentar a expressão de moléculas HLA de classe I de superfície celular de células endoteliais (JOHNSONS e POBER; 1990).

Estudos também demonstraram que o TNF exógeno aumenta a síntese de DNA em células sob ativação de um agente mitogênico. Posteriormente, níveis elevados de TNF foram observados em leucemia linfocítica crônica, na ativação policlonal de células B induzida pelo vírus HIV e na produção de imunoglobulinas induzida pela IL-4 e moléculas CD40. O TNF autócrino em células B ativadas tem um importante papel em infecções relacionadas com a expansão policlonal de células B, bem como em proliferações malignas onde os linfócitos B estão envolvidos (BOUSSIOTIS *et al.*, 1994).

A aplicação terapêutica de TNF tem sido investigada em muitas doenças, embora muitas pesquisas estejam sendo limitadas pela alta taxa de efeitos colaterais provocados pelo próprio TNF (EIGLER *et al.*, 1997).

O papel do TNF na inflamação aguda ilustra como o mesmo atua nas mudanças celulares e na dinâmica recomposição tecidual. Atuando durante um processo infeccioso, vários tipos de células são recrutados até o sítio inflamatório, e quando o processo infeccioso é contido, é essencial que a homeostasia tecidual normal seja restabelecida (LOCKSLEY, KILEEN e LENARDO, 2001).

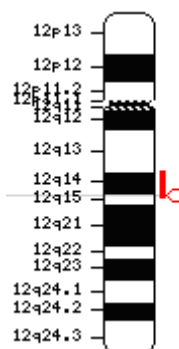
### 2.3.6 O Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) e o Gene *IFNG*

Em 1965 Wheelock reportou que a fitohemaglutinina poderia produzir um inibidor viral, semelhante ao interferon, que foi denominado interferon- $\gamma$ , o qual, atuando como uma molécula pró-inflamatória e imunorreguladora afeta todos os componentes da resposta imune. Seu campo de ação inclui a estimulação ou inibição das funções celulares constitutivas, a indução de novas funções efetoras, propriedades proliferativas e anti-proliferativas, e alterações em produtos celulares secretados e associados às membranas. O efeito regulatório é dependente de dose, do tempo de exposição, e da presença ou ausência de outros mediadores inflamatórios (WILLIAMS *et al.*, 1993).

#### 2.3.6.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene *IFNG*

O *IFNG* é um gene de cópia única localizado no cromossomo 12 humano (Figura 9), em 12q14 (TRENT, OLSON e LAWN, 1982; NAYLOR *et al.*, 1983). A estrutura do DNA genômico, primeiramente relatada por Gray e Goedel em 1982, é altamente conservada, sendo constituída por quatro éxons e três íntrons. Esta estrutura observou-se em todas as espécies analisadas, e a análise da seqüência de DNA tem mostrado maior identidade na seqüência promotora do DNA do que na região codificadora da proteína. O cDNA do IFN- $\gamma$  e/ou o DNA genômico têm sido clonados em muitas espécies, inclusive a humana (DERYNCK *et al.*, 1982; DEVOS *et al.*, 1982).

FIGURA 09 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *IFNG* NO CROMOSSOMO 12



FONTE: Entrez Pubmed

A proteína humana é constituída por 166 aminoácidos, dos quais 23 representam uma seqüência sinal hidrofóbica. Há dois sítios de glicosilação e a proteína parece existir funcionalmente como um homodímero não-covalente (RINDERKNECHT, CONNNOR e RODRIGUEZ, 1984).

O gene que codifica o receptor do IFN- $\gamma$  está localizado no cromossomo 6 (RASHIDBAIGI *et al.*, 1986) e resulta numa cadeia polipeptídica que participa da ligação do receptor. Uma segunda cadeia é necessária para a transdução do sinal e provavelmente proteínas adicionais são necessárias para certas atividades do IFN- $\gamma$  (SOH *et al.*, 1994). O mecanismo pelo qual o IFN- $\gamma$  induz a expressão de genes tem sido foco de muitas pesquisas. A ligação deste ao receptor, seguido de ativação gênica depende de tirosina quinases (WATLING *et al.*, 1993; MULLER *et al.*, 1993; SHUAI *et al.*, 1993).

#### 2.3.6.2 Biossíntese e função biológica do IFN- $\gamma$

O IFN- $\gamma$  é produzido em larga escala principalmente por células T e grandes linfócitos granulares (LGL) (KASAHARA *et al.*, 1983a; KASAHARA *et al.*, 1983b; YOUNG e ORTALDO, 1987), cuja produção pode ser significativamente aumentada pelo tratamento com IL-12 (WU *et al.*, 1993). Nas células T CD4+, o principal estímulo fisiológico para a produção de IFN- $\gamma$  é o antígeno no contexto do MHC de classe II. Similarmente, as células T CD8+ produzem IFN- $\gamma$ , quando o antígeno está presente no contexto do MHC de classe I (YOUNG e HARDY, 1995).

O IFN- $\gamma$  atua de diversas maneiras sobre as células B. Inibe a proliferação celular induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (ABED *et al.*), e a indução de moléculas MHC de classe II (MOND *et al.*, 1986) suprime a produção de IgG1 e IgE, e aumenta a síntese de IgA2 (SNAPPER, PESCHEL e PAUL, 1988; ABED *et al.*, 1994). O IFN- $\gamma$  tem se mostrado um potente fator de sobrevivência das células B em cultura de células obtidas de pacientes com leucemia linfocítica crônica, tendo portanto, efeitos antiapoptóticos (BUSCHLE *et al.*, 1994).

O IFN- $\gamma$  é o principal fator de ativação de macrófagos na circulação, ativando numerosas funções, incluindo a citotoxicidade a tumores (PACE *et al.*, 1983), atividade antimicrobiana (NATHAN *et al.*, 1983), aumenta o potencial microbicida contra patógenos intracelulares (TORRICO *et al.*, 1991) e estimula a

apresentação de antígenos aos linfócitos através da indução de moléculas MHC de classe II (BASHAM e MERIGAN, 1983; KELLER *et al.*, 1988).

Em suma, o IFN- $\gamma$  é crítico para subsequente estimulação ou ativação da expressão gênica, diferenciação e função de monócitos/macrófagos. Estes efeitos, juntamente com a importância de monócitos/macrófagos como fontes de IL-12 (potente indutor de IFN- $\gamma$ ), demonstram o papel crítico que a população de linfócitos tem na regulação da resposta imune (YOUNG e HARDY, 1995).

O desenvolvimento dos linfócitos Th2 CD4+ é diretamente influenciado pela expressão diferencial tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4. O IFN- $\gamma$  suprime eficazmente o crescimento de células Th2 CD4+, produtoras de IL-4 (GAJEWSKI e FITCH, 1988), e pode atuar como um fator de crescimento autócrino, juntamente com a IL-12, para o crescimento e diferenciação de populações de células Th1 CD4+ (PAUL e SEDER, 1994).

O IFN- $\gamma$  se mostrou importante para a apoptose de células T em resposta aos anticorpos anti-CD3 na ausência de células acessórias. Assim, dependendo da expressão das citocinas em um microambiente localizado, o IFN- $\gamma$  pode ter efeitos opostos sobre populações específicas de células T; o IFN- $\gamma$  por si só, induz apoptose, mas, em combinação com outros estímulos, pode resultar em proliferação e diferenciação (STITES, TERR e PARSLOW, 2000).

### 2.3.7 Citocinas e HPV

As células do epitélio estratificado e os queratinócitos são as principais fontes de citocinas no trato genital (SCHRODER, 1995). As citocinas exercem sua ação através de receptores específicos, os quais podem estar expressos de várias formas nas células infectadas por HPV, ou podem ser liberados para o espaço extracelular e daí para a microcirculação. Estas formas solúveis de receptores de citocinas podem afetar significativamente a atividade imunorregulatória das citocinas, não apenas interferindo em processos imunes e inflamatórios, mas também regulando a proliferação, a diferenciação celular e a apoptose (ABBAS *et al.*, 2000).

A capacidade de secretar diferentes níveis de citocinas, herdada geneticamente, parece ser relevante na resposta imune contra a infecção pelo



HPV e na oncogênese das lesões cervicais (HUTCHINSON *et al.*, 1999).

A secreção de citocinas na mucosa cervical é influenciada por diversos fatores endógenos e exógenos, que podem interferir na história natural da infecção pelo HPV (GRAVITT *et al.*, 2003; SCOTT *et al.*, 2006). Em uma análise multivariada, níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 foram significativamente ( $p < 0,05$ ) associados com várias variáveis, incluindo a infecção ativa pela *Chlamidia trachomatis*, relação sexual recente e uso de anticoncepcional oral. Níveis diminuídos de IL-4 e IL-10 foram associados com consumo de cigarro nas últimas 24 horas (SCOTT *et al.*, 2006).

Vários estudos sugerem que níveis diminuídos de citocinas Th1 e aumentados de Th2 estão associados com o desenvolvimento do CC, mas resultados variados e às vezes controversos foram publicados.

Além disso, a produção de IL-2 em lesões pré-invasivas diminui com aumento da gravidade da doença (TSUKUI *et al.*, 1996). Um desvio do padrão Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) para o Th2 (IL-4 e IL-10) foi associado com pior prognóstico para pacientes com lesões cervicais associadas ao HPV (CLERICI *et al.*, 1997).

A polarização em direção ao padrão Th2 explica a resposta imune celular deficiente contra HPV e neoplasias, e parece facilitar a progressão tumoral, porque o desvio em direção a Th2 estimula a resposta humoral e inibe a resposta celular (MOTA *et al.*, 1999). Estudos relacionaram a regressão das verrugas com o padrão Th1 (IL-2, IFN- $\alpha$  e TNF), enquanto baixos níveis de IFN- $\alpha$  foram associados com carcinoma de colo uterino com pior prognóstico (TARTOUR *et al.*, 1998). A IL-10 bloqueia síntese de citocinas pelas células Th, monócitos ativados e células NK (RAFIQ *et al.*, 2001). A diminuição da atividade das células NK foi associada com reativação da infecção latente por HPV (GARZETTI *et al.*, 1995). Lee *et al.* (2004) demonstraram que mulheres com lesões intra-epiteliais de alto grau tiveram uma diminuição na produção de citocinas Th1 pelas células T CD4+ ativadas, o que sugere um comprometimento da função citotóxica das células T CD8+.

A IL-6 está diminuída em secreções cérvico-vaginais de pacientes com NIC comparada aos controles (TIJONG *et al.*, 1999). Bais *et al.* (2005) encontraram níveis diminuídos de IFN- $\gamma$  e aumentados de IL-10, nos diferentes estádios das NIC para CC, sugerindo uma mudança de padrão de citocinas durante a carcinogênese em mulheres com NIC III. Azar *et al.* (2004) descreveram que o

nível de IL-10 nas secreções cervicais estava estatisticamente elevado em LSIL, e o nível de TNF nas secreções cervicais estava elevado em HSIL. Contudo em um estudo de Niwa *et al.* (2001), as concentrações de IFN- $\gamma$  no plasma de pacientes com CC e controles foram similares. Jacobs *et al.* (1998) também não encontraram diferenças em níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes com SIL e o grupo controle. SONG *et al.* (2007) não encontraram diferenças em níveis intralesionais de IL-6, IL-10, TNF e IFN- $\gamma$  entre mulheres infectadas com HPV de alto risco nos diversos graus histológicos, porém níveis elevados de IFN- $\gamma$  estavam associados com as oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16, indicando que esta citocina pode ser um marcador prognóstico de oncogenicidade.

#### 2.3.7.1 Polimorfismos dos genes de Citocinas e HPV

Nos últimos anos locos polimórficos de genes do sistema imune dentro e fora da região do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade) do inglês MHC (*Major Histocompatibility Complex*) têm sido identificados e podem ter efeito no desenvolvimento de doenças infecciosas (KWIATKOWSKI *et al.*, 2000; BELLAMY *et al.*, 1998). Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), nestes locos, alteram a resposta imune à infecção por alterar o equilíbrio entre a resposta imune humoral e a celular.

Há evidências de associação entre os polimorfismos de genes de citocinas e a NIC ao HPV (Tabela 1).

El Sherif *et al.* (2001) demonstraram que uma diminuição nos níveis epiteliais e subepiteliais de IFN- $\gamma$ , assim como um aumento no nível subepitelial de IL-10, podem ter um papel no desenvolvimento e progressão da lesão cervical associada ao HPV-16.

Stanczuk *et al.* (2001) avaliaram pacientes com câncer cervical e níveis de IL-10 e determinaram que estas pacientes parecem estar imunogeneticamente predispostas a produzir altos níveis desta citocina. Além disso, a prevalência de alelos associados à baixa produção de IL-10 foi menor nas mulheres com CC, quando comparadas com a de mulheres saudáveis, nas quais não foram observados alelos para alta produção de IL-10.

Kirpatrick *et al.* (2004) mostraram que mulheres com resposta pró-

inflamatória reduzida são mais susceptíveis à persistência viral e conseqüentemente ao desenvolvimento de neoplasia cervical. Eles investigaram os polimorfismos *TNFA* (-308 e -238) e encontraram uma freqüência maior do genótipo baixo secretor *TNFA* (-308G/G) em pacientes com neoplasia cervical quando comparada com a de controles.

Fernandes *et al.* (2004), em com amostra da população brasileira, concluíram que a presença do HPV-16 induz respostas permissivas à instalação e progressão das lesões cervicais, com níveis séricos aumentados de IL-10, mesmo nas mulheres imunogeneticamente predispostas às respostas de proteção às lesões precursoras do CC (portadoras de alelos para baixa produção de IL-10).

TABELA 01 - CITOCINAS RELACIONADAS COM NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS E INFECÇÃO PELO HPV

Resposta Imune	Citocina	Ação	Referência
Th1	↓Th1	Predisposição às lesões de alto grau	Lee <i>et al.</i> , 2004
Th2	↓TNF	Susceptibilidade à persistência viral	Kirckpatrick <i>et al.</i> , 2004
Th2	↑IL-10	Progressão da lesão cervical	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
Th1	↓IFN- $\gamma$	Progressão da lesão cervical associada ao HPV	El Sherif <i>et al.</i> , 2001
Th2	↑IL-10	Progressão da lesão cervical associada ao HPV	Stanczuk <i>et al.</i> , 2001
Th1	↑ IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF	Regressão de verrugas genitais	Tartour <i>et al.</i> ,1998
Th2	↓ IFN- $\gamma$	Pior prognóstico CC	
Th1	↑IL-4, IL10	Pior prognóstico em pacientes com NIC e HPV	Clerici <i>et al.</i> ,1997
Th1	↓IL-2, IFN		
Th1	IL-2	Produção diminui com a progressão da lesão	Tsukui <i>et al.</i> ,1996
Th2	IL-10	Reativação de infecção latente pelo HPV	Garzetti <i>et al.</i> ,1996

FONTE: a autora

## 2.4 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) E O GENE *MICA*

A região do MHC compreende genes codificadores de glicoproteínas de membrana que se ligam e atuam como receptores especializados para peptídeos antigênicos, além de exporem epítomos que são reconhecidos pelas células T, cujos receptores (TCRs) são específicos para reconhecer complexos de peptídeos antigênicos e moléculas MHC (McDEVITT, 2000).

Existem duas classes de moléculas MHC: MHC de classe I e MHC de classe II, as quais diferem em estrutura e função. As moléculas MHC de classe I são expressas na maioria das células nucleadas de mamíferos, enquanto as moléculas MHC de classe II são encontradas em tipos celulares específicos que participam da resposta imune, dos quais os mais importantes são as células B, macrófagos, células dendríticas e epitélio tímico (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIC, 1997). Duas grandes famílias gênicas codificam dois diferentes tipos de moléculas MHC que são funcionalmente especializadas em exibir peptídeos antigênicos a linfócitos T CD8<sup>+</sup> (moléculas de classe I) ou a linfócitos T CD4<sup>+</sup> (moléculas MHC de classe II) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIC, 1997).

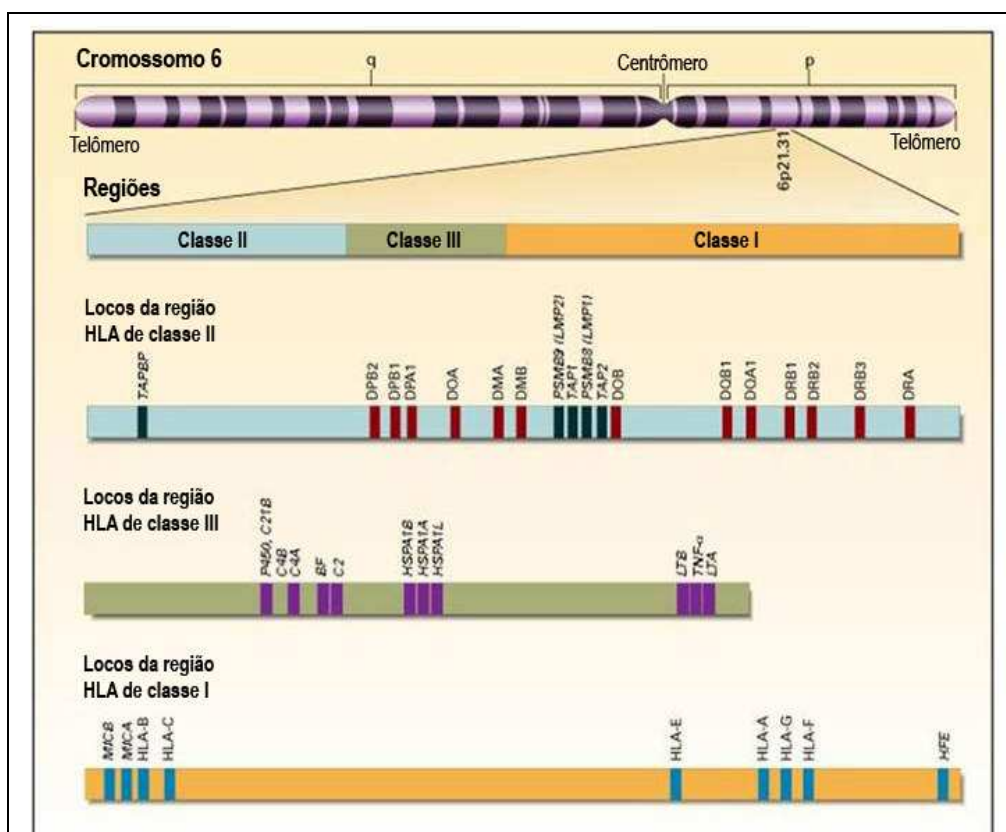
Os genes *MHC-I* e aqueles que codificam moléculas relacionadas às moléculas MHC de classe I encontram-se dispersos no genoma humano, nos cromossomos 6, 1, 7, 19 e 20 (BAHRAM, 2000). Tradicionalmente são divididos em clássicos, ou de classe Ia (*HLA-A, B e C*) e não clássicos, esses, subdivididos por alguns autores em Ib (*HLA-E, -F, -G*), Ic (*MICA, MICB, HFE*) e Id (*CD1, FcRn, ZAG*) (BAHRAM, 2000) (Figura 10).

A região MHC de classe II consiste em três principais sub-regiões denominadas DP, DQ e DR, arranjadas nessa ordem na direção do centrômero ao telômero (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIC, 1997).

Entre os locos de classe I no lado telomérico e os locos de classe II no sítio centromérico do complexo HLA, existe uma ilha de cromatina não relacionada (UC), que é ocupada por genes que desempenham outras funções, principalmente no sistema imune, e por outros que ainda não foram caracterizados funcionalmente (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIC 1997; JANEWAY *et al.*, 2001;

ABBAS e LICHTMAN, 2005). Esses locos são denominados como região MHC de classe III (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIC 1997). Nessa região estão presentes os locos que codificam proteínas do complemento, como Fator B (Bf), C2, C4A e C4B; genes de citocinas, como *TNF*, *LTA* e *LTB*; o gene da enzima 21-hidroxilase (*CYP 21B*), que está envolvida com a síntese de esteróides; gene do citocromo P-450 e alguns genes de proteínas de choque térmico (HSP) (RAMMENSEE, BACHMANN e STEVANOVIC, 1997; JANEWAY *et al.*, 2001; ABBAS e LICHTMAN, 2005) (Figura 10).

FIGURA 10 - MAPA DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) HUMANO



FONTE: <http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg>. (SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE GASTROENTEROLOGÍA PEDIÁTRICA, HEPATOLOGÍA Y NUTRICIÓN, 2006) adaptado

Os locos da família *MIC* (genes relacionados a cadeias MHC de classe I) estão entre os últimos identificados dentro do MHC de classe I (BAHRAM *et al.*, 1994), e correspondem aos locos *MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* e *MICG*.

#### 2.4.1 Estrutura Gênica, Proteína, Receptor e Expressão do Gene *MICA*

O gene *MICA* possui 11.722 pb e, portanto é considerado extenso quando comparado à média de 3,5 kb dos genes *HLA-A* a *HLA-G* (BAHRAM *et al.*, 1996). *MICA* possui um grande íntron de 6.840 pb, em comparação a íntrons com menos de 200 pb em genes *HLA-A* a *HLA-G*, que separa os dois primeiros éxons (BAHRAM *et al.*, 1994). O primeiro éxon de *MICA* codifica uma seqüência líder, o segundo, terceiro e quarto éxons codificam as seqüências de domínios externos  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 (semelhantes aos domínios G de moléculas MHC-I) e  $\alpha$ -3 (semelhante ao domínio C de Igs), respectivamente, o quinto éxon codifica um segmento transmembrânico, a cauda citoplasmática e as seqüências 3'UTR (região não traduzida) que são fusionadas no último éxon (BAHRAM *et al.*, 1994).

No éxon 5 há uma curta seqüência repetida em tandem (STR) constituída por trincas de nucleotídeos GCT (MIZUKI *et al.*, 1997), que codificam o aminoácido alanina. Com base no número de repetições de alanina, os alelos são nomeados como *A4*, *A5*, *A6*, *A9* (MIZUKI *et al.*, 1997), *A7* (RUEDA *et al.*, 2002), *A8* (GAMBELUNGHE *et al.*, 2006), *A10* (PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2000) e *A5.1*, que difere de *A5* pela inserção de um nucleotídeo guanina na trinca GCT (GGCT), levando a uma mudança da matriz de leitura que causa um códon de término prematuro dentro do éxon que codifica o domínio transmembrânico (BAHRAM, 2000). Esses alelos *A5.1* originam uma glicoproteína truncada de 35-40 kDa que eventualmente chega à superfície celular, mas provavelmente não em seu sítio fisiológico (BAHRAM, 2000).

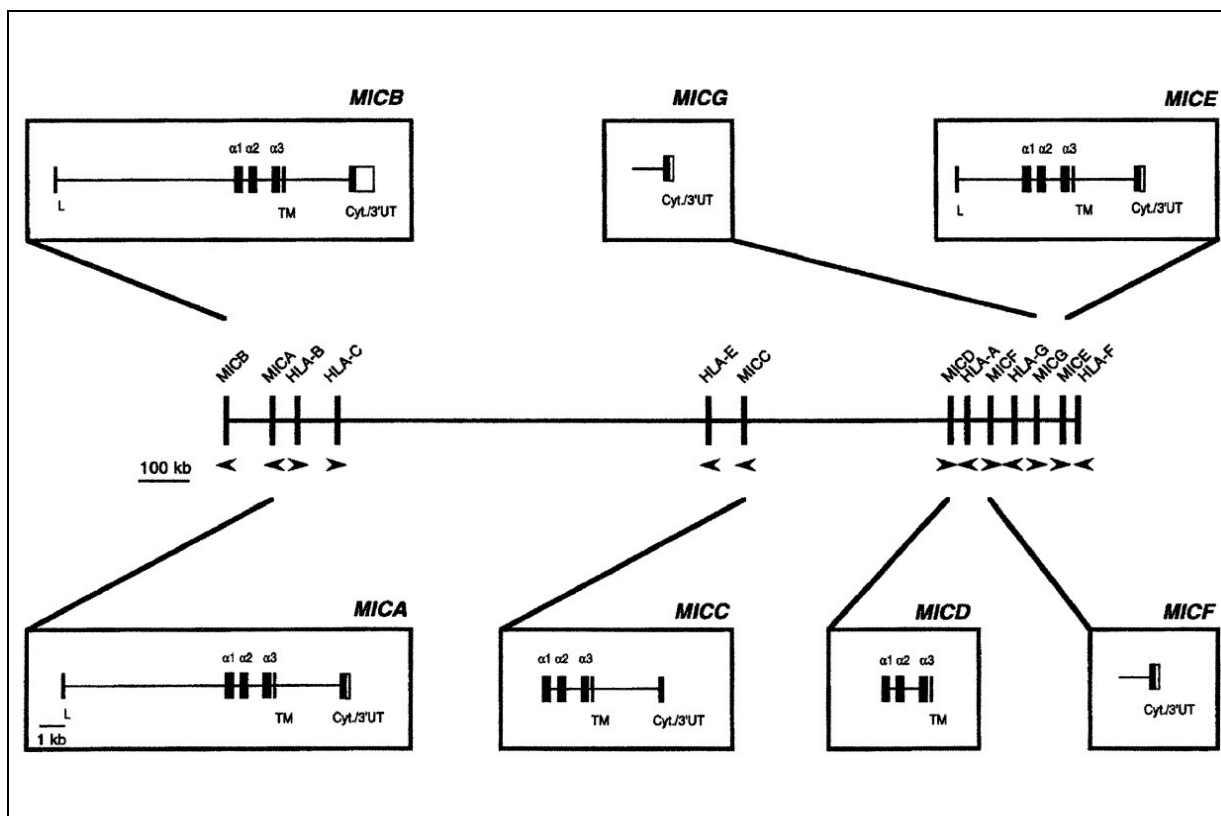
O gene é transcrito em um mRNA de 1.382pb, que possui uma única ORF (matriz de leitura aberta) de 1.149pb, a qual dá origem a um polipeptídeo precursor de 383 aminoácidos, podendo esse comprimento variar no número de repetições de alanina dentro do segmento transmembrânico (BAHRAM *et al.*, 1994; FRIGOUL e LEFRANC, 2005).

A proteína *MICA* madura possui entre 360 e 366 aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 43 kDa, dependendo do polimorfismo na região de microsatélite do segmento transmembrânico (BAHRAM *et al.*, 1994; FRIGOUL e LEFRANC, 2005). Contém três domínios extracelulares ( $\alpha$ 1 –  $\alpha$ 3), que precedem o segmento âncora de membrana, e um segmento citoplasmático relativamente curto

(42 aminoácidos), que parece direcionar a molécula à superfície baso-lateral de células epiteliais polarizadas (BAHRAM, 2000). A proteína MICA pertence à superfamília MHC (MhcSF), pois apresenta dois domínios semelhantes à G (que formam a fenda de ligação do peptídeo), e à superfamília das imunoglobulinas (IgSF), devido ao domínio semelhante à C das imunoglobulinas (BAHRAM, 2000).

*MICA* e *MICB* codificam glicoproteínas funcionais, enquanto *MICC-G* são pseudogenes (BAHRAM, 2000). *MICA*, localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (Figura 10), encontra-se a apenas 46,5kb de *HLA-B* em direção ao centrômero e *MICB* a 83kb nessa mesma direção de *MICA*, sendo, portanto, esses três genes ligados (Figuras 11 e 12) (BAHRAM, 2000). Os locos *MICC*, *MICD* e *MICE* localizam-se proximalmente aos genes *HLA-E*, *-A* e *-F*, respectivamente. *MICG* é flanqueado pelos genes *HLA-G* e *HLA-F* e *MICF* foi identificado a 24kb em direção ao centrômero de *HLA-G* (BAHRAM, 2000) (Figura 12).

FIGURA 11 - GENES E PSEUDOGENES DA FAMÍLIA *MIC* AO LONGO DA REGIÃO DE CLASSE I DO *MHC* HUMANO

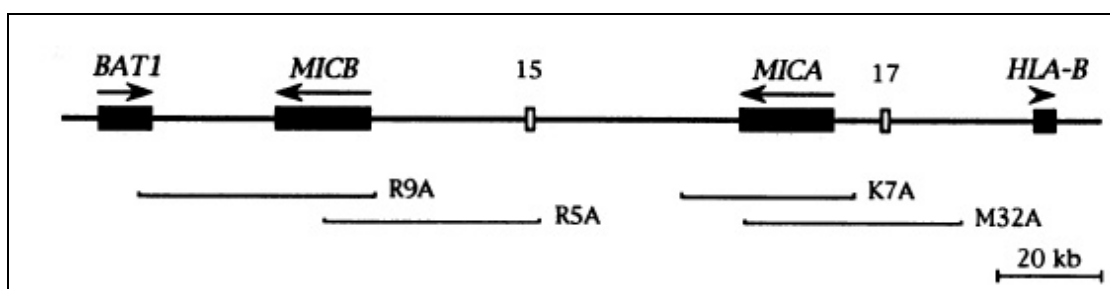


FONTE: Bahram, 2000 (extraído de SHIINA *et al.*, 1999)

NOTA: A estrutura gênica de todos os locos está realçada em retângulos. L: líder; TM: transmembrânico; Cyt.: cadeia citoplasmática; UT: não traduzida

A organização incomum dos genes *MICA* e *MICB*, sua expressão mais restrita, seus elementos de controle transcricional distintos e as características da seqüência de aminoácidos dos seus produtos indicam que esses genes evoluíram para uma função diferente, porém relacionada às moléculas MHC de classe I (BAHRAM *et al.*, 1994; BAHRAM, 2000).

FIGURA 12 - LOCALIZAÇÃO DE *MICA* E *MICB* EM COSMÍDEOS CLONADOS



FONTE: Bahram *et al.*, 1994

NOTA: As caixas sombreadas em preto na primeira linha correspondem aos genes. Caixas abertas denominadas 15 e 17 indicam pequenos fragmentos de genes semelhantes aos de classe I, contidos nos fragmentos de restrição gerados pelas enzimas de restrição *Xba* I e *Pst* I de 1,5 e 1,7 Kb, respectivamente. As setas mostram a orientação transcricional dos genes. Apenas cosmídeos relevantes de uma série contígua foram mostrados (R9A, R5A, K7A, M32A)

No loco *MICA* foram identificados 65 alelos (ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE, 2008). Vários desses alelos foram nomeados por Bahram (2000) como *MICA001* até *MICA056* pela ordem de identificação, dentre os quais, 47 codificam glicoproteínas distintas (BAHRAM, 2000). O alelo mais freqüente, possivelmente em nível mundial, é o alelo *MICA\*00801* do qual o segmento transmembrânico é definido por STR 5.1. (FODIL *et al.*, 1999).

A maior parte da diversidade alélica de *MICA* provavelmente é devida a mutações de ponto seguidas por recombinação, uma vez que muitos desses alelos diferem um do outro por um único nucleotídeo.

*MICA* e *MICB* interagem com dois diferentes imunorreceptores,  $\gamma/\delta$  (V $\delta$ 1) TCR e NKG2D, presentes em células T e células NK (BAHRAM, 2000). O TCR $\gamma/\delta$  é um heterodímero ligado por pontes dissulfeto e expresso numa pequena população de células T negativas para o receptor  $\alpha\beta$ , mas associado a CD3 e proteínas  $\zeta$  (ABBAS e LICHTMAN, 2005). As células que expressam o TCR $\gamma/\delta$  pertencem a uma linhagem distinta das células T $\alpha\beta$  restritas ao MHC, e normalmente não excedem os

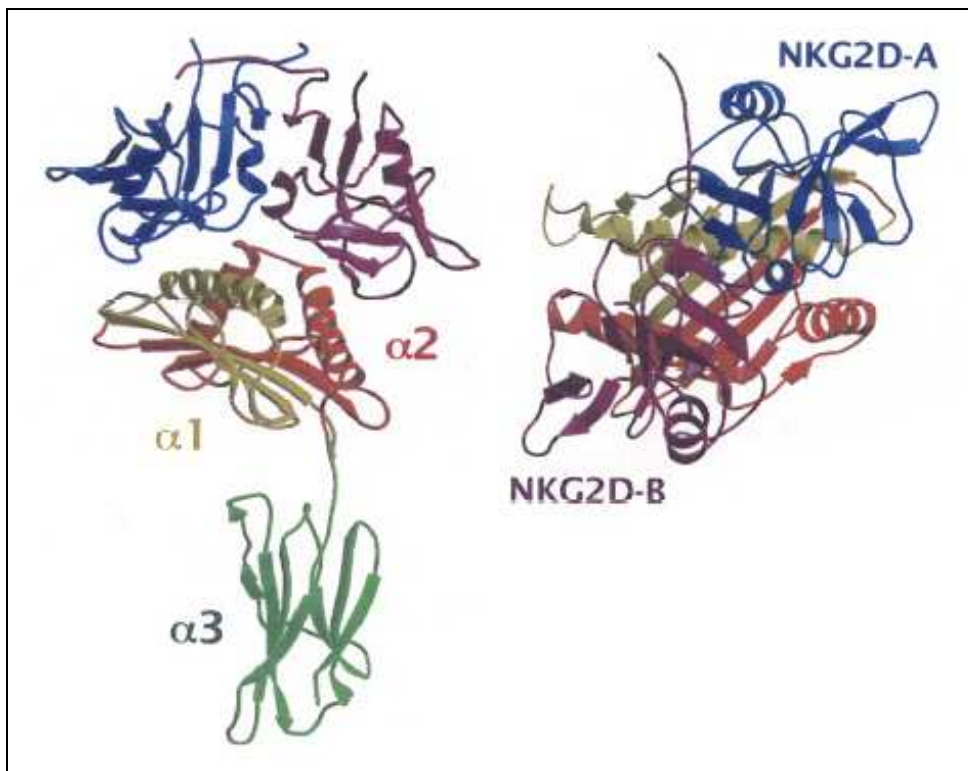


5% nos diferentes tecidos (ABBAS e LICHTMAN, 2005), mas essa proporção aumenta significativamente nas superfícies epiteliais, nos sítios de inflamação e infecções causadas por alguns microorganismos (GIACOMELLI *et al.*, 2001). As células  $T_{V\delta}$  não reconhecem os antígenos peptídicos associados às moléculas MHC clássicas e não são restritas ao MHC, ao invés, reconhecem uma grande variedade de compostos, variando de pequenos antígenos ligados a fosfatos até grandes proteínas, alquilaminas e glicolipídeos (BAHRAM, 2000), que podem ser apresentados por moléculas similares às da classe I do MHC, ou seja, uma apresentação não clássica de epítomos normalmente encontradas nas micobactérias e em outros microorganismos (BAHRAM, 2000). Outras células  $T_{V\delta}$  reconhecem antígenos protéicos e não protéicos que não necessitam de processamento por parte das APCs.

NKG2D é um imunorreceptor ativador transmembrânico (Figura 13) pertencente à superfamília das lectinas do tipo-2, o qual contém um resíduo transmembrânico carregado que permite a interação com moléculas adaptadoras (como a DAP10 ou KAP10) (BIASSONI *et al.*, 2000; RAULET, 2003). NKG2D reconhece os ligantes MICA, MICB, e a família de proteínas-ligantes de UL-16 (ULBP) (RAULET, 2003; KELLEY, WALTER e TROWSDALE, 2005) (Figura 13). A ligação de moléculas à NKG2D é um estímulo suficiente para ativar a citólise e a produção de citocinas por células NK, e promove também um aumento ou um sinal co-estimulatório para a ativação de células  $TC8^+$  e, provavelmente, de outras células T (RAULET, 2003). A ligação com NKG2D permite que as células NK destruam células alteradas que expressem níveis normais de moléculas HLA, superando os sinais inibitórios (O'CONNOR, HART e GARDINER, 2005).

Os ligantes de NKG2D normalmente são pouco expressos por células normais, mas são hiperregulados em células transformadas, infectadas por vírus, ou em situações de *stress* celular, como em tumores (RAULET, 2003) e em condições auto-imunes (GROH *et al.*, 2003).

FIGURA 13 - ESTRUTURA DO COMPLEXO NKG2D E MICA



FONTE: Li *et al.*, 2001

NOTA: A - Vista lateral e B - vista de cima do complexo MICA e o homodímero NKG2D, representado em estrutura de fita. Os domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  de MICA estão coloridos em verde claro, vermelho e verde escuro, respectivamente. O monômero NKG2D-A está representado em azul e NKG2D-B em violeta

#### 2.4.2 Biossíntese e Função Biológica de MICA

A expressão de MICA em tecidos normais está principalmente restrita ao epitélio intestinal (GROH *et al.*; 1996). No entanto foi observado que muitas linhagens celulares, de diversos tumores de origem epitelial, expressam MICA (GROH *et al.*, 1996; GROH *et al.*, 1998). Esta evidência direcionou alguns pesquisadores a investigarem o papel potencial destas proteínas como antígenos associados a tumores. A interação entre NKG2D e MICA pode aumentar potencialmente muitas respostas inatas anti-tumorais de células NK e de células T antígeno-específicas (BAUER *et al.*, 1999). MICA-NKG2D pode participar de processos inflamatórios aumentando a produção de IFN- $\gamma$  por células NK, podendo também promover um sinal co-estimulatório a células T específicas para um auto-antígeno (TIENG *et al.*,

2002). Portanto, MICA é uma molécula MHC de classe I induzida por estresse que se liga a receptores NKG2D, principalmente de células NK, e essa ligação, estimula as células NK, LTD8<sup>+</sup> e algumas células T<sub>V $\delta$</sub> .

A expressão de MICA foi documentada em muitas amostras de carcinoma de pulmão, mama, rim, ovário, próstata e cólon. Esta expressão associada a tumores e o reconhecimento incondicional das moléculas de MICA pelas células T<sub>V $\delta$</sub>  sugerem uma função potencial na resposta imune de vigilância tumoral (GROH *et al.*, 1999).

#### 2.4.3 O Polimorfismo de *MICA* e a NIC

O gene *MICA* é polimórfico e um total de 65 diferentes alelos descritos foram descritos (Anthony Nolan Research Institute), sendo que nos éxons 2-4, que codificam os três domínios extra-celulares da molécula, há diversos SNPs. Estas variantes podem levar à diferentes graus de afinidade da ligação ao NKG2D (STEINLE *et al.*, 2001) ou à expressão anormal (SUEMIZU *et al.*, 2002). Estudos mostraram que a substituição de um aminoácido na posição 129, no domínio  $\alpha$ 2, levou à alteração da afinidade a NKG2D (STEINLE *et al.*, 2001). Embora os efeitos destas variantes na ativação imune não sejam conhecidos totalmente, eles poderiam levar à diferentes graus de ativação de células imunológicas e prejudicar a eliminação tumoral.

Há poucos estudos sobre o polimorfismo funcional dos genes *MICA*. Células NK e linfócitos T<sub>V $\delta$</sub>  de indivíduos com lesões BD, uma desordem inflamatória multisistêmica, são ativados por proteínas MICA através da sua interação com o receptor NKG2D (MUÑOZ-SAÁ, 2006).

Há evidências de associação entre várias doenças e os alelos *MICA*, como diabetes tipo-I (SANJEEVI *et al.*, 2002), artrite reumatóide (MARTINEZ *et al.*, 2001), psoríase (CHOI *et al.*, 2000), várias neoplasias, como câncer cervical (GHADERI *et al.*, 2001) e câncer de mama (GROH *et al.*, 1999), doença de Behçet (MIZUKI *et al.*, 1997), doença auto-imune de Addison (GAMBELUNGHE *et al.*, 1999), entre outras.

Conjuntamente, os estudos indicam que os *MICs* são candidatos evidentes a locos de histocompatibilidade (BAHRAM, 2000) e que existe uma grande relevância de estudos de *MICA* nos processos imunes e em transplantes (BAHRAM *et al.*, 1994).

É possível que alguns alelos de *MICA* possam influenciar na apresentação de antígenos virais ou tumorais (GROH *et al.*, 2005). Porém são poucos os estudos que investigaram a relação entre as variantes alélicas de *MICA* e a NIC. Ghaderi *et al.* (1999) determinaram a frequência dos alelos microssatélites de *MICA* (responsáveis pelo domínio transmembrânico) em uma população da Suécia, não encontrando associação dos mesmos com a NIC. Jumnainsong *et al.* (2007) determinaram a frequência dos alelos do domínio extracelular de *MICA* em uma amostra da população Tailandesa, não observando diferenças entre a distribuição dos alelos entre mulheres com os diferentes estádios de NIC e os controles. O mesmo resultado foi obtido por Chen *et al.* (2005) em uma amostra da população de Taiwan.

## 2.5 JUSTIFICATIVA

Através da análise dos dados epidemiológicos observa-se que o CC é uma doença de grande importância em Saúde Pública, visto que ocupa a segunda posição em incidência de neoplasias em mulheres no Brasil (MS.INCA, 2006).

A presença do HPV associada às neoplasias cervicais em 95% dos casos torna este o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença, porém é necessária a persistência da infecção viral por um período prolongado (12 a 24 m), fato este observado em apenas 10-30% dos casos. O seguimento destas pacientes através de citologia, colposcopia com biópsia e histologia não consegue distinguir as pacientes com exames anormais, que progredirão para o câncer invasivo, daquelas nas quais as anormalidades regredirão espontaneamente.

Os fatores associados à persistência da infecção e progressão da doença não são completamente compreendidos, no entanto há evidências de que a resposta imune do hospedeiro afete a susceptibilidade às lesões e sua progressão. Uma pronunciada mudança na produção de citocinas de padrão do tipo Th1 para Th2 foi observada em pacientes com NIC associada à infecção por HPV, sugerindo que a resposta das citocinas à infecção por HPV possa ser relevante na progressão da doença. Os polimorfismos dos genes de citocinas podem potencialmente afetar a progressão da doença por diversos mecanismos,

incluindo o controle da produção das citocinas.

A análise do polimorfismo do gene *MICA* em pacientes com NIC tem particular relevância no estudo e aplicação de imunoterapias anti-tumorais, devido ao fato das células pré-malignas ainda não estarem extensivamente alteradas pela imunoeedição tumoral.

Neste estudo investigou-se em uma amostra da população sul-brasileira, a influência das variantes polimórficas nos genes *IL6*, *TNF*, *IL10*, *TGFB1*, *IFNG* e *MICA* como um componente da susceptibilidade diferencial, considerando-se que algumas mulheres infectadas por tipos oncogênicos de HPV não desenvolvem NIC e CC, no intuito de caracterizar este fator imunológico como um preditivo no desenvolvimento do CC e na imunoterapia anti-tumoral.

### 3 OBJETIVOS

- Caracterizar os genótipos e estimar as frequências alélicas e genóticas de variantes polimórficas em genes de citocinas para as posições -174 (G/C) do gene *IL6*; +869 (T/G) e +915 (G/C) do gene *TGFB1*; -1082 (A/G) do gene *IL10*; -308 (A/G) do gene *TNF* e +874 (T/A) do gene *IFNG*, nas amostras de pacientes com NIC e nos controles.
- Investigar a existência de associação entre as variantes dos genes *IL6*, *TNF*, *IL10*, *TGFB1* e *IFNG* e o desenvolvimento e progressão da NIC.
- Calcular as frequências alélicas dos polimorfismos de *MICA* ( gene A relacionado à cadeia *MHC* de Classe I), nas amostras de pacientes com NIC e controles.
- Investigar a existência de associação entre as variantes de *MICA* e a NIC.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra de pacientes foi selecionada entre mulheres que compareceram para atendimento ginecológico nos ambulatórios de Ginecologia do Hospital de Clínicas da UFPR e de Patologia Cervical do Hospital Erasto Gaertner, ambos em Curitiba-PR. Possuir o diagnóstico citológico, colposcópico e histológico de NIC II ou NIC III e não apresentar quadro de imunossupressão, outras neoplasias ou doenças auto-imunes, foram estabelecidos como critérios de inclusão e exclusão. Foram selecionadas 100 mulheres, quatro com NIC I, 48 com NIC II e 48 com NIC III. O baixo número de mulheres com NIC I explica-se devido à seleção ter ocorrido em mulheres com indicação de tratamento cirúrgico da NIC, após um período de seguimento clínico em que não foi verificado o desaparecimento da lesão.

A amostra controle foi composta por 50 mulheres sexualmente ativas, saudáveis, não consangüíneas, e sem história de NIC.

A idade média das pacientes foi de 35 anos e 28,1 anos a das controles.

No momento da genotipagem de MICA, somente foram incluídas 78 amostras de DNA de pacientes que já haviam sido genotipadas para citocinas, sendo que as 22 amostras restantes foram eliminadas devido à baixa qualidade ou baixa concentração do DNA verificada através da leitura da Densidade Óptica. Do total de 50 amostras controle, 10 foram eliminadas pelos mesmos motivos.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos dos Hospitais de Clínicas e Erasto Gaertner. Todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Cinco mililitros (05 ml) de sangue periférico foram coletados de cada mulher através de punção venosa, em tubos estéreis *vacutainer* de coleta sangüínea com EDTA. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da

camada de leucócitos, da qual foi extraído o DNA pela técnica de *Salting-out* (LAHIRI *et al.*, 1991). Esse método desenvolve-se essencialmente em cinco etapas:

- Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total.
- Lise de eritrócitos através do uso de tampão de lise de células vermelhas (RCLB 1X) pH 7,6.
- Rompimento da membrana nuclear com SDS a 20% e remoção de enzimas como DNases e RNases por meio de proteinase K e tampão da proteinase K.
- Precipitação de proteínas com NaCl 6M.
- Precipitação do DNA com etanol absoluto.

### 4.3 GENOTIPAGEM DE CITOCINAS

Para a tipificação dos alelos dos genes investigados foi utilizado o *Cytokine Genotyping Tray* (One-Lambda Inc., Canoga Park, CA).

#### 4.3.1 O *Cytokine Genotyping Tray*

O kit utilizado é composto por:

- 1 - Placa de ensaio com 96 poços: cada poço contém os oligonucleotídeos iniciadores de seqüência específica para amplificação pela PCR, de alelos selecionados de *TGFB1*, *IL6*, *IL10*, *IFNG* e *TNF* e para o gene da  $\beta$ -globina humana. Uma placa tipifica seis indivíduos. A cada poço devem se adicionados:
- 2 - Seis tubos eppendorf contendo dNTP-buffer mix (D-mix): tampão da enzima Taq polimerase, dNTP's e  $MgCl_2$   
A cada eppendorf deve-se adicionar:
  - a) amostra de DNA (concentração de 100 ng/ $\mu$ l):
  - b) Taq polimerase: 01  $\mu$ l/D-mix
  - c) água ultra-pura (milli Q): q.s.p. volume final 180 $\mu$ l/eppendorf



### 4.3.2 PCR-SSP

#### 4.3.2.1 Metodologia

A metodologia da PCR-SSP baseia-se no princípio de que oligonucleotídeos iniciadores totalmente complementares são mais eficientemente usados para amplificar uma seqüência alvo pela Taq polimerase recombinante, do que oligonucleotídeos iniciadores mal pareados. Pares de oligonucleotídeos iniciadores são confeccionados para terem um pareamento perfeito com apenas um único alelo ou um grupo de alelos.

É usado um par de oligonucleotídeos iniciadores como controle interno positivo que amplifica uma região conservada do gene da  $\beta$ -globina humana, o qual está presente em todas as amostras de DNA com a finalidade de verificar a integridade da reação da PCR. A quantidade de oligonucleotídeo iniciador é ajustada para amplificar 100 ng da amostra de DNA, quando usada em conjunto com o D-mix.

Sob condições de PCR estritamente controladas, pares de oligonucleotídeos iniciadores perfeitamente pareados resultam na amplificação da seqüência alvo (resultado positivo), enquanto pares de oligonucleotídeos iniciadores mal-pareados não resultam em amplificação (resultado negativo).

#### 4.3.2.2 Amplificação dos alelos por PCR-SSP

- 1 - Adição de 10 $\mu$ l da solução em cada poço da placa. A placa é devidamente selada.;
- 2 - Amplificação dos alelos por PCR no termociclador Gene Amp Perkin-Elmer 9600, utilizando o programa PCR One Lambda (OLI-1), por aproximadamente 1 h e 16 min (Quadro 05).
- 3 - Transferência da reação de PCR (10 $\mu$ l) para um gel de agarose 2,5%, usando o Gel System (OLI Cat. #MGS108).
- 4 - Corrida de eletroforese em tampão TBE 10x, a 140-150 V por 5 minutos.
- 5 - O gel foi colocado em uma solução de Brometo de Etídio, durante 10 minutos.

- 6 - Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta em um transiluminador (PHARMACIA) e o gel foi fotografado.
- 7 - A interpretação dos resultados é baseada na presença ou ausência de bandas que representam a amplificação do fragmento de DNA específico.

QUADRO 05 - PROGRAMA PCR ONE LAMBDA (OLI-1)

Ciclos	Passo	Temp. (° C)	Tempo (Seg)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fim	1	4	

#### 4.4 TIPAGEM DO GENE *MICA*

Para a maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo de PCR é usado apenas como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Posteriormente, o processo de tipagem de *MICA* requer um passo de pós-amplificação para discriminar entre os vários alelos (por exemplo, RFLP, SSOP, tipagem reversa por SSO-DNA...) (ONE LAMBDA, INC, 2004).

##### 4.4.1 Técnica PCR-SSOP

Para a caracterização dos alelos do gene *MICA* das 78 pacientes e 40 controles foi empregado o método de PCR-SSOP, através do Kit LABType *MICA*, fabricado por One Lambda Inc.

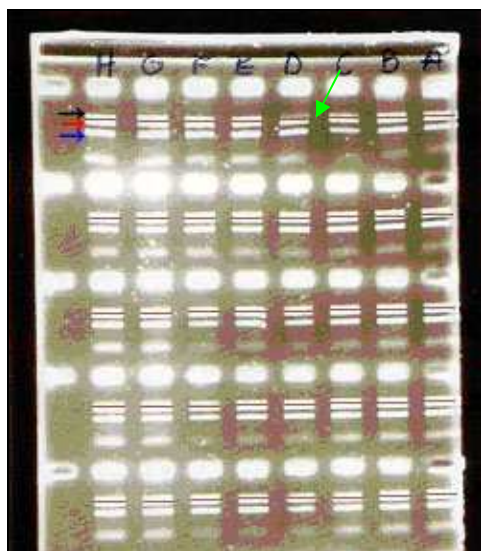
Os procedimentos para o uso do Kit LABType *MICA* foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A metodologia assemelha-se à PCR-SSOP padrão, no entanto, na tecnologia Luminex a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados específicos para hibridização com os éxons 2, 3, 4 e 5 do gene *MICA*.

A PCR foi realizada no Termociclador Perkin-Elmer 9600. Os ciclos de desnaturação, hibridização e anelamento no termociclador duraram em média uma hora e 30 minutos.

Para verificar se os produtos de PCR foram devidamente amplificados, uma amostra foi aplicada em gel de agarose 2,5% e submetida à corrida eletroforética em tampão TBE 10x, à 140-150 V, durante 08 minutos. O gel foi colocado em uma solução de Brometo de Etídio, durante dez minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV, em um transiluminador e o gel fotografado. Amplificações bem sucedidas resultaram em um gel no qual cada amostra apresentava três bandas, correspondentes ao éxon 2, éxon 3 e éxons 4 e 5 do gene *MICA*. A quarta banda verificada correspondia aos oligonucleotídeos e outros produtos não incorporados à reação. A foto de um gel em que todas as amostras amplificaram satisfatoriamente está representada na Figura 14.

Várias amostras apresentaram problemas na PCR: a) amplificação das regiões correspondentes aos éxons 4 e 5 e/ou éxon 3; b) amplificação dos éxons 3 e/ou éxon 2; c) ausência de amplificação, conforme exemplificado na Figura 15. As amostras que tiveram pelo menos duas bandas detectadas passaram para a etapa de hibridização, sendo analisadas posteriormente. Dessas, as que apresentaram uma tipagem definida pelo software foram refeitas para confirmação dos resultados.

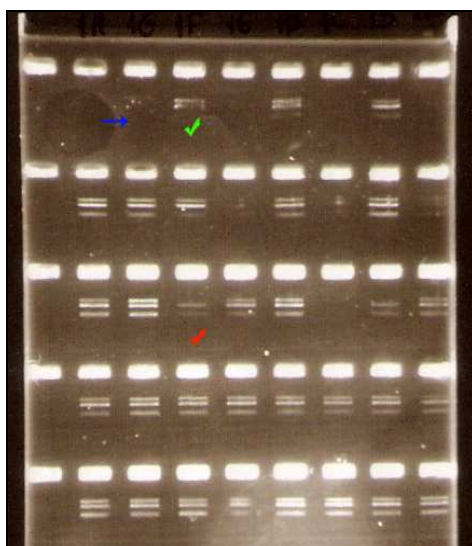
FIGURA 14 - GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APLICADOS EM CINCO FILEIRAS



FONTE: Pinho-França (2008)

NOTA: Seta preta indica a primeira banda, correspondente à região amplificada dos éxons 4 e 5; Seta vermelha indica a segunda banda, referente à região amplificada do éxon 3; seta azul mostra a terceira banda, representando a região amplificada do éxon 2. Seta verde indica uma banda mais fraca, que pode significar uma menor concentração de produtos amplificados dos éxons 4 e 5

FIGURA 15 - GEL DE AGAROSE A 2,5% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DE 40 INDIVÍDUOS DA AMOSTRA PACIENTE, APLICADOS EM CINCO FILEIRAS, APRESENTANDO PROBLEMAS NA AMPLIFICAÇÃO



FONTE: a autora (2008)

NOTA: Seta azul indica uma amostra não amplificada; Marca verde mostra amplificação de apenas os segmentos correspondentes às bandas 1 e 2 (região do éxon 2 não amplificada – terceira banda); Marca vermelha indica amplificação somente dos fragmentos correspondentes às bandas 2 e 3, e a não amplificação da região correspondente aos éxons 4 e 5 – primeira banda

As amostras amplificadas (1µl) foram desnaturadas e re-hibridizadas às sondas complementares de DNA (sondas de oligonucleotídeos seqüência-específicos) conjugadas com as microesferas fluorescentes. Após o processo de lavagem das microesferas, o DNA biotilado foi marcado com conjugado de R-Ficoeritrina/Estreptoavidina (SAPE). A leitura das reações foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo LABScan™ 100. A tecnologia Luminex® consiste em um sistema de multi-análise, onde que microesferas conjugadas com oligonucleotídeos fluorescentes codificadas por cores de diferentes comprimentos de onda são analisadas em citômetro de fluxo. Para a leitura utiliza-se um laser de cor vermelha, com comprimento de onda de 633 nm, que reconhece a cor da microesfera, e outro laser, de cor verde, com comprimento de onda de 532 nm, que determina a positividade, através da intensidade da fluorescência emitida pela Ficoeritrina presente na superfície de cada microesfera.

As tipagens foram realizadas com auxílio do software *HLA Visual*, versão 2.0 que faz a coleta de dados e a determinação dos alelos.

Com base em projetos anteriores sabe-se que há a possibilidade de ocorrer ambigüidades no processo de tipagem pelo método SSOP.

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.5.1 Freqüências Alélicas e Genotípicas

As freqüências alélicas de cada gene em estudo foram obtidas por contagem direta através da fórmula:

$$F_{al} = n/2N$$

Onde:

$F_{al}$ : freqüência alélica (ou de determinado grupo alélico)

n: freqüência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra

N: número de indivíduos na amostra

As freqüências genotípicas foram determinadas por contagem direta através de fórmula:

$$F_{gen} = n/N$$

Onde:

$F_{gen}$ : freqüência genotípica

n: freqüência absoluta de um genótipo na amostra

N: número de indivíduos na amostra

As freqüências genotípicas, obtidas por contagem direta, foram comparadas com as freqüências esperadas segundo o Teorema de Hardy-Weinberg, utilizando-se através do VassarStats, *web site* para cálculos estatísticos.

#### 4.5.2 Comparação entre as Amostras Paciente e Controle

A comparação das freqüências dos alelos e genótipos em cada amostra foi realizada através de tabelas de contingência 2x2 e os testes de  $\chi^2$  e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para a verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre elas, através do VassarStats, *web site* para cálculos estatísticos. No caso de comparações entre os genótipos de pacientes e controles, considerou-se cada genótipo em relação ao total dos demais.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que  $p \leq 0,05$ .

Nos casos em que a diferença entre as freqüências alélicas ou genotípicas de pacientes e controles apresentaram significância estatística, foi calculado “*Odds Ratio*” (“OR” ou razão de probabilidades) (WOLF,1955), através da fórmula:

$$OR = (A \times D) / (B \times C)$$

Onde: A, B, C e D são os valores correspondentes às letras do Quadro 06.

QUADRO 06 – VALORES PARA CÁLCULO DE *ODDS RATIO*

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

FONTE: Wolf, 1955

O valor da OR, em análises de associação, é considerado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a característica é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator, comparando-se com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974).

Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a característica m questão e valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 GENE *IL6*

#### 5.1.1 Freqüências Alélicas do Gene *IL6*

As freqüências alélicas relacionadas à posição -174G/C do gene *IL6* entre as mulheres com NIC e controles foram:

Pacientes: *IL6*(-174\*G)=72% e *IL6*(-174\*C)=28%;

Controles: *IL6*(-174\*G)=71% e *IL6*(-174\*C)= 29%.

Na Tabela 02 verifica-se que não há diferença na distribuição dos alelos entre as amostras.

TABELA 02 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *IL-6* (-174G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Alelo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
G	144 (72)	71 (71)	
C	56 (28)	29 (29)	0,86

FONTE: a autora

#### 5.1.2 Freqüências Genóticas do Gene *IL6*

Quando se compararam as distribuições dos genótipos G/G, GC (alto produtores) e CC (baixo produtor) na posição -174 G/C do gene *IL6* no grupo de mulheres com NIC e no grupo controle, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas (Tabela 03). Também não se observaram diferenças nas comparações realizadas com os grupos NIC II e NIC III entre si ou entre os grupos NIC II e NIC III com a amostra controle, após a estratificação da amostra paciente.



TABELA 03 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *IL6* (-174G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Genótipo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
C/C	11 (11)	04 (8)	0,77
C/G	34 (34)	21 (42)	0,43
G/G	55 (55)	25 (50)	0,69

FONTE: a autora

## 5.2 GENE *TGFB1*

### 5.2.1 Frequências Alélicas do Gene *TGFB1*

As frequências alélicas para as posições +869 T/C e +915 G/C do gene *TGFB1* foram: Pacientes: *TGFB1*(+869\*T)=55,5%, *TGFB1*(+869\*C)=45,5%; Controles: *TGFB1*(+869\*T)=59%, *TGFB1*(+869\*C)=41%. Para *TGFB1*(+915 G/C) as frequências alélicas em pacientes com NIC e nos controles foram: Pacientes: *TGFB1*(+915\*G)=91%, *TGFB1*(+915\*C)=9%; Controles: *TGFB1*(+915\*G)=92%, *TGFB1*(+915\*C)=8%, (Tabelas 04 e 05). Não houve diferença na distribuição destes alelos entre as amostras de pacientes e controles.

TABELA 04 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *TGFB1* (+869T/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Alelo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
T	111 (55,5)	59 (59)	0,64
C	89 (45,5)	41 (41)	

FONTE: a autora

TABELA 05 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *TGFB1* (+915G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Alelo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
G	182 (91)	92 (92)	0,92
C	18 (9)	08 (8)	

FONTE: a autora

### 5.2.2 Frequências Genotípicas e Fenotípicas de *TGFB1*

As frequências genotípicas de *TGFB1* (+869T/C e +915G/C) encontram-se nas Tabelas 06 e 07. Não foram observadas diferenças entre as frequências genotípicas encontradas nas amostras pacientes e controles para ambas as posições. Também não se observaram diferenças nas comparações realizadas com os grupos NIC II e NIC III entre si ou entre os grupos NIC II e NIC III com a amostra controle, após a estratificação da amostra paciente.

TABELA 06 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *TGFB1* (+869T/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Genótipo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
<i>T/T</i>	30 (30)	16 (32)	1,0
<i>T/C</i>	51 (51)	27 (54)	0,86
<i>C/C</i>	19 (19)	07 (14)	0,60

FONTE: a autora

TABELA 07 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *TGFB1* (+915G/C) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Genótipo	Pacientes (n=57)	Controles (n=74)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
G/G	82 (82)	42 (84)	0,92
G/C	18 (18)	08 (16)	0,92
C/C	0	0	

FONTE: a autora

### 5.3 GENE *TNF*

#### 5.3.1 Frequências Alélicas do Gene *TNF*

As frequências alélicas relacionadas à posição -308G/A do gene *TNF* entre as mulheres com NIC e controles foram:

Pacientes: *TNF*(-308\*G)=88% e *TNF*(-308\*A)=12%;

Controles: *TNF*(-308\*G)=91% e *TNF*(-308\*A)= 09%.

Na Tabela 08, verifica-se que não há diferença na distribuição de frequência dos alelos entre as amostras.

TABELA 08 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *TNF* (-308G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Alelo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
G	176 (88)	91 (91)	0,56
A	24 (12)	09 (09)	

FONTE: a autora

### 5.3.2 Freqüências Genóticas do Gene *TNF*

Quando se compararam as distribuições dos genótipos *G/G* (baixo produtor), *GA* e *AA* (alto produtores) na posição -308*G/A* do gene *TNF* no grupo de mulheres com NIC e no grupo controle não se observaram diferenças entre as mesmas (Tabela 09). Também não se observaram diferenças nas comparações realizadas com os grupos NIC II e NIC III entre si ou entre os grupos NIC II e NIC III com a amostra controle, após a estratificação da amostra paciente.

TABELA 09 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *TNF* (-308*G/A*) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Genótipo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
<i>G/G</i>	79 (79)	41 (82)	0,82
<i>G/A</i>	18 (18)	09 (18)	0,82
<i>A/A</i>	03 (03)	00 (0)	0,55

FONTE: a autora

## 5.4 GENE *IFNG*

### 5.4.1 Freqüências Alélicas do Gene *IFNG*

As freqüências alélicas relacionadas à posição +874*T/A* do gene *IFNG* entre as mulheres com NIC e controles foram:

Pacientes: *IFNG* (+874\**T*)=37,5% e *IFNG* (+874\**A*)=62,5%;

Controles: *IFNG* (+874\**T*)=46% e *IFNG* (+874\**A*)= 54%.

Na Tabela 10, verifica-se que não há diferença na distribuição de freqüência dos alelos entre as amostras.

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *IFNG* (+874T/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Alelo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
<i>T</i>	75 (37,5)	46 (46)	0,20
<i>A</i>	125 (62,5)	54 (54)	

FONTE: a autora

#### 5.4.2 Frequências Genóticas do Gene *IFNG*

Quando se compararam as distribuições dos genótipos *T/T* (alto produtor), *TA* (produtor intermediário) e *AA* (baixo produtor) na posição +874T/A do gene *IFNG* no grupo de mulheres com NIC e no grupo controle não se observaram diferenças entre a as mesmas (Tabela 11).

TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *IFNG* (+874T/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Genótipo	Pacientes (n=100)	Controles( n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
<i>T/T</i>	14 (14)	11 (22)	0,31
<i>T/A</i>	47 (47)	24 (48)	1,0
<i>A/A</i>	39 (39)	15 (30)	0,37

FONTE: a autora

Após a estratificação da amostra paciente em subgrupos NIC I, NIC II e NIC III comparamos a distribuição dos genótipos de *IFNG* (+874T/A) com a amostra controle e entre os subgrupos.

Quando analisamos a distribuição dos genótipos *TT* (alta produção) e *TA* (produção intermediária) não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os estadios de NIC e o grupo controle e entre os estadios de NIC entre si. Na distribuição do genótipo (*AA*) (baixa produção) observamos diferença

estatisticamente significativa entre a frequência do mesmo no grupo de pacientes NIC II, em relação ao grupo controle e ao grupo NIC III. Nas demais comparações não observamos diferenças estatisticamente significativas (Tabela 12).

TABELA 12 - COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DE *IFNG* (+874A/A) COM RELAÇÃO ÀS FREQUÊNCIAS DE *IFNG* (+874T/A E T/T) ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS

Comparações (n)	Frequência AA nas amostras %	<i>p</i>	Odds Ratio (IC=95%)
NIC II (25) x controles (15)	(51) x (30)	0,05	2,43(1,06-5,54)
NIC II+III (39) x controles (15)	(41) x (30)	0,28	
NIC III (14) x controles (15)	(30) x (30)	0,84	
NIC II (25) x NIC III (14)	(51) x (30)	0,05	2,45(1,06-5,68)

FONTE: a autora

## 5.5 GENE *IL10*

### 5.5.1 Frequências Alélicas do Gene *IL10*

As frequências alélicas relacionadas à posição -1082G/A do gene *IL10* entre as mulheres com NIC e controles foram:

Pacientes: *IL10*(-1082\*G)=32% e *IL10*(-1082\*A)=68%;

Controles: *IL10*(-1082\*G)=39% e *IL10*(-1082\*A)= 61%.

Conforme observado na Tabela 13, verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa na distribuição dos alelos entre as amostras.

TABELA 13 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *IL10* (-1082 G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Alelo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
G	64 (32)	78 (39)	
A	136 (68)	122 (61)	0,28

FONTE: a autora

### 5.5.2 Frequências Genotípicas do Gene *IL10*

Quando se compararam as distribuições dos genótipos G/G (alto produtor), G/A (produtor intermediário) e AA (baixo produtor) na posição -1082G/A do gene *IL10* no grupo de mulheres com NIC e no grupo controle não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências dos genótipos GC CC. Observamos uma freqüência estatisticamente significativa entre a freqüência do genótipo GG entre pacientes e controles (Tabela 14).

TABELA 14 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *IL10* (-1082 G/A) ENTRE MULHERES COM NIC E CONTROLES

Genótipo	Pacientes (n=100)	Controles (n=50)	<i>p</i>	Odds Ratio (IC=95%)
	n (%)	n (%)		
G/G	07 (07)	09 (18)	0,05	2,92 (1,02-8,37)
G/A	50 (50)	21 (42)	0,45	
A/A	43 (43)	20 (40)	0,86	

FONTE: a autora

Após a estratificação da amostra paciente em subgrupos NIC I (LSIL) e NIC II/III (HSIL) comparou-se a distribuição dos genótipos de *IL10* (-1082 G/A) nestes subgrupos com a amostra controle. A comparação foi realizada considerando-se a freqüência de cada genótipo em relação à soma das freqüências dos demais. Não houve diferença na distribuição dos genótipos entre as pacientes com LSIL, HSIL e o grupo controle.

## 5.6 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Comparou-se as freqüências observadas e esperadas para os diversos genótipos analisados e os valores de *p* obtidos revelaram que as freqüências genotípicas dos genes *IL6*, *TNF*, *IL10*, *TGFB1* e *IFNG* das amostras paciente e controle, encontravam-se dentro do esperado para uma população em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 7).

QUADRO 07 - VALORES DE *p* RESULTANTES DO CÁLCULO DE  $\chi^2$  PARA AS AMOSTRAS

## PACIENTE E CONTROLE NOS GENES DE CITOCINAS ESTUDADOS

	<i>IL6</i>	<i>TNF</i>	<i>IL10</i>	<i>TGFB1</i> Códon 10	<i>TGFB1</i> Códon 25	<i>IFNG</i>
Valores de <i>p</i> pacientes	0,596	0,535	0,60	0,90	0,571	1,0
Valores de <i>p</i> controles	1,0	0,588	1,0	0,794	1,0	1,0

FONTE: a autora

5.7 GENE *MICA*

Dentre os 118 indivíduos tipados a definição de dois alelos do gene *MICA* ficou assim distribuída: grupo paciente 18/78 (23%); grupo controle 10/40 (25%), sendo um dado técnico já previsto. Em diversas amostras a genotipagem apresentou mais de uma possibilidade alélica (ambigüidade) e não foi possível determinar os dois alelos de *MICA*. Estas foram representadas por letras que consideram todas as possibilidades alélicas para aquele genótipo, conforme o Quadro 08.

QUADRO 08 - RELAÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DOS ALELOS *MICA* CONSIDERANDO-SE AS AMBIGÜIDADES DE TIPAGEM

Representação	Ambigüidade <i>MICA</i> *	n Pacientes	n Controles
<i>MICA</i> *A	010 ou 016 ou 019 ou 033	7	3
<i>MICA</i> *B	007 ou 026 ou 029 ou 045	1	0
<i>MICA</i> *C	002 ou 020	32	10
<i>MICA</i> *D	009 ou 049	20	10
<i>MICA</i> *E	002 ou 020 ou 030 ou 052	7	0
<i>MICA</i> *F	027 ou 008	1	0
<i>MICA</i> *G	002 ou 012	1	0
<i>MICA</i> *H	007 ou 026 ou 045	1	0
<i>MICA</i> *I	007 ou 026	0	5

FONTE: a autora



### 5.7.1 Freqüências Alélicas do Gene *MICA*

Dos 65 alelos *MICA* já descritos, observaram-se 14 alelos na amostra paciente e 11 alelos na amostra controle deste estudo, todos listados com suas respectivas freqüências em cada amostra na Figura 16.

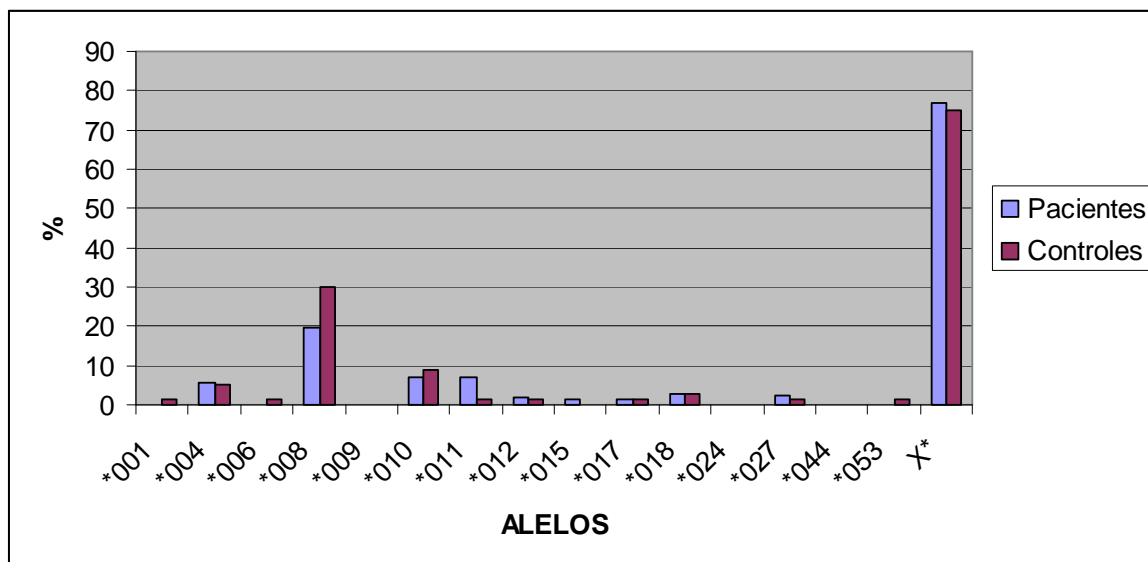
As freqüências dos agrupamentos alélicos (ambigüidades) nas quais não foi possível determinar os dois alelos de *MICA* estão representadas na Figura 17.

Na amostra controle o alelo mais freqüentemente encontrado foi o alelo *MICA*\*008 (30%), incluindo todos os indivíduos que possuem o alelo *MICA*\*00801 ou o alelo *MICA*\*00804. Os alelos *MICA*\*001, *MICA*\*006, *MICA*\*011, *MICA*\*012, *MICA*\*017 *MICA*\*027 e *MICA*\*053 foram encontrados em apenas um indivíduo no grupo controle, cada um, sendo os alelos mais raros encontrados nessa amostra.

Na amostra pacientes com SIL o agrupamento alélico mais freqüentemente encontrado foi o *MICA*\*C (\*002/020) (23,07%). Os alelos *MICA*\*001, *MICA*\*006, *MICA*\*024 e *MICA*\*044 e os agrupamentos alélicos *MICA*\*B, *MICA*\*F, *MICA*\*G e *MICA*\*H foram os agrupamentos alélicos/alelos mais raros encontrados nesta amostra, também em apenas um indivíduo cada um.

Houve diferença estatística significativa entre apenas entre as freqüências alélicas de *MICA*\*C e *MICA*\*008 entre as amostras paciente e controle. A freqüência do agrupamento alélico *MICA*\*C na amostra paciente foi 23,07% e na amostra controle foi de 12,5% ( $p=0,02$ ;  $OR=2,57$ ;  $IC=1,11-5,97$ ). A freqüência do alelo *MICA*\*008 foi de 30% na amostra controle e de 19,87% na amostra paciente ( $p=0,04$ ;  $OR=0,45$ ;  $IC=1,01-4,81$ ) (Figura 18).

FIGURA 16 - GRÁFICO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DE *MICA* EM PACIENTES COM NIC E CONTROLES



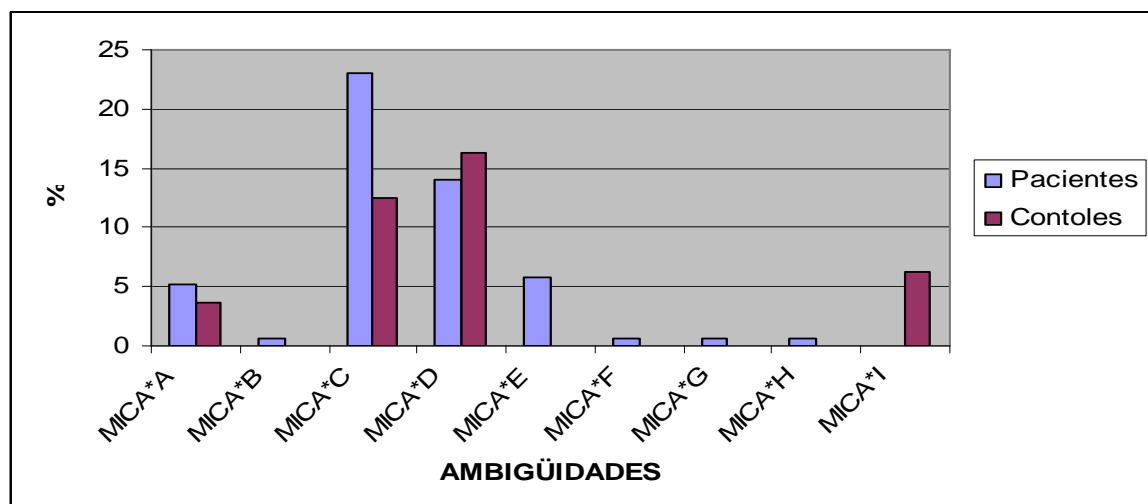
Nota: X\*= conjunto de alelos com tipagens não resolvidas (ambigüidades)

As frequências dos alelos *MICA*\*009, \*015, \*024, \*044 para a amostra controle e *MICA*\*053 para pacientes são iguais a zero

Não foram registradas frequências de 0,06 no gráfico ( *MICA* \*001, \*006, \*009, \*024 e \*044) encontradas em apenas uma paciente.

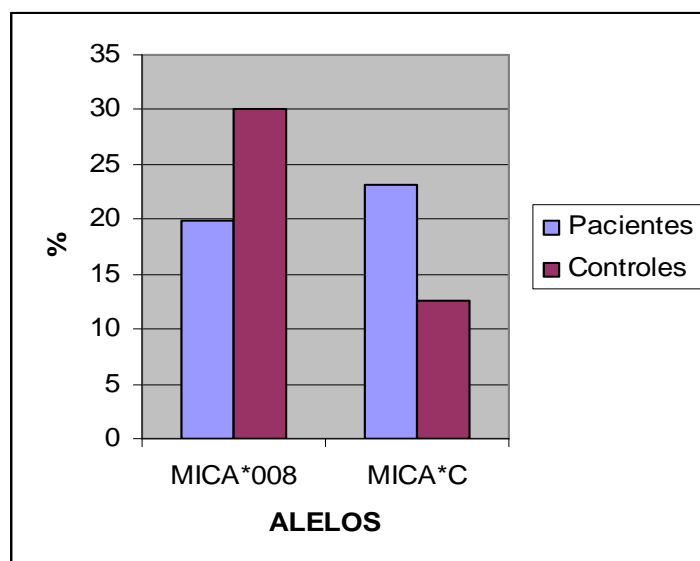
FONTE: a autora

FIGURA 17 - DETALHAMENTO DAS FREQUÊNCIAS DAS AMBIGÜIDADES (X\*) NA TIPAGEM DOS AGRUPAMENTOS ALÉLICOS *MICA* EM PACIENTES COM NIC E CONTROLES



FONTE: a autora

FIGURA 18 - GRÁFICO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICA/AGRUPAMENTO ALÉLICO DE *MICA* COM  $P \leq 0,05$  EM PACIENTES COM NIC E CONTROLES.



FONTE: a autora

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 POLIMORFISMO DE GENES DE CITOCINAS E NIC

Através da análise dos dados epidemiológicos observa-se que o Câncer Cervical e suas lesões precursoras são patologias de grande importância em Saúde Pública, visto que ocupam a segunda posição em incidência de neoplasias em mulheres no Brasil (MS.INCA, 2008).

O fator de risco mais importante para o CC é a infecção genital pelo HPV, com estudos demonstrando uma prevalência de DNA- HPV em 99,7% dos casos de CC (BOSCH *et al.*, 1995; WALLBOOMERS *et al.*, 1999). No entanto, sabe-se que apenas as infecções virais por tipos oncogênicos persistentes, observadas em 10 a 30% dos casos, estão associadas com o desenvolvimento de HSIL.

O seguimento destas pacientes através de citologia, colposcopia com biópsia e histologia não consegue distinguir aquelas com exames anormais, que progredirão para o câncer invasivo, daquelas nas quais as anormalidades regredirão espontaneamente.

A presença do HPV associado às lesões cervicais torna este o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença. No entanto, apesar de vários indícios, os cofatores que poderiam determinar a persistência viral não estão completamente elucidados até o momento. Há evidências de que a resposta imune do hospedeiro possa estar entre um dos principais fatores com influência na história natural da infecção pelo HPV.

A resposta imune é complexa e heterogênea. Mesmo sabendo-se que expressão e secreção de citocinas são geneticamente determinadas, observa-se que os indivíduos apresentam e mantêm níveis diferenciais destas moléculas, revelando a necessidade de outros mecanismos efetores auxiliares. Os mecanismos de evasão ao sistema imune desenvolvidos por certos tipos de HPV, como o HPV 16, que através da produção das oncoproteínas E6 e E7 inibe os componentes das vias de sinalização do interferon (RONCO *et al.*, 1998; BARNARD e McMILLAN, 1999), também necessitam ser definidos mais precisamente.

Apesar da resposta imune à infecção cervical pelo HPV não estar completamente elucidada, evidências provenientes de estudos com outras infecções por patógenos intracelulares demonstram a importância da célula T e das citocinas delas derivadas, na indução e manutenção de uma resposta imune efetiva contra tais patógenos. As citocinas têm um papel relevante na resposta imune adaptativa, determinando de forma apropriada e efetiva a diferenciação dos linfócitos T CD4+ em dois subtipos principais, Th1 e Th2, característicos de respostas pró-inflamatórias e antiinflamatórias respectivamente.

Em um grande número de estudos tem sido demonstrado que um padrão de expressão de citocinas caracterizado pela expressão de IFN-  $\gamma$ , em conjunto com a ausência de expressão de IL-4, portanto um perfil caracteristicamente Th1, seria necessário para eliminar a infecção pelo HPV, e que a falha em expressar e/ou manter este padrão estaria associada com a persistência da infecção. Contudo não parece ser uma simples relação causal entre a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Th1) e a eliminação viral, visto que muitos indivíduos com expressão de citocinas do padrão Th1 têm infecções persistentes. De forma análoga, a expressão de citocinas Th2 também não seria rigidamente catalogada como permissiva à progressão da lesão cervical, e níveis elevados de IL-4 observados em várias mulheres que eliminaram o vírus recentemente, poderiam refletir um papel regulatório das citocinas Th2, na tentativa de inibir a resposta inflamatória prolongada e o conseqüente dano tecidual (SCOTT *et al.*, 1999).

Neste contexto, Bais *et al.* (2005), estudando o padrão de secreção de citocinas de 31 mulheres portadoras de HR-HPV com NIC II-III e 12 pacientes com CC comparando-as com dois grupos controle, (compostos por 10 mulheres HR-HPV positivo e 11 HR-HPV negativo), ambos sem lesão cervical, detectaram uma mudança do padrão de secreção de citocinas Th1 para o padrão Th2, durante a carcinogênese cervical, já detectável no estágio de NIC III.

Em um estudo recente, no qual também foram avaliados polimorfismos, Bais *et al.* (2007) confirmaram a mudança de perfil de expressão das citocinas, independente do genótipo, de um padrão de resposta imune Th1 para Th2, em sangue periférico de mulheres com lesões cervicais. Outra informação relevante deste trabalho foi que esta mudança ocorre progressivamente do estágio NIC II para NIC III. Segundo os autores, um aumento na secreção periférica de citocinas Th1 já pode ser observado em

mulheres infectadas por HPV de alto risco e ainda sem lesão histológica. A mudança para um padrão antiinflamatório, promotor tumoral, ocorreria no estágio de NIC III (TSUKUI *et al.*, 1996; CLERICI *et al.*, 1997; JACOBS *et al.*, 1998).

A progressão da doença para CC deflagraria uma segunda desregulação na resposta imune, com manifestações de reações inflamatórias causadas pelas células tumorais (BAIS *et al.*, 2007).

Além destes, vários estudos demonstraram que a infecção persistente com tipos de HPV oncogênicos determinaria uma inflamação crônica em nível do epitélio cervical, com a liberação local de citocinas, propiciando uma vantagem no crescimento das células infectadas em relação às células cervicais normais (DRANOFF *et al.*, 2004).

Baseados nestes dados disponíveis na literatura, e sabendo-se que a variação individual de secreção, evidenciada pela identificação dos fenótipos alto, intermediário e baixo produtores das diversas citocinas, é geneticamente determinada por SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único), foi nosso objetivo investigar a eventual existência de associação entre os polimorfismos dos genes *IL-6*, *TGF- $\beta$* , *IFN- $\gamma$* , *TNF* e *IL-10* e as NICs. Os polimorfismos selecionados para análise neste estudo foram aqueles com impacto nos diferentes níveis de controle da expressão gênica, que resultariam em fenótipos alto/baixo destas citocinas. A correlação genótipo/fenótipo, empregada na interpretação dos resultados, está de acordo com a estabelecida em trabalhos de referência na literatura mundial (PERREY *et al.*, 1998; FISHMAN *et al.*, 1998; TURNER *et al.*; 1997), uma vez que não foi realizada dosagem sérica de citocinas neste trabalho.

Muito embora, os estudos relacionando os polimorfismos de genes de citocinas e as lesões intra-epiteliais escamosas causadas pela infecção pelo HPV sejam limitados em número e apresentem resultados contraditórios, comparamos nossos resultados com os disponíveis na literatura, na tentativa de colaborarmos na compreensão desta relação, até então, indefinida.

Resultados contraditórios são comuns em estudos de associação, os quais são sensíveis aos critérios de seleção de pacientes e controles, levando à heterogeneidade clínica das amostras, e desta forma determinando resultados controversos. A metodologia utilizada na investigação também pode ser fonte de discordância entre os resultados, principalmente quando se investiga o nível de

produção de citocinas, pois se sabe que diversos fatores afetam a expressão das células e moléculas do sistema imunológico. Dentre estes fatores destacam-se pela importância: o compartimento no qual as células ou moléculas são mensuradas (sangue periférico: plasma x soro; biópsia cervical) e a época da coleta, no que se refere à fase do ciclo menstrual, associação de outros processos inflamatórios e estresse cirúrgico. Analisando estes critérios observam-se algumas diferenças entre os estudos discutidos a seguir, que poderiam hipoteticamente, explicar os resultados contraditórios obtidos.

No presente estudo, não houve diferença nas frequências genóticas entre pacientes com NIC e controles ou entre os estádios das NICs entre si, com relação aos polimorfismos *IL6* (-174G/C), *TGFB1* (+869T/C e +915 G/C) e *TNF* (-308G/A).

No que se refere ao polimorfismo do gene *IL6* na posição -174, dois alelos diferentes podem ser identificados (alelos G e C), resultando em três possíveis genótipos: G/G, G/C e C/C que influenciam a taxa de transcrição do gene e conseqüentemente, a concentração plasmática da proteína IL-6, da seguinte forma: há aumento no nível sérico de IL-6 associado com os genótipos G/G e G/C, comparado com o genótipo homocigoto C/C (FISHMAN *et al.*, 1998). Encontramos na literatura trabalhos relacionando a secreção de IL-6 e as NICs: IL-6 está aumentada nos tecidos patológicos de pacientes com NIC versus controles e os níveis aumentam com a gravidade da doença (TJIONG *et al.*, 1999; MOELA-BARRIENTOS *et al.*, 2000), mas este resultado não foi observado em outros estudos. Pardo Govea *et al.* (2005) estudaram a secreção tecidual de IL-6 em uma amostra de 30 pacientes com NIC e nove controles, e encontraram um aumento nos níveis desta citocina com relação ao grupo controle, quando compararam pacientes com diversos graus de NIC, mas não encontraram diferença estatisticamente significativa quando compararam os diferentes graus de NIC entre si, concluindo, portanto que os níveis de IL-6 não se alteram com a gravidade da doença.

Em relação ao *TGFB1* foram estudados dois polimorfismos, um na posição +869 (que representa uma mudança do aminoácido leucina para prolina no códon 10) e outro na posição +915 (que altera o códon 25, substituindo a arginina para prolina). Uma pessoa será considerada alta produtora de TGF- $\beta$ 1 se o códon 10 traduzir para o aminoácido leucina e o códon 25 para a arginina. Ao contrário,

para ser baixa produtora, deverá traduzir para prolina em ambos os códons (PERREY *et al.*, 1998).

Há pouca informação na literatura relacionando esta citocina e as NICs. Stanczuk *et al.* (2002) investigaram o polimorfismo dos códons 10 e 25 em um grupo de 93 pacientes com CC, comparando-as com 79 controles saudáveis em uma população africana, e não encontraram diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos polimorfismos. Baritaki *et al.* (2007) investigaram a expressão de genes relacionados à neo-angiogênese em amostras de esfregaços cervicais, entre eles o *TGFB1*, durante a conversão maligna em células da cérvix uterina. Os autores encontraram associação entre o aumento da expressão de RNA-m de *TGFB1* e a progressão de LSIL a HSIL e sugeriram que esta citocina poderia ser considerada um biomarcador da transformação maligna cervical. Alcocer-González *et al.* (2006) investigaram o padrão da expressão de citocinas em biópsias de pacientes com CC e encontraram alta expressão de RNA-m de *TGFB1* em tumores cervicais.

Resultado contraditório foi obtido por HAZELBAG *et al.* (2004) que estudaram a expressão de RNA-m de TGF- $\beta$ 1 através de hibridização *in situ*, em uma amostra de 108 blocos de parafina de pacientes com CC e não encontraram associação do nível alto desta citocina com um pior prognóstico das pacientes.

Com relação ao TNF, sabe-se que ele é um dos principais mediadores da inflamação na pele e mucosas e seria a primeira barreira encontrada pelos vírus epiteliotrópicos.

A transcrição de *TNF* é altamente influenciada pelo polimorfismo -308G/A. Na região promotora do gene *TNF*, foram descritas em populações europeias, na posição -308, substituições de guanina (alelo *TNF-308G* ou *TNF\*1*) por adenina (alelo *TNF-308A* ou *TNF\*2*). Esse alelo, menos freqüente, tem sido associado com alta produção da citocina TNF (WILSON *et al.*, 1997; KROEGER *et al.*, 1997).

Resultados controversos também foram obtidos em relação ao TNF. Kirckpatrick *et al.* (2004) encontraram uma maior freqüência do genótipo baixo secretor -308 G/G no grupo de pacientes com NIC do que em controles. DUARTE *et al.* (2005) em um estudo com 195 pacientes com CC e 244 controles saudáveis relataram que a presença do alelo alto produtor -308A do gene *TNF* elevava em duas vezes o risco de desenvolver CC. GOVAN *et al.* (2006) estudaram a



distribuição deste polimorfismo em mulheres sul-africanas com CC e não observaram associação entre o polimorfismo *TNF* (-308 G/A) e o risco de CC. Contudo, a frequência do alelo raro -308A em populações sul africanas é menor do que aquela encontrada em caucasianos e asiáticos, o que poderia justificar a ausência de associação (GOVAN *et al.*, 2006).

Diversas evidências sugerem que o mecanismo imune efetor, contra as células infectadas pelo HPV, pode incluir participação direta ou indireta do TNF. A apoptose e a regressão espontânea de papilomas correlacionam-se com altos níveis de expressão desta citocina (HAGARI *et al.*, 1995).

Segundo Pardo-Govea *et al.* (2005), a expressão de TNF está aumentada nos tecidos patológicos de pacientes com NIC, versus controles, mas não se modifica com a gravidade da doença.

Quando analisamos o polimorfismo de *IFN* (+874 T/A) foi observado que genótipo *IFN* (+874A/A) (baixo produtor) é mais freqüente no grupo de NIC II quando comparado com os controles (Tabela 12). Entre os diferentes estadios das NICs, o mesmo genótipo ocorre em maior freqüência no grupo II comparado com o grupo NIC III. As pacientes portadoras de NIC II, que constituem a nossa amostra, são aquelas com indicação de tratamento cirúrgico, portanto com lesão persistente há mais de 12 meses. Este dado pode significar que as pacientes NIC II, com o genótipo (AA) para baixa produção de IFN, apresentam “clearance” diminuído, corroborando o resultado de Song *et al.* (2008), que encontraram associação entre a alta produção de IFN- $\gamma$  intralesional e o “clearance” do HR-HPV, após 12 meses de seguimento.

Com relação à secreção de IFN, também se observam resultados contraditórios. Segundo Pardo-Govea *et al.* (2005), a expressão de citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-2 encontravam-se elevadas em pacientes com lesão cervical, quando comparadas aos controles, o que sugere que Th1 seria o tipo de resposta das células cervicais anormais, em reação à presença do HPV, corroborando o reportado por Scott *et al.* (1999). Pardo-Govea *et al.* (2005) encontraram uma relação direta entre aumento do IFN- $\gamma$  com a gravidade da NIC, devido a uma resposta das células à gravidade da lesão. Pao *et al.* (1995) mostraram o contrário, reportando que a redução da expressão de IFN- $\gamma$  poderia influenciar no processo inflamatório e imunológico do câncer.

Com relação ao polimorfismo no gene *IL10* (-1082 G/A) (Tabela 14), encontramos uma frequência maior do genótipo GG (alto produtor), do que o total GA+AA, no grupo controle quando comparado com as pacientes com NIC. Estes resultados podem indicar um efeito protetor do genótipo GG na infecção pelo HPV e na transformação neoplásica.

De acordo com Turner *et al.* (1997), o polimorfismo *IL10* (-1082 G/A) é um dos envolvidos na determinação da baixa (AA), intermediária (GA) e alta (GG) produção plasmática da IL-10.

O papel da IL-10 na biologia tumoral permanece não elucidado. Os resultados de estudos de associação, correlacionando os polimorfismos de *IL10* e o risco/prognóstico do câncer, são controversos. Enquanto alguns estudos apresentam a IL-10 como promotora do câncer, como resultado de seus efeitos anti-inflamatórios, outros apontam-na como inibitória ao desenvolvimento tumoral, como resultado por exemplo de inibição de fatores angiogênicos. Deste modo, a IL-10 parece ter um efeito pleiotrópico complexo na imunidade anti-tumoral, sendo capaz de aumentar ou diminuir a imunogenicidade tumoral o que justifica os resultados contraditórios obtidos nos estudo descritos a seguir.

Segundo alguns autores, a resposta imune ao HPV teria um padrão predominantemente imunoinibitório, com secreção de níveis elevados de IL-10, favorável a transformações neoplásicas e permissivo à progressão das lesões cervicais para o câncer cervical (BAIS *et al.*, 2005).

Azar *et al.* (2004) encontraram níveis mais altos de IL-10 em pacientes com LSIL e hipotetizaram que níveis elevados desta citocina poderiam inibir a resposta imune em estádios iniciais da doença. Altos níveis de IL-10 poderiam: a) inibir citocinas como a IL-2, TNF, IL-4, IL-6, IL-12, envolvidas na imunorregulação Th1, Th2; b) diminuir a expressão de moléculas MHC de classe I e II; ou c) induzira transcrição de promotores precoces do HPV.

Stanczuk *et al.* (2001), avaliando o polimorfismo *IL10* (-1082 G/A) mostraram que pacientes com CC parecem estar geneticamente predispostas a produzir altos níveis da IL-10. Além disso, foi observado que a prevalência de alelos associados à baixa produção (AA) foi menor no grupo de pacientes com CC quando comparados com mulheres saudáveis.

Mulheres portadoras da infecção pelo HPV-16, mesmo apresentando

padrão imunogenético para respostas imunoinibitórias reduzidas, ou seja, portadoras de alelos para baixa produção da IL-10, apresentavam níveis intralesionais da IL-10 maiores do que aquelas pacientes que não possuíam a infecção pelo HPV, sugerindo que a infecção pelo HPV-16 pode influenciar a resposta imune local, e conseqüentemente, contribuir para a instalação e o desenvolvimento de lesões cervicais (FERNANDES *et al.*, 2004).

Porém há evidências de que a IL-10 não é sempre imunossupressora e promotora de evasão tumoral (MOCELIN *et al.*, 2005). Ao contrário, em alguns estudos evidencia-se a participação da IL-10 no “clearance” viral e há outros estudos, como por exemplo, no de Zoodsma *et al.* (2005), que não observaram diferença na freqüência do polimorfismo de *IL10* -1082, quando investigaram 1006 mulheres com NIC II, NIC III e carcinoma de colo uterino, comparando-as com controles saudáveis.

Shrestha *et al.* (2007), estudando um grupo de adolescentes afro-americanas infectadas pelo HIV, verificaram que o haplótipo GCC do *IL10*, associado à produção de altos níveis de IL-10 em indivíduos imunocompetentes, estava associado com um “clearance” reduzido de HR-HPV, evidenciando a importância desta citocina na eliminação viral.

Além disso, a IL-10 mostrou ter atividade anti-angiogênica, que pode auxiliar a inibir o crescimento tumoral (STEARNS *et al.*, 1999), significando que em níveis baixos, a IL-10 facilitaria o desenvolvimento tumoral. Os resultados iniciais de estudos com vacina anti-HPV também indicam um possível papel da IL-10 na prevenção do câncer cervical (PINTO *et al.*, 2005), através da eliminação do HPV ou possivelmente do índice de “clearance”, que varia entre 6 e 24 meses (MOSCICKI *et al.*, 1998).

Farzaneh *et al.* (2006) analisaram o polimorfismo *IL10* (-1082 G/A) de 116 HPV+, sendo 54 mulheres sem lesão cervical e 62 com SIL e compararam com 119 controles HPV negativo. Não observaram diferenças nas freqüências genótípicas entre os grupos, porém entre as mulheres HPV positivo, que foram re-examinadas para pesquisa de HPV, após 12 meses, foi encontrada uma associação inversa entre a presença de ao menos um alelo G (alta produção) e a persistência do HPV, sugerindo que altos níveis de IL-10 poderiam prevenir o desenvolvimento de neoplasia cervical, através de seu papel na eliminação do HPV.

Sabe-se que a abordagem clínica e terapêutica destas pacientes é delineada conforme a classificação histológica da lesão, e consiste em avaliar a persistência ou progressão de LSIL para HSIL, ou eliminação da LSIL, que ocorre na maioria dos casos, através de exames citológicos e histológicos seriados. Sabe-se ainda, que as lesões classificadas como NIC II podem representar tanto uma infecção aguda pelo HPV que poderá regredir, como um pré-câncer incipiente com destino à persistência e alto risco de invasão, tratando-se então de uma lesão, onde o nível de anormalidade não é suficiente para prever o risco de progressão à NIC III e ao CC, tornando proeminente a necessidade de um outro fator preditivo de risco de desenvolvimento de CC para auxiliar no delineamento de uma abordagem terapêutica mais precisa. Desta forma, os polimorfismos de *IFNG* e de *IL10* poderiam ser utilizados como biomarcadores em relação à previsão de “clearance” viral.

Com base no exposto, torna-se clara a complexidade e heterogeneidade da resposta imune ao HPV e evidencia-se a importância de estudos longitudinais para uma melhor correlação entre o padrão de citocinas com o subsequente curso da infecção, avaliando-se individualmente o tipo de resposta imune (Th1/Th2), a capacidade de manutenção da mesma para a eliminação viral e a avaliação concomitante da atividade de mecanismos efetores competentes.

## 6.2 POLIMORFISMO DO GENE *MICA* E NIC

Os genes e pseudogenes da família *MIC*, descobertos há pouco mais de uma década (BAHRAM *et al.*, 1994 e LEELAYUWAT *et al.*, 1994), juntamente com os genes de classe I clássicos e não clássicos são membros de uma SUPERFAMÍLIA GÊNICA que codifica polipeptídeos de cadeia alfa similares. As semelhanças estruturais das moléculas *MICA* com os antígenos HLA de classe I, bem como o seu polimorfismo, foram determinantes para que pesquisadores iniciassem estudos populacionais sobre sua função e diversidade.

As primeiras análises da seqüência nucleotídica do gene *MICA*, mesmo em uma amostra restrita, já revelavam a existência de 16 alelos, definidos por 27 posições polimórficas, das quais 22 eram não-sinônimas (BAHRAM *et al.*, 1994 e FODIL *et al.*, 1996). A diversidade observada no éxon 4 é uma característica

peculiar do sistema *MIC*, uma vez que no sistema HLA o polimorfismo concentra-se nos éxons 2 e 3 (KATSUYAMA *et al.*, 1999).

A comparação das freqüências alélicas nos permitiu concluir que o agrupamento alélico *MICA*\*C era mais freqüente na amostra paciente (23,07%) quando comparado com a amostra controle (12,5%;  $p=0,02$ ). Por outro lado, *MICA*\*008 (incluindo todos os indivíduos que possuem o alelo *MICA*\*00801 ou o alelo *MICA*\*00804) foi o alelo observado com maior freqüência na amostra controle (30%) e em 19,87% da amostra paciente ( $p=0,04$ ).

São poucos os estudos que relacionam o polimorfismo de *MICA* e a *NIC*. Ghaderi *et al.* (1999) determinaram a freqüência do polimorfismo dos alelos microssatélites de *MICA* (responsáveis pelo domínio transmembrânico) em uma população da Suécia, e não encontraram associação dos mesmos com a *SIL*. Jumnainsong *et al.* (2007) determinaram a freqüência dos alelos do domínio extracelular de *MICA* em uma amostra da população tailandesa e não observaram diferenças entre a distribuição dos alelos entre os diferentes estádios das *SILs* e os controles. O mesmo resultado foi obtido por Chen *et al.* (2005) em uma amostra da população de Taiwan.

Dos quatro alelos já descritos como *MICA*\*008, apenas *MICA*\*00801 e *MICA*\*00804 foram seqüenciados até o presente momento. O alelo *MICA*\*00804 diferencia-se de *MICA*\*00801, apenas pela substituição de uma citosina por timina no nucleotídeo 21 do éxon 1 e foi descrito em apenas um indivíduo caucasóide oriundo da Inglaterra (STEWART *et al.*, 2004). Optamos por considerar apenas *MICA*\*008 nas análises dos resultados obtidos, já que até o momento apenas os alelos *MICA*\*004, *MICA*\*00801, *MICA*\*00804 e *MICA*\*01801 possuem o éxon 1 seqüenciado (*European Bioinformatic Institute*, [www.ebi.ac.uk/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/). Acesso em 24/05/08).

O alelo *MICA*\*008 é o alelo mais freqüente em várias populações estudadas, como euro-brasileira (26,5%) (RIBAS, 2007); brasileira (27,2%) (MARIN *et al.*, 2004); afro-americana (31,7%) e euro-americana (43,33%) (GAO *et al.*, 2006); tribo nigeriana Efik (32,8%) (TIAN *et al.*, 2003); tailandesa (21,4%) (ROMPHRUK *et al.*, 2001); japonesa (30,8%) (KATSUYAMA *et al.*, 1999); além de ser o alelo mais freqüente entre os indivíduos da população espanhola saudável estudada por Muñoz-Saá (2006), em seu trabalho com doença de Behçet (BD) e *MICA*.

Esse alelo também foi o mais freqüente nas duas amostras do estudo de casais com abortamento recorrente de causa desconhecida, apresentando freqüência de 24,61% nos controles e 19,29% em pacientes (PINHO-FRANÇA, 2008).

A ampla distribuição de *MICA\*008* e sua presença em diversos haplótipos podem indicar que este seja um alelo ancestral que após subseqüentes recombinações e mutações de ponto gerou a diversidade alélica atual (PETERSDORF *et al.*, 1999).

A alta freqüência do alelo *MICA\*008*, o fato de transcrever para uma molécula truncada e ainda exibir o códon 129 para valina (menor afinidade com o receptor), nos permite argumentar sobre uma provável função inibitória na forma de molécula solúvel, bloqueando o sítio ativo do receptor NKG2D. Pode-se considerar também que apesar da alta freqüência de *MICA\*008*, a seleção esteja atuando a favor da geração e manutenção de alelos, cujos produtos ativam o receptor NKG2D, uma vez que a vigilância imunológica ficaria favorecida nestas condições. Desta forma, a heterozigose de *MICA\*008* com outros alelos *MICA* promoveria a regulação da ativação e inibição da atividade citotóxica das células que expressam o receptor NKG2D.

A ambigüidade *MICA\*C*, que foi o agrupamento alélico/alelo encontrado em maior freqüência no grupo de pacientes e o terceiro na amostra controle, coloca a possibilidade dos indivíduos que a apresentam possuírem os alelos *MICA\*00201* ou *MICA\*020*. O alelo *MICA\*020* é extremamente raro, apresentando freqüência nula em populações euro-brasileira, nigeriana e indígena sul-americana (ZHANG *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2003; RIBAS, 2007) e também não foi verificado nos trabalhos com brasileiros, afro-americanos, euro-americanos, japoneses e coreanos (KATSUYAMA *et al.*, 1999; PYO *et al.*, 2003; MARIN *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2006). Esse alelo foi encontrado em 0,4% de indivíduos tailandeses (ROMPHRUK *et al.*, 2001). Já o alelo *MICA\*00201* foi um dos alelos mais freqüentemente encontrados entre os euro-brasileiros (17,7%) (RIBAS, 2007); brasileiros, (15,4%) (MARIN *et al.*, 2004); afro-americanos (25,4%); euro-americanos (14,1%) (GAO *et al.*, 2006); tribo Efik da Nigéria (17,2%) (TIAN *et al.*, 2003) e tailandeses (17,6%) (ROMPHRUK *et al.*, 2001). Foi o terceiro alelo mais freqüente no estudo de Muñoz-Saá (2006) (14,24%) e também foi o alelo mais freqüente nas tribos indígenas sul-americanas Toba, Wichi e Terena (34,6%,

47,6% e 44,5%, respectivamente) (ZHANG *et al.*, 2002); nas tribos nigerianas Yoruba (33,1%) e Igbo (42,4%) (TIAN *et al.*, 2003). A partir dos dados obtidos para as outras populações brasileira, euro-brasileira e euro-americana é possível inferir que os indivíduos das amostras Paciente e Controle com essa ambigüidade sejam positivos para o alelo *MICA\*00201* e negativos para o alelo *MICA\*020*.

As moléculas de MICA são expressas em várias células tumorais epiteliais e são reconhecidas por células NK e T<sub>γδ</sub> (GROH *et al.*, 1999), sugerindo que essas moléculas possuem um importante papel na imunidade anti-tumoral (AIDA *et al.*, 2002).

A ação das células NK é regulada por uma rede extensa de receptores ativadores e inibidores. Os imunorreceptores ativadores, através da interação com seus ligantes, transduzem sinais ativadores, através de proteínas adaptadoras (como CD3ξ, FcεR1y e DAP12), que resultam na destruição de células anormais (infectadas, estressadas etc.). Já os receptores inibidores ligam-se a moléculas MHC de classe I e moléculas relacionadas, mantendo a vigilância das células presentes no organismo, desencadeando a destruição das células anormais na ausência dos sinais inibidores (DOSIOU; GIUDICE, 2006). As células NK têm habilidade de lisar células alvo sem a necessidade de sensibilização prévia ou sem restrições a antígenos HLA (DOSIOU; GIUDICE, 2006).

A variação alélica do gene MICA pode influenciar a ligação desses ligantes ao receptor NKG2D das células NK, podendo afetar o transplante de órgãos e/ ou a imunopatogênese de doenças (GAO *et al.*, 2006).

O polimorfismo do gene *MICA* ao longo dos éxons 2, 3 e 4 exibe uma grande quantidade de substituições não sinônimas, das quais muitas resultam em mudanças de aminoácidos não conservativas. Acredita-se que as diferenças nas seqüências dos alelos *MICA* possam influenciar a interação destas moléculas com o receptor NKG2D.

A investigação do polimorfismo no códon 129 (éxon 3) indicou que os alelos codificando para metionina (ATG) nesta posição possuem uma capacidade consideravelmente maior de ligarem-se ao receptor NKG2D, do que alelos que codificam para valina (GGT) nesta mesma posição (STEINLE *et al.*, 2001). Os alelos *MICA\*00201* e *MICA\*020*, envolvidos nessa ambigüidade, apresentam o aminoácido metionina 129.

As localizações das substituições ao longo da seqüência dos éxons 2-4 do gene *MICA* levantam a questão de como o polimorfismo estaria relacionado com a função biológica e imune das moléculas MICA e quais forças seletivas poderiam atuar na geração da diversidade destas moléculas (PETERSDORF *et al.*, 1999). A expressão de *MICA* é hiper-regulada por muitas linhagens de células tumorais e tumores primários de origem epitelial (GROH *et al.*, 1999). Essa hiper-regulação parece ser resultado da ativação de elementos de transcrição presentes nos promotores dos genes HSP (Heat Shock Proteins; Proteínas de Choque Térmico), um evento que é acompanhado pela transformação. Alguns estudos mostraram que a imunidade mediada por MIC-NKG2D não ocorre em pacientes com cânceres progressivos de mama, intestino, ovário ou cólon (GROH *et al.*, 2002; DOUBROVINA *et al.*, 2003). Na maioria dos casos, tumores malignos liberam MIC e subseqüentemente induzem a hipo-regulação da expressão de NKG2D de superfície em células NK e/ou CTLs. Essa deficiência na função da célula efetora mediada por NKG2D tem sido proposta como um dos mecanismos pelos quais as células tumorais podem escapar da vigilância imune de células NK e CTL (GROH *et al.*, 2002; DOUBROVINA *et al.*, 2003). A expressão de moléculas MICA pode ser induzida em cultura de fibroblastos infectados com citomegalovírus (CMV), e sua ligação com o receptor NKG2D aumenta significativamente a resposta de células T CD8<sup>+</sup> e de células NK anti-CMV. Estas observações, juntamente com o aparente papel desempenhado na atividade anti-tumoral ao estimular células T CD8<sup>+</sup> específicas contra antígenos tumorais, apóiam o modelo de que o sistema MICA-NKG2D exerce uma função biológica na defesa contra agentes infecciosos e em condições de estresse celular (GROH *et al.*, 2001 e SKOV *et al.*, 2005).

Por outro lado foi observado que células T CD8<sup>+</sup> e células NK presentes em tumores possuem baixa expressão do receptor NKG2D e comprometimento funcional. Este comprometimento da função efetora destas células pode ser decorrente da ação inibitória de moléculas MICA e MICB solúveis derivadas de tumores (GROH *et al.*, 2002). A baixa expressão de NKG2D na superfície de células com atividade citotóxica foi correlacionada com a incidência e progressão de carcinogênese cutânea, enfatizando a importância deste receptor e conseqüentemente de seus ligantes como marcadores da resistência de tumores (OPPENHEIM *et al.*, 2005).



Moléculas MICA expressas na superfície celular parecem ativar células NK e promover a atividade citotóxica das mesmas, por outro lado estas moléculas na forma solúvel podem bloquear a ativação do receptor NKG2D inibindo a citotoxicidade inerente das células NK. Esta última situação pode ser deletéria nos processos anti-tumorais ou até mesmo em situações de infecção viral. Mesmo as moléculas ancoradas na superfície celular exibem variabilidade em sua estrutura e/ou posicionamento na membrana, como comentado anteriormente, e desta forma provavelmente não interagem com a mesma intensidade com o receptor, ou seja, o polimorfismo funcional parece trazer conseqüências para o sistema de defesa imunológico do organismo.

Portanto, o presente trabalho parece ser o primeiro a descrever associações entre o polimorfismo de *MICA* e a NIC e uma amostra da população brasileira, muito embora não se compreenda, exatamente, a participação do mesmo na imunomodulação e/ou suas conseqüências biológicas. Há evidências de que alterações na expressão das moléculas MICA solúveis e/ou de superfície celular talvez resultem em uma ativação ou inibição exacerbada das células NK, levando à progressão das NICs.

## 7 CONCLUSÕES

- O genótipo *IFN* (+874A/A) foi observado em maior frequência no grupo de pacientes NIC II quando comparado com os controles. Entre os diferentes estádios das NICs, o mesmo genótipo ocorre em maior frequência no grupo II comparado com o grupo NIC III. Este dado pode significar que as pacientes NIC II, com genótipo para baixa produção de IFN, apresentam “clearance” viral diminuído.
- O genótipo *IL10* (-1082G/G), determinante do fenótipo alto produtor, foi encontrado em maior frequência no grupo controle do que em pacientes com NIC, evidenciando, portanto, um efeito protetor do mesmo, sugerindo que altos níveis de IL-10 podem prevenir o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais, através do seu papel na eliminação viral (“clearance”) ou que níveis baixos de IL-10 desencadeiem uma falha na inibição da angiogênese em tecidos neoplásicos, facilitando desta forma o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais.
- O agrupamento alélico mais frequentemente encontrado na amostra paciente foi *MICA*\*C (23,07%) e na amostra controle foi o alelo *MICA*\*008 (30%)
- Foi encontrada uma associação positiva entre o agrupamento alélico *MICA*\*C e uma associação negativa entre o alelo *MICA*\*008 e o grupo de pacientes com NIC.

## REFERÊNCIAS

ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., POBER J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 2000.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. REALI, C. [Trad.] 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABED, N.S.; CHACE, J.H.; FLEMING, J.H.; COWDERY, J.S. Interferon- $\gamma$  regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is prerequisite for IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of B cell differentiation. **Cel Immunol**, Orlando, v. 153, n. 2, p. 356-366, 1994.

ALCOCER-GONZÁLES, J.M.; BERUMEN, J.; TAMÉZ-GUERRA, R.; BERMÚDEZ-MORALES, V.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; MORENO, J.; GARIGLIO, P.; MADRID-MARINA, V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunol**, v. 19(3), p. 481-91, 2006.

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. **The Anthony Nolan Trust**. Disponível em: < <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/lists/otherlist.html> > Acesso em: 22.02. 2008.

ATTISANO, L.; WRANA, J.L.; LOPEZ-CASILLAS, F.; MASSAGUE, J. TGF- $\beta$  receptors and actions. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1222, p. 71-80, 1994.

AZAR, K.K.; TANI, M.; YASUDA, H.; SAKAI, A.; INQUE, M.; SASAGAWA, T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 35 (11), p. 1376-84, 2004.

BACH, E.A.; AGUET, M.; SCHREIBER, R.D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 15, p. 563-591, 1997.

BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 91, p. 6259-6263, 1994.

BAHRAM, S.; SPIES, T. Nucleotide sequence of a human *MHC* class I MICB cDNA. **Immunogenetics**, New York, v. 43, p. 230, 1996.

BAHRAM, S. *MIC* genes: from genetics to biology. New York: **Advances in immunology**, v.76, p. 1-60, 2000.

BAIS, AG.; BECKMANN, I.; EWING, PC.; EIJEKEMANS, MJC.; MEIJER, CJ.; SNIJDERS, PJ.; HELMERHORST, TJ. Cytokine release in HR-HPV (+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or Carcinoma, compared with HR-HPV (-) controls. *Mediators of Inflammation*, 2007.

BAIS, AG.; BECKMANN, I.; LINDEMANS, J.; EWING, PC.; MEIJER, CJ.; SNIJDERS, PJ.; HELMERHORST, TJ. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J Clin Pathol**, London, v. 58(10), p. 1096-100, 2005.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARITAKI, S.; SIFAKIS, S.; HUERTA-YEPEZ, S.; NEONAKIS, IK.; SOUFLA, G.; BONAVIDA, B.; SPANDIDOS, DA. Overexpression of VEGF and TGF- $\beta$ 1 m-RNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: Implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. **Int J Oncol**, Athens, v. 31(1), p. 69-79, 2007.

BARNARD, J.A.; LYONS, R.M.; MOSES, H.L. The cell biology of transforming growth factor- $\beta$ . **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1032, p. 79, 1990.

BARNARD, P., MCMILLAN, N.A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. **Virology**, New York, v. 259, p. 305-13, 1999.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, Washington, v. 285, p. 727-729, 1999.

BENJAMIN, D.; KNOBLOCH, T.J.; DAYTON, M.A. Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. **Blood**, New York, v. 80(5), p. 1289-1298, 1992.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, London, v. 320, p. 584-588, 1986.

BEUTLER, B.A.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **J Immunol**, Bethesda, v. 135, n. 6, p. 3972-3977, 1985.

BIASSONI, R.; CANTONI, C.; FALCO, M.; PENDE, D.; MILLO, R.; MORETTA, L.; BOTTINO, C.; MORETTA, A. Human natural killer cell activating receptors. **Mol Immunol**, Oxford, v. 37, p. 1015-1024, 2000.

BOULANGER, M.J.; CHOW, D.; BREVNOVA, E.E.; GARCIA, K.C. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. **Science**, Washington, v. 300, p. 2101-2104, 2003.

BOUSSIOTIS, V.A.; NADLER, L.M.; STROMINGER, J.L.; GOLDFELD, A.E. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is an autocrine growth factor for normal human B cells. **Immunology**, Oxford, v. 91, p. 7007-7011, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer-INCA. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2003. 92p.

BROWN, D.R.; SHEW, M.L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **J Infect Dis**, Chicago, v. 191, p. 182-92, 2005.

BROWN, K.D.; ZURAWSKI, S.M.; MOSMANN, T.R.; ZURAWSKI, G. A family of small inducible proteins secreted by leucocytes is member of a new superfamily that includes leucocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. **J Immunol**, Bethesda, v. 142, p. 679-687, 1989.

BROWNING, J. L.; NGAM-EK, A.; LAWTON, P.; DeMARINIS, J.; TIZARD, R.; PINGCHANG-CHOW, E.; HESSION, C.; O'BRINE-GRECO, B.; FOLEY, S. F.; WARE, C. F. Lymphotoxin- $\alpha$ , a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 847-856, 1993.

BURDIN, N.; PERONNE, C.; BANCHEREAU, J.; ROUSSET, F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. **J Exp Med**, New York, v. 177(2), p. 295-304, 1993.

BUSCHLE, M.; CAMPANA, D.; CARDING, S.R.; RICHARD, C.; HOFFBRAND, A.V.; BRENNER, M.K. Interferon- $\gamma$  inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J Exp Med**, New York, v. 177(1), p. 213-218, 1994.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 72(9), p. 3666-3670, 1975.

CASTELLSAGUE, X.; MUNOZ, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis- role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monog**, Bethesda, v. 31, p. 20-8, 2003.

CHANG, S.; KHOO, C.M.; NAYLOR, M.L.; MASER, R.S.; DE PINHO, R.A. Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 17, p. 88-100, 2003.

CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J Exp Med**, New York, v.166, p.1229-1244, 1987.

CHEN, Y.; FERGUNSON-SMITH, A.C.; NEWMAN, M.S.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B.; RUDDLE, F.H. Regional localization of the human beta 2-interferon gene. **Am J Hum Genet**, Chicago, v. 41, p. 161, 1987.

CHEN, J. R.; LEE, Y. J.; CHEN, T.; WANG, K. L.; DANG, C. W.; CHANG, S. C.; LIU, H. F.; YANG, Y. C. MHC class I chain-related gene A (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer, **Neoplasma**, Bratislava, v.52, n.5, p. 369-73, 2005.

CHOI, H.B.; HAN, H.; YOUN, J.I.; KIM, T.Y.; KIM, T.G. MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 56, p. 548-550, 2000.

CLERICI, M.; MEROLA, M.; FERRARIO, E.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.; STEFANON, B.; VENZON, D.J.; SHEARER, G.M.; DE PALO, G.; CLERICI, E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, p. 245-250, 1997.

COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A; SHADER, B.; CHERWINSKI, H.M.; SAVELKOUL, H.F.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol Rev**, Copenhagen, v.102, p. 5-38, 1988.

D'ANDREA. A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J Exp Med**, New York, v. 178(3), p. 1041-1048, 1993.

DeLARCO, J.; TODARO, G. Growth factors from sarcoma virus-transformed cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 75, p. 4001-4005, 1978.

DEL PRETE, G.F.; DE CARLI, M.; MASTROMAURO, C.; BIAGIOTTI, R.; MACCHIA, D.; FALAGIANI, P.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. Purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) (TES) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profiles of cytokine production. **J Clin Invest**, New York, v. 88, p. 346-350, 1991.

DE VILLIERS E.M. Taxonomic classification of papillomaviruses. **Papillomavirus Report**, v. 12, p. 57-63, 2001.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an auto regulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**, New York, v. 174( 5), p. 1209-1220, 1991a.

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. **J Exp Med**, New York, v. 174(4), p. 915-924, 1991b.

DERYNCK, R.; LEUNG, D.W.; GRAY, P.W., GOEDDEL, D.V. Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 10(12), p. 3605-3615, 1982.

DEVOS, R.; CHEROUTRE, H.; TAYA, Y.; DEGRAVE, W.; VAN HEUVERSWYN, H.; FIERS, W. Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 10(8), p. 2487-2501, 1982.

DING, L.; LINSLEY, P.S.; HUANG, L.Y.; GERMAIN, R.N.; SHEVACH, E.M. IL-10 inhibits macrophage co stimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J Immunol**, Bethesda, v. 151(3), p. 1224-1234, 1993.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. **Endoc Rev**, Baltimore, v. 26, p. 44-62, 2006.

DOUBROVINA, E.S.; DOUBROVIN, M.M.; VIDER, E.; SISSON, R.B.; O'REILLY, R.J.; DUPONT, B.; VYAS, Y.M. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. **J Immunology**, Baltimore, v. 171, p. 6891-6899, 2003.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, London, v. 4, p. 11-22, 2004.

DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R.; PINTO, D.; MATOS, A.; PEREIRA, D.; MOUTINHO, J.; CANEDO, P.; MACHADO, J.C.; MEDEIROS, R. G-308 TNF- $\alpha$  polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 334, p. 558-592, 2005.

DUNHAM, M.A.; NEUMANN, A.A.; FASCHING, C.L.; REDDEL, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. **Nat Genet**, New York, v. 26, p.447-450, 2000.

DYSON, N.; HOWLEY, P.M.; MUNGER K., HARLOW, E. The human papillomaviruse 16- E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, Washington, v. 243, p. 934-7, 1989.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 2245-62, 1998.

ECONOMOU, J. S.; RHOADES, K.; ESSNER, R.; McBRIDE, W. H.; GASSON, J. C.; MORTON, D. L. Genetic analysis of the human tumor necrosis factor  $\alpha$ /cachectin promoter region in a macrophage cell line. **J Exp Med**, New York, v. 170(1), p. 321-326, 1989.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol Today**, Limerick, Copenhagen, v.18, p. 487-492, 1997.

ENK, A.H.; KATZ, S.I. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. **J Immunol**, Bethesda, v. 149(1), p. 92-95, 1992.

ELLISEN, L.W.; BIRD, J.; WEST, D.C. TAN-1, the human homolog of the drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, Cambridge, v. 66, p. 649-61, 1991.

EL-SHERIF, A.M.; SETH, R.; TIGHE, P.J. JENKINS, D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. **J Pathol**, v. 195(2), p. 179-85, 2001.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER, G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, Heidelberg, v. 46(2), p. 120-128, 1997.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> (Acesso em 24/05/08).

EVANDER M., FRAZER I.H., PAYNE E., et al. Identification of the  $\alpha$ 6 integrine as a candidate receptor for papillomavirus. **J Virol**, v. 71, p. 5449-59, 1997.

FARZANEH, F.; ROBERTS, S.A.; MANDAL, D.; OLLIER, B.; WINTERS, U.; KITCHENER, H.C.; BRABIN, L. The IL-10 -1082 polymorphism is associated with clearance of HPV infection. **BJOG**, Oxford, v. 113, p. 961-4, 2006.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P.; PARKIN, D.M. GLOBOCAN 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1.1 **JARC Cancer Base** N°5, Lion: JARC Press 2001.

FERNANDES, A.P.M.; GONÇALVES, M.A.G.; SIMÕES, R.T.; QUINTANA, S.M.; DUARTE, G.; DONADI, E.A. Influência do HPV-16 sobre a produção intralesional de IL-10 em mulheres imonogeneticamente responsivas e portadoras do HIV-1. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 16 (3), p. 67-72, 2004.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J Immunol**, Bethesda, v. 146, n.10, p. 3444-3451, 1991b.



FODIL, N.; LALOUX, L.; WANNER, V.; PELLET, P.; HAUPTMANN, G.; MIZUKI, N.; INOKO, H.; SPIES, T.; THEODOROU, I.; BAHRAM, S. Allelic Repertoire of the human MHC Class I MICA Gene. **Immunogenetics**, New York, v. 44(5), p. 351-357.

FODIL, N.; PELLET, P.; LALOUX, L.; HAUPTMANN, G.; THEODOROU, I.; BAHRAM, S. *MICA* haplotypic diversity. **Immunogenetics**, New York, v. 49, p. 557–560, 1999.

FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P.; PRADO, J.M.; ROUSSEAU, M.C.; DÉSY, M. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for a cervical cancer. **J Infect Dis**, Chicago, v. 180, p. 1415-23, 1999.

FRAZER I., TINDLER R. Cell-mediated immunity to papillomaviruses. **Papillomavirus Report**, v. 3, p. 53, 1992.

FRIGOUL, A.; LEFRANC, M.P. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. **Research Signpost: Recent Research Development in Human Genetics**, Kerala, v. 3, p. 95-145, 2005.

FU, Y.X.; CHAPLIN, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 17, p. 399-433, 1999.

FUJII, D.; BRISSENDEN, J.; DERYNCK, R.; FRANKE, U. Transforming growth factor- $\beta$  gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. **Somat Cell Mol Genet**, New York, v. 12, p. 281, 1986.

GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. The proliferative effect of IFN- $\gamma$  in immune regulation. I. IFN- $\gamma$  inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J Immunol**, Bethesda, v. 140, p. 4245-4252, 1988.

GAMBELUNGHE, G.; FALORNI, A.; GHADERI, M.; LAURETI, S.; TORTOIOLI, C.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; SANJEEVI, C.B. Microsatellite polymorphism of the *MHC* class I chain-related (*MIC-A* and *MIC-B*) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v. 84(10), 1999.

GAMBELUNGHE, G.; BROZZETTI, A.L.; GHADERI, M.; TORTOIOLI, C.; FALORNI, A. *MICA* A8: a new allele within *MHC* class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. **Human Immunol**, New York, v. 67(12), p. 1005-1007, 2006.

GAO, X.; SINGLE, R. M.; KARACKI, P.; MARTI, D.; O'BRIEN, S. J.; CARRINGTON, M. Diversity of *MICA* and Linkage Disequilibrium with *HLA-B* in Two North American Populations. **Human Immunol**, New York, v. 67, p. 152-158, 2006.

GARLAND, S.M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. **Pathology**, v.34, p. 213-224, 2002.

GARNETT, T.O.; FILLIPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papillomavirus16, E6 impairs TRAIL mediated apoptosis. **Cell Death Differ**, London, v. 13, p. 1915-26.

GARZETTI, G.G.; CIAVATTINI, A.; MUZZIOLI, M.; GOTERI, G.; MANNELLO, B.; ROMANINI, C.; FABRIS, N. Natural killer cell activity in patients with invasive cervical carcinoma: importance of a longitudinal evaluation in follow-up. **Gynecol Obstet Invest**, v. 40(2), p. 133-8, 1995.

GERMANN, T.; PARTENHEIMER, A.; RUDE, E. Requirements for the growth of TH1 lymphocyte clones. **Europ J of Immunol**, Weinheim, v. 20(9), p. 2035-2040, 1990.

GHADERI, M.; HJELMSTRÖM, P.; HALLMANS, G.; WIKLUND, F.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. **MICA GENE POLYMORPHISM AND THE RISK TO DEVELOP CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. HUM IMMUNOL, NEW YORK**, v. 60(10), P. 970-3, 1999.

GHADERI, M.; NIKITINA, Z.L.; WALLIN, K.; WIKLUND, F.; HALLMANS, G.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. Tumor necrosis factor A and *MHC* class I chain related gene A (*MIC-A*) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. **Hum Immunol**, New York, v. 62, p. 1153 – 1158, 2001.

GIACOMELLI, R.; CIPRIANI, P.; FULMINIS, A.; BARATTELLI, G.; MATUCCI-CERINIC, M.; D'ALÒ, S.; CIFONE, G.; TONIETTI, G. Circulating  $\gamma/\delta$  T lymphocytes from systemic sclerosis (SSc) patients display a T helper (Th) 1 polarization. **Clin Exper Immunol**, Oxford, v. 125(2), p. 310-315, 2001.

GIBBS, V.C.; PENNICA, D. CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins. **Gene**, Amsterdam, v. 186(1), p. 97-101, 1997.

IULIANO, A.R.; HARRIS, R.; SEDJO, R.L.; BALDWIN, S.; ROE, D. PAPENFUSS, M.R. et al. Incidence, prevalence and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. **J Infect Dis**, Chicago, v. 186(4), p. 462-9, 2002.

GORDON, J.R.; GALLI, S.J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. **Nature**, London, v. 346, n. 6281, p. 274-276, 1990.

GOVAN, V.A.; CONSTANT, D.; HOFFMAN, M.; WILLIAMSON, A.L. The allelic distribution of the -308 Tumor Necrosis Factor - alpha gene polymorphisms in South African women with cervical cancer and control women. **BMC Cancer**, London, v. 26, p. 6-24, 2006.

GRAVITT, P.E.; PEYTON, C.L.; APPLE, R.J.; WHEELER, C.M. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. **J Clin Microbiol**, v. 36(10), p. 3020-7, 1998.

GRAVITT, P.E.; HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; SCHIFFMAN, M.; SHERMAN, M.E.; BRATTI, M.C.; RODRIGUEZ, A.C.; MORERA, L.A.; CARDENAS, F.; BOWMAN, F.P.; SHAH, K.V.; CROWLEY-NOWICK, P.A. Correlates of IL-10 e IL-12 concentrations in cervical secretions. **J Clin Immunol**, v. 23930, p. 175-83, 2003.

GRAY, P.W.; GOEDDEL, D.V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, London, v. 298, n. 5877, p. 859-863, 1982.

GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LOHDEN, M.; CLAUSS, M.; MAXEINER, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, Cambridge, v. 83, p. 793-802, 1995.

GROH, V.; RHINEHART, R.; SECRIST, H.; BAUER, S.; GRABSTEIN, K.H.; SPIES, T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived T<sub>V</sub> cells of *MICA* and *MICB*. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 96, p. 6879-6884, 1999.

GROH, V.; BRÜHL, A.; EL-GABALAWY, H.; NELSON, J.L, SPIES, T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in reumathoid arthritis. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.100, n. 16, p. 9452-9457, 2003.

GROH, V.; LI, Q.Y.; CIOCA, D.; HUNDE, N.H.; WANG, W.; RIDDELL, S.R.; YEE, C.; SPIES, T. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 102, p. 6461-66, 2005.

GRUBER, M.F.; WILLIAMS, C.C.; GERRARD, T.L. Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. **J Immunol**, Bethesda, v. 152(3), p. 1354-1361, 1994.

GUO, W.; MOURAD, W.; CHARRON, D.; AL-DACCAK, R. Ligation of MHC class II molecules differentially upregulates TNF- $\alpha$  gene expression in B cell lines of different MHC class II haplotypes. **Human Immunol**, New York, v. 60, p. 312-322, 1999.

HAGARI, Y.; BUDGEON, L.R.; PICKEL, M.D.; KREIDER, J.W. Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression and apoptotic cell death with regression of Shope papillomas. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 104, p. 526-529, 1995.

HARPER, D.M.; FRANCO, E.L.; WHEELER, C.; FERRIS, D.G.; JENKINS, D.; SCHUIND, A. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus type 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, London, v.364, p. 1757-65.

HAUSER, S.L. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. **Ann Neurol**, Boston, v. 38, p. 702-704, 1995.

HEMMINKI, K.; CHEN, B. Familial Risks for Cervical Tumors in full and half siblings: Etiologic Apportioning. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 15(7), p. 1413-4, 2006.

HILDESHEIN, A.; HERRERO, R.; CASTLE, P.E.; WACHOLDER, S.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E. et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. **Br J Cancer**, London, v. 84(9), p. 1219-26, 2001.

HO, A.S.; LIU, Y.; KHAN, T.A.; HSU, D.H.; BAZAN, J.F.; MOORE, K.W. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 90, p. 11267-11271, 1993.

HO, G.Y.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C.J., BURK, R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med**, Boston, v. 338(7), p. 423-8, 1998.

HOWELL, W.M.; TURNER, S.J.; BATEMAN, A.C.; THEAKER, J.M. IL-10 promoter polymorphisms influence tumor development in cutaneous malignant melanoma. **Genes Immun**, Basingstoke, v. 2, p. 25-31, 2001.

HUTCHINSON, I.V.; PRAVICA, V.; HAJEER, A; SINNOTT, P.J. Identification to high and low responders to allografts. **Rev immunol**, Paris, v. 1(3), p. 3

INCASSATI, A.; PATEL, D.; McCANCE, D.J.; Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16, E6. **Oncogene**, Basingstoke, v. 25, p. 2444-51, 2006.

IWASAKI, A.; KELSALL, B.L. Freshly isolated Peyer's patch, but not splun, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. **J Exp Med**, New York, v.190, p. 229-239, 1999.

JACOBS, M.V.; SNIJDERS, P. J.; VAN DEN BRULE, A. J.; HELMERHORST, T.J.; MEIJER, C.J., WALBOOMERS, J.M. A general primer GP5+/6+ - mediated PCR enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 35(3), p. 791-5, 1997.

JACOBS, N.; GIANNINI, SL.; DOYEN, J.; BAPTISTA, A.; MOUTSCHEN, M.; BONIVER, J. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 111, p. 219-24, 1998.

JACOBS, M.V.; WALBOOMERS, J.M.; ; SNIJDERS, P. J.; VOOORHORST, F.J.; VERHEIJEN, R.H.; FRANSEN-DAALMEIJER, N. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytological normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low risk types. **Int J Cancer**, New York, v. 87(2), p. 221-7, 2000.

JANEWAY, C.A.J; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHICK, M. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 5 ed. New York: Garland Publishing, 2001.

JOHNSON, J.D.; HOUCHENS, D.; KLUWE, W.M.; CRAIG, D.K.; FISHER, G.L. Effects of the mainstream and enviromental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: a review. **Crit Rev Toxicol**, Boca Raton, v. 20(5), p. 369-390, 1990.

JOHNSONS, D.R.; POBER, J.S. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. **Immunology**, Oxford, v. 87, p. 5183-5187, 1990.

JONES, E.Y.; STUART, D.I.; WALKER, N.P. Structure of tumor necrosis factor. **Nature**, London, v. 338, p. 225-228, 1989.

JUMNAINSONG, A.; ROMPHRUK, A. V.; JEARANAIKOON, P.; KLUMKRATHOK, K.; ROMPHRUK, A.; LUANRATTANAKORN, S.; LEELAYUWAT, C. Association of polymorphic extra-cellular domains of mica with cervical cancer in northeastern thai population. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 69, n. 4, p. 326-33, 2007.

KASAHARA, T.; HOOKS, J.J.; DOUGHERTY, S.F.; OPPENHEIM, J.J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells ad T cells subsets. **J Immunol**, Bethesda, v. 130(4), p. 1784-1789, 1983a.

KASAHARA, K.; DJEU, J.Y.; DOUGHERTY, S.F.; OPPENHEIM, J.J. Capacity of human large granular lymphocytes (LGL) to produce multiple lymphokynes: interleukin 2, interferon, and colony stimulating factor. **J Immunol**, Bethesda, v. 131(5), p. 2379-2385, 1983b.

KATSUYAMA, Y. ; OTA, M. ; ANDO, H. ; SAITO, S. ; MIZUKI, N. ; KERA, J. ; BAHRAM, S. ; NOSE, Y. ; INOKO, H. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of the MICA gene. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 54 (2), p. 178-184, 1999.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. **PLoS Genet**, San Francisco, v. 1(2), p.129-139, 2005.

KIM, J.M.; BRANNAN, C.I.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; KHAN, T.A.; MOORE, K.W. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **J Immunol**, Bethesda, v. 148(11), p. 3618-3623, 1992.

- KINGSLEY, D.M. The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 133-146, 1994.
- KIRKPATRICK, A.; BIDWELL, J.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; MEIJER, C.J.L.M.; PAWADE, J.; GLEW, S. TNF- $\alpha$  polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. **Gynecol Oncol**, New York, v. 92, p. 675-679, 2004.
- KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. **Science**, Washington, v. 258, p. 593-7, 1992.
- KISHIMOTO, T.; TAGA, T.; AKIRA, S. Cytokine signal transduction. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 253-262, 1994.
- KJAER, S.K.; CHACKERIAN, B.; VAN DEN BRULE, A.J.; SVARE, E.I.; PAULL, G.; WALBOMERS, J.M. et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins strating sexual activity (intercourse). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 6(10), p. 799-805, 2001.
- KLINGELHUTZ, A.J.; FOSTER, S.A.; McDOUGALL, J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type16. **Nature**, London, v. 380, p. 79-82, 1996.
- KOBAYASHI, Y.; ASADA, M.; OSAWA, T. Production of lymphotoxin and tumour necrosis factor by a T-cell hybridoma. **Immunology**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 213-217, 1997.
- KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J Exp Med**, New York, v. 170, n. 3, p. 827-845, 1989.
- KOHNO, T.; MIZUKAMI, H.; SUZUKI, M.; SAGA, Y.; TAKEI, Y.; SHIMPO, M.; MATSUSHITA, T.; OKADA, T.; HANAZONO, Y.; KUME, A.; SATO, I.; OZAKA, K. Interleukin-10- mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 63, p. 5091-94, 2003.
- KORNER, H.; COOK, M.; RIMINTON D.S.; LEMCKERT, F.A.; HOCK, R.M.; LEDERMANN, B.; KONTGEN, F.; SAINT GROTH, B.F.; SEDGWICK, J.D. Distinct roles for lymphotoxin- $\alpha$  and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. **Eur J Immunol**, Weinheim, v.27, p. 2600-2609, 1997.

KOTENKO, S.V.; IZOTOVA, L.S.; MIROCHNITCHENKO, O.V.; ESTEROVA, E.; DICKENSHEETS, H.; DONNELLY, R.P.; PESTKA, S. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. **J Biol Chem**, Bethesda, v. 276(4), p. 2725-2732, 2001.

KOTENKO, S.V.; KRAUSE, C.D.; IZOTOVA, L.S.; POLLACK, B.P.; WU, W.; PESTKA, S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 19, p. 5894-5903, 1997.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am J Med**, New York, v. 102(5A), p. 3-8, 1997.

KOUTSKY, L.A.; AULT, K.A.; WHEELER, C.M.; BROWN, D.R.; BARR, E.; ALVAREZ, F.B. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. **N England J Med**, Boston, v. 347, p. 1645-51, 2002.

KUBIN, M.; KAMOUN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. **J Exp Med**, New York, v. 180, n.1, p. 211-222, 1994.

KUBY, J. **Immunology**. 3.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 664p.

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat Rev Immunol**, London, v. 4, p. 211-22, 2004.

KWIATKOWSKI, D. Science, medicine, and the future: susceptibility to infection. **BMJ**, v. 321(7268), p. 1061-5, 2000.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, London, v. 19, p. 5444, 1991.

LE BON, A.; TOUGH, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type 1 interferon. **Curr Opin Immunol**, London, v.14, p. 432-6, 2002.

LE, J.M.; VILCEK, J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. **Lab Invest**, New York, v. 61, p. 588-602, 1989

LE, T.; LEUNG, L.; CARROL, W.L.; SCHIBLER, R. Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its up-regulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. **Blood**, New York, v. 89(11), p. 4112-4119, 1997.

LEE, B.N.; FOLLEN, M.; SHEN, D.Y.; MALPICA, A.; ADLER-STORTHZ, K.; SHEARER, W.T.; REUBEN, J.M. Depressed type 1 cytokine synthesis by super antigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, v. 11(2), p. 239-244, 2004.

LEELAYUWAT, C.; TOWNEND, D. C.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.; ABRAHAM, L. J.; DAWKINS, R. L. A new polymorphic and multi-copy MHC gene family related to nonmammalian class I. **Immunogenetics**, New York, v. 40 (5), p. 339-351, 1994.

LIU, X.; CLEMENTS, A.; ZHAO, K.; MARMORSTEIN, R. Estructure of huan papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanisms for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 281, p.578-86, 2006.

LIU, Y.; WEI, S.H.-Y.; HO, A .S.-Y.; DE WAAL MALEFYT, R.; MOORE, K.W. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. **J Immunol**, Bethesda, v. 152, p. 1821-1829, 1994.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, Cambridge, v. 104, p. 487-501, 2001.

LUTFALLA, G.; GARDINER, K.; UZE, G. A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. **Genomics**, Orlando, v. 16(2), p. 366-373, 1993.

MALEJCZYK J., MALEJCZYK M., BREITBURD F., ET AL. Progressive growth of human papillomavirus type 16 transformed keratinocytes is associated with an increased release of soluble tumour necrosis factor receptor. **Br J Cancer**, London, v. 74, p. 234-9, 1996.

MANOVA, K.; PAYNTON, B.V.; BACHVAROVA, R.F. Expression of activins and transforming growth factor  $\beta$ 1 e.  $\beta$ 2 RNAs in early postimplantation mouse embryos and uterine decidua. **Mech Dev**, Limerich, v. 36, p. 141, 1992

MANTOVANI, A.; BUSSOLINO, F.; INTRONA, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. **Immunol Today**, Cambridge, v. 18, p. 231-240, 1997.

MARIN, M. L. C.; SAVIOLI, C. R.; YAMAMOTO, J. H.; KALIL, J.; GOLDBERG, A. C. MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. **Eur J Immunogenet**, Oxford, v. 31(2), p. 63-71, 2004.

MARTINEZ, A.; FERNANDEZ-ARQUERO, M.; BALSAS, A., RUBIO, A.; ALVES, H.; PASCUAL-SALCEDO, D.; MARTIN-MOLA, E.; DE LA CONCHA, E.G. Primary association of a *MICA* allele with protection against rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.44, p. 1261-1265, 2001.



MARTINEZ-ESCRIBANO, J.A.; MOYA-QUILES, M.R.; MURO, M. Interleukin-10, interleukin-6 and interferon- $\gamma$  gene polymorphisms in melanoma patients. **Melanoma Res**, London, v.12, p. 465-469, 2002.

MASSAGUE, J. The transforming growth factor- $\beta$  family. **Annu Rev Cell Biol**, Palo Alto, v. 6, p. 597-674, 1990.

METCALF, D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haematopoietic cells. **Nature**, London, v. 339(6219), p. 27-30, 1989.

MIZUKI, N.; OTA, M.; KIMURA, M.; OHNO, S.; ANDO, H.; KATSUYAMA, Y.; YAMAZAKI, M.; WATANABE, K.; GOTO, K.; NAKAMURA, S.; BAHRAM, S.; INOKO H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the *MICA* gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease.: **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 94, p. 1298-1303, 1997.

McDEVITT, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 18, p. 1-17, 2000.

McGUIRK, P.; CANN, C.; MILK, K.H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 response by *Bordetella pertussis*. **J Exp Med**, New York, v. 195(2), p. 221-231, 2002.

MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN, S.; GRIFFIN, H.; SOTLAR, K.; NAKAHARA, T. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. **J Virol**, Washington, v. 77, p. 10186-201, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. Incidência de Câncer no Brasil. **Rio de Janeiro**, 2005. [Acesso em 03/2005]. Disponível em [www.inca.com.br/estimativa](http://www.inca.com.br/estimativa).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. **Rio de Janeiro**, 2006. [Acesso em 11/2007]. Disponível em [www.inca.com.br/estimativa/2006](http://www.inca.com.br/estimativa/2006).

MIYAJIMA, A.; KITAMURA, T.; HARADA, N.; YOKOTA, T.; ARAI, K. Cytokines receptor and signal transduction. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 10, p. 295-331, 1992.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F.; RICCARDO ROSSI, C.; NITTI, D.; LISE, M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptative immunity: putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v. 15, p. 61-76, 2004.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F.; YOUNG, H.A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **J Leukoc Biol**, New York, v. 78, p. 1043-51, 2005.

- MOSCICKI, A.B.; SHIBOSKI, S.; BROERING, J.; POWELL, K.; CLAYTON, L.; JAY, N.; et al. The natural history of the human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing and adolescent and young women. **J Pediatr**, St. Louis, v. 132, p. 277-84, 1998.
- MOELA-BARRIENTOS, E.; FERNANDÉZ-TILAPA, G.; DOMÍNGUEZ-ARREBILLA, S.; LLADES-AGUIAR, B.; MADRID, MV. Mensaje del L-6 em lesiones premalignas y cáncer cervical asociados a infección por VPH. Revista FASPYN- Especial Genética. **Monterrey**, v. 2, p. 15-21, 2000.
- MOLANO, M.; POSSO, H.; WEIDERPASS, E.; VAN EM BRULE, A.J.; RONDEROS, M.; FRANCESCHI, S. et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. **Br J Cancer**, London, v.87(3), p. 324-33, 2002.
- MOND, J.J.; CARMAN, J.; SARMA, C.; O'HARA, J.; FINKELMAN, F.D. Interferon-gamma suppresses B cell stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells. **J Immunol**, Bethesda, v. 137, n. 11, p. 3534-3537, 1986.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, Washington, v. 248, p. 1230-1234, 1990.
- MORENO, V.; BOSCH, F.X.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.; SHAH, K.V.; WALBOOMERS, J.M. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, London, v. 359 (9312), p. 1058-92, 2002.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W., GIEDLIN, M.A.; COFFMAN R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, Limerick, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann Rev Immunol**, Palo Alto, v. 7, p. 145-173, 1989a.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv Immunol**, New York, v. 46, p. 111-147, 1989b.
- MOSMANN, T.R.; SCHUMACHER, J.H.; FIORENTINO, D.F.; LEVERAH, J.; MOORE, K.W.; BOND, M.W. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. **J Immunol**, Bethesda, v. 145, n. 9, p. 2938-2945, 1990.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MOTA F., RAYMENT S., CHONG S., ET AL. The antigen environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 116, p. 33-40, 1999.

MULLER, M.; BRISCOE, J.; LAXTON, C.; GUSCHIN, D.; ZIEMIECKI, A.; SILVENNOINEN, O.; HARPUR, A.G.; BARBIERI, G.; WITTHUHN, B. A.; SCHINDLER, C. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and  $\gamma$ -signal transduction. **Nature**, London, v. 366 (6451), p. 129-135, 1993.

MUNOZ, N.; BOSCH, F.X.; D SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELSAGUE, X.; SHAH, K.V. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, London, v. 348(6), p. 518-27, 2003.

MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J.S. et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, London, v. 359 (9312), p. 1093-101, 2002.

MUÑOZ-SAAÍ, I.; CAMBRA, A.; PALLARÉS, A.; ESPINOSA, G.; JUAN, A.; PUJALTE, F.; MATAMOROS, N.; MILÀ, J.; JULIÀ, M.R. Allelic Diversity and Affinity Variants of MICA are Imbalanced in Spanish Patients with Behçet's Disease. **Scand J Immunol**, Oslo, v. 64(1), 2006.

NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B.Y. Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and anti-microbial activity. **J Exp Med**, New York, v. 158(3), p. 670-689, 1983.

NAYLOR, S.L.; SAKAGUCHI, A.Y.; SHOWS, T.B.; LAW, M.L.; GOEDDEL, D.V.; GRAY, P.M. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. **J Exp Med**, New York, v. 157(3), p. 1020-1027, 1983.

NEDWIN, G.E.; NAYLOR, S. L.; SAKAGUCHI, A.Y.; SMITH, D.; JARRETT-NEDWIN, J.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D.V.; GRAY, P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.13, p.6361-6372, 1985.

NARISAWA-SAITO, M.; HANDA, K.; YUGAWA, T.; OHNO, S.; FUJITA, M.; KIYONO, T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, p. 2988-96, 2007.

NIWA, Y.; AKAMATSU, H.; NIWA, H.; SUMI, H.; OZAKI, Y.; ABE, A. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course I patients with breast and cervical cancer. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 7, p. 285-9, 2001.

O'CONNOR, G.M.; HART, O. M.; GARDINER, C.M. Putting the natural killer cell in its place. **Immunology**, Oxford, v. 117, p. 1-10, 2005.

O'GARRA, A.; STAPLETON, G.; DHAR, V.; PEARCE, M.; SCHUMACHER, J.; RUGO, H.; BARBIS, D.; STALL, A.; CUPP, J.; MOORE, K. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. **Int Immunol**, Oxford, v. 2, n. 9, p. 821-832, 1990.

OHNO, I.; TANNO, Y.; YAMAUCHI, K.; TAKISHIMA, T. Gene expression and production of tumor necrosis factor by a rat basophilic leukaemia cell line (RBL-2H3) with IgE receptor triggering. **Immunology**, Oxford, v. 70, n. 10, p. 88-93, 1990.

OLD, L.J. Tumor necrosis factor. **Sci Am**, New York, v. 258, p. 41-49, 1988.

OLD, L.J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, Washington, v. 230, p. 630-632, 1985.

OLIFF, A. The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. **Cell**, Cambridge, v.54, p.141-142, 1988.

OPPENHEIM, D. E.; ROBERTS, S. J.; CLARKE, S. L.; FILLER, R.; LEWIS, J. M.; TIGELAAR, R. E.; GIRARDI, M.; HAYDAY, A. C. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. **Nature Immunol**, New York, v. 6(9), p. 928-937, 2005.

ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. **Br J Vener Dis**, London, v. 47, p. 1-13, 1971.

PACE, J.L.; RUSSELL, S.W.; TORRES, B.A.; JOHNSON, H.M.; GRAY, P.W. Recombinant mouse interferon- $\gamma$  induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. **J Immunol**, Bethesda, v. 130, n. 5, p. 2011-2013, 1983.

PAO, CC.; LYN, C.Y.; YAO, D.S.; TSENG, C.J. Differential expression of cytokines in cervical cancer tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 214(3), p. 1146-1151, 1995.

PARDO-GOVEA, T.; CALLEJAS, D.; NÚÑEZ-TROCONIS, J.; ARAUJO, M.; COSTA, L.; PONS, H.; DELGADO, M.; MONSALVE, F. expression de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 em células de neoplasias intraepiteliais de cuello uterino: Reporte preliminar. **Invest Clin**, Maracaibo, v. 46 (1), p.5-13, 2005.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, New York, v. 55(2), p. 74-108, 2005.

PAUL, W.E.; SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 2, p. 241-251, 1994.

PENDINO, F.; TARKANYI, I.; DUDOGNON, C. Telomeres and telomerase; Pharmacological targets for new anticancer strategies? **Curr Cancer Drugs Targets**, Hilversum, v. 6, p. 147-80, 2006.

PETERSDORF, E. W.; SHULER, K. B.; LONGTON, G. M.; SPIES, T.; HANSEN, J. A. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. **Immunogenetics**, New York, v. 49, p. 605-612, 1999.

PETERSSON, M.; CHARO, J.; SALAZAR-ONFREY, F.; NOTTZ, G.; MOHAUPT, M.; QIN, Z.; KLEIN, G.; BLANKENSTEIN, T.; KIESSING, R. Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. **J Immunol**, Bethesda, v. 161, p. 2099-2105, 1998.

PETERS, P.M.; ORTALDO, J.R.; SHALABY, M.R.; SVEDERSKY, L.P.; NEDWIN, G.E.; BRINGMAN, T.S.; HASS, P.E.; AGGARWAL, B.B.; HERBERMAN, R.B.; GOEDDEL, D.V. Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF-alpha but not TNF-beta (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. **J Immunol**, Bethesda, v. 137, n. 8, p. 2592-2598, 1986.

PEREZ-RODRIGUEZ, M.; CORELL, A.; ARGUELLO, J.R.; COX, S.T.; MCWHINNIE, A.; MARSH, S.G.; MADRIGAL, J.A. A new *MICA* allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 55, n. 2, p. 162-165, 2000.

PEYTON, C.L.; GRAVITT, P.E.; HUNT, H.C.; HUNDLEY, R.S.; ZHAO, M.; APPLE, R.J. et al. Determinants of human genital papillomavirus detection in a US population. **J Infect Dis**, Chicago, v. 183 (11), p. 1554-64, 2001.

PINHO-FRANÇA, P. Polimorfismo dos genes *MICA* e *MICB* e o Abortamento Espontâneo Recorrente. Curitiba: **Universidade Federal do Paraná**. Dissertação de mestrado, 2008.

PINTO, L.A.; CASTLE, P.E.; RODEN, R.B.; HARRO, C.D.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. et al. HPV-16 LI VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, p. 3555-64, 2005.

POPPE, W.A.; DRIJKONINGEN, M.; IDE, P.S.; LOWERINS, J.M.; VAN ASSCHE, F.A. Langerhans' cells and L1 antigen expression in normal and abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. **Gynecol Obstet Invest**, Basel, v. 41(3), p. 207-13, 1996.

PYO, C. W.; HUR, S. S.; KIM, Y. K.; CHOI, H. B.; KIM, T. Y.; KIM, T. G. Distribution of *MICA* Alleles and Haplotypes Associated With HLA in the Korean Population. **Human Immunol**, New York, v. 64(3), p. 378-384, 2003.

RAFIQ, K.; CHARITIDOU, L.; BULLENS, D.M.; KASRAN, A.; LORRE, K.; CEUPPENS, J.; VAN GOOL, S.W. Regulation of the IL-10 production by human T cells. **Scand J Immunol**, Oslo, v. 53(2), p. 139-47, 2001.

RAMMENSEE, H.G.; BACHMANN, J.; STEVANOVIĆ, S. **MHC ligands and peptide motifs**. Austin: Landes Bioscience, 1997.

RANGARAJAN, A.; TALORA, C.; OKUYAMA, R. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. **Embo J**, Oxford, v. 20, p.3427-36, 2001.

RASHIDBAIGI, A.; LANGER, J.A.; JUNG, V.; JONES, C.; MORSE, H.G.; TISCHFIELD, J.A.; TRILL, J.J.; KUNG, H.F.; PESTKA, S. The gene for the human immune interferon receptor is located on chromosome 6. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 83, n. 2, p. 384-388, 1986.

REIBMAN, J.; MEIXLER, S.; LEE, T.C.; GOLD et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypass classic signal-transduction pathways. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 88, p. 6805-6809, 1991.

RIBAS, F.Z. Polimorfismo do gene *MICA* e seu desequilíbrio de ligação com *HLA-B*. Curitiba: **Universidade Federal do Paraná**. Dissertação de mestrado, 2006.

RICHARDS, A.L.; OKUNO, T.; TAKAGAKI, Y.; DJEU, J.Y. Natural cytotoxic cell-specific cytotoxic factor produced by IL-3-dependent basophilic/mast cells. Relationship to TNF. **J Immunol**, Bethesda, v. 141, n. 9, p. 3061-3066, 1988.

RIETSCHEL, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A .J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PALOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**, Bethesda, v. 8, n. 2, p. 217-225, 1994.

RINDERKNECHT, E.; O'CONNOR, B.H., RODRIGUEZ, H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. **J Biol Chem**, Bethesda, v. 259, n. 11, p. 6790-6797, 1984.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Recent progress in the tumor necrosis factor- $\alpha$  field. **Int Arch Allergy Immunol**, Basel, v.111, p.199-209, 1996.

RIVAS, J.M.; ULLRICH, S.E.; Systemic supression of delayed-type hipersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. **J Immunol**, Bethesda, v. 149, n. 12, p. 3865-3871, 1992.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M.B. Differential expression of the TGF- $\beta$ 1 isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. **Mol Reprod Dev**, New York, v. 32, p. 92-97, 1992.

ROBERTSON, S.A.; INGMAN, W.V.; O'LEARY, S.; SHARKEY, D.J.; TREMELLEN, K.P. Transforming growth factor  $\beta$  - a mediator of immune deviation in seminal plasma. **J Reprod Immunol**, Shannon, v. 57, p. 109-128, 2002.

- ROMPHRUK, A. V. ; ROMPHRUK, A. ; CHOONHAKARN, C. ; PAUPAIROJ, C.; INOKO, H. ; LEELAYUWAT, C. Major histocompatibility complex class I chain-related gene A in Thai psoriasis patients: MICA association as a part of human leukocyte antigen-B-CW haplotypes. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 63(6), p. 547-554, 2004.
- RONCO, L.V.; KARPOVA, A.Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 2061-72, 1998.
- RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LÓPEZ-NEVOT, M.A.; GONZÁLEZ, E.; MARTÍN, J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60(6), p. 526-528, 2002.
- SALAZAR-ONFRAY, F.; PETERSSON, M.; FRANKSSON, L.; et al. IL-10 converts mouse lymphoma cells to a CTL resistant, NK-sensitive phenotype with low but peptide inducible MHC class I expression. **J Immunol**, Bethesda, v. 154, p. 6291-8, 1995.
- SANJEEVI, C.B.; GAMBELUNGHE, G.; FALORNI, A.; SHTAUVERE-BRAMEUS, A.; KANINGO, A. Genetics of latent autoimmune diabetes in adults. **NY Acad Sci**, v. 958, p. 107-111, 2002.
- SCHEFFNER, M.; WHITAKER, N.J. Human papillomavirus induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. **Semin Cancer Biol**, Philadelphia, v. 13, p. 59-67, 2003
- SCHLECH RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LÓPEZ-NEVOT, M.A.; GONZÁLEZ, E.; MARTÍN, J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. Copenhagen: **Tissue Antigens**, v. 60, n. 6, p. 526-528, 2002.
- T, N.F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R.A. et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, Chicago, v. 286(24), p. 3106-14, 2001.
- SCHNEIDER A., PAPENDICK U., GISSMANN L., DE VILLIERS E.M. Interferon treatment of human genital papillomavirus infection: importance of viral type. **Int J Cancer**, New York, v. 40, p. 610-4, 1987.
- SCHNEIDER, S.; KUEFER, J.M.; ROESLLI, D.; EXCOFIER, L. ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 1.1. **Genetics and Biometry Laboratories**, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- SCHRODER J.M. Cytokine networks in the skin. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 105, p. 20S-4S, 1995.
- SCOTT M., STITES D.P., MOSCICKI A.B. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, v. 6, p. 751-5, 1999.

SCOTT, ME.; MA, Y.; FARHAT, S.; SHIBOSKI, S.; MOSCICKI, A.B. Covariates of cervical cytokines mRNA expression by real time PCR in adolescents and young women: effects of Chlamydia trachomatis infection, hormonal contraception and smoking. **J Clin Immunol**, New York, v. 26(3), p. 222-3, 2006.

SHIRAI, T.; YAMAGUCHI, H.; ITO, H.; TODD, C.W.; WALLACE, R.B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. **Nature**, London, v. 313, p. 803-806, 1985.

SHRESTHA, S.; WANG, C.; AISSANI, B.; WILSON, C.M.; TANG, J.; KALOW, R.A. Interleukin-10 gene polymorphisms and human papillomavirus clearance among immunosuppressed adolescents. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 16(8), p. 1626-32, 2007.

SHUAI, K.; STARK, G.R.; KERR, I.M.; DARNELL, J.E., Jr. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- $\gamma$ . **Science**, Washington, v. 261, n. 5129, p. 1744-1746, 1993.

SHULL, M.M.; ORMBBSBY, I.; KIER, A.B. et al. Targeted disruption of mouse TGF- $\beta$ 1. Gene results in multifocal inflammatory disease, **Nature**, London, v. 359, p. 693-696, 1990.

SKOV, S.; PEDERSEN, M. T.; ANDRESEN, L.; STRATEN, P. T.; WOETMANN, A.; ODUM, N. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. **Cancer Res**, Chicago, v. 65(23), p. 11136-11145, 2005.

SNAPPER, C.M.; PESCHEL, C.; PAUL, W.E. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells Stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **J Immunol**, Bethesda, v. 140, n. 7, p. 2121-2127, 1988.

SOH, J.; DONELLY, R.J.; KOTENKO, S.; MARIANO, T.M.; COOK, J.R.; WANG, N.; EMANUEL, S.; SCHWARTZ, B.; MIKI, P.; PESTKA, S. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon  $\alpha$  receptor. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 5, p. 793-802, 1994.

SONG, SH; LEE, JK; SEOK, OS; SAW, HS. The relationship between cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, New York, v. 104(3), p. 732-8, 2007.

SONG, SH; LEE, JK; LEE, NW; SAW, HS; KANG, JS; LEE, KW. Interferon - $\gamma$ : A possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus. **Gynecol Oncol**, New York, v. 108(3), p. 543-8, 2008.

SPENCER, S.D.; DI MARCO, F.; HOOLEY, J.; PITTS-MEEK, S.; BAUER, M.; RYAN, A .M.; SORDAT, B.; GIBBS, V.C.; AGUET, M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. **J Exp Med**, New York, v. 187, n. 4, p. 571-578, 1998.



SPITTLER, A.; SCHILLER, C.; WILHEIM, M.; TEMPFER, C.; WINKLER, S.; BOLTZ-NITULESCU, G. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. **Immunology**, Oxford, v. 85(2), p. 311-317, 1995.

STANCZUK, G.A.; SIBANDA, E.N.; PERREY, C.; CHIRARA, M.; PRAVICA, V.; HUTCHINSON, I.V.; TSWANA, S.A. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **Int J Cancer**, New York, v. 94(6), p. 792-4, 2001.

STANCZUK, G.A.; SIBANDA, E.N.; TSWANA, S.A.; BERGSTROM, S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, Cambridge, v. 13(2), p. 148-53, 2003.

STANLEY, M.A. Human papillomavirus vaccines. **Curr Opin Mol Ther**, London, v. 4, p. 15-22, 2002.

STEARNS, M.E.; RHIM, J.; WANG, M. Interleukin-10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 5, p. 189-96, 1999.

STEFFEN, M.; ABOUD, M.; POTTER, G.K.; YUNG, Y.P.; MOORE, M.A. Presence of tumor necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells. **Immunology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 445-450, 1989.

STERLING, J.C.; SKEPPER, J.N.; STANLEY, M.A. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. **J Invest Dermatol**, New York, v. 100, p. 154-8, 1993.

STEWART, C. A.; HORTON, R.; ALLCOCK, R. J.; ASHURST, J. L.; ATRAZHEV, A. M.; COGGILL, P.; DUNHAM, I.; FORBES, S.; HALLS, K.; HOWSON, J. M.; HUMPHRAY, S. J.; HUNT, S.; MUNGALL, A. J.; OSOEGAWA, K.; PALMER, S.; ROBERTS, A. N.; SIMS, S.; WANG, Y.; WILMING, L. G.; ELLIOTT, J. F.; de JONG, P. J.; SAWCER, S.; TODD, J. A.; TROWSDALE, J.; BECK, S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. **Genome Res**, New York, v. 14, p. 1176-1187, 2004.

STEINLE, A.; LI, P.; MORRIS, D. L.; GROH, V.; LANIER, L. L.; STRONG, R. K.; SPIES, T. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB and homologs of the mouse rae-1 protein family. **Immunogenetics**, New York, v. 53(4), p. 279-287, 2001.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. **Imunologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 689p.

SYTO, R.; MURGOLO, N.J.; BRASWELL, E.H.; MUI, P.; HUANG, E.; WINDSOR, W.T. Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. **Biochemistry**, Moscow, v. 37, p. 16943-16951, 1998.

TAKANASHI, S.; NONAKA, R.; XING-ZHOU, O.; BYRNE, P.; DOLOVICH, J. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. **J Exp Med**, New York, v. 180, n. 2, p. 711-714, 1994.

TAMADA, H.; MC MASTER, M.T.; FLANDERS, K.C.; ANDREWS, G.K.; DEY, S.K. Cell-type specific expression of transforming growth factor  $\beta$ -1 in the mouse uterus during the peri-implantation period. **Mol Endocrinol**, Baltimore, v. 4, p. 965, 1990.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunol Today**, Cambridge, v. 13, p. 151-153, 1992.

TARTOUR, E.; GEY, A.; SASTSRE-GAROU, X.; LOMBARD, S.I.; MOSSERI, V.; FRIDMAN, W.H. Prognostic value of intra-tumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, p. 287-94, 1998.

TAY, S.K.; JENKINS, D.; MADDOX, P.; CAMPION, M.; SINGER, A. Subpopulation of the Langerhans' cells in cervical neoplasia. **Br J Obstet Gynaecol**, London, v. 94, p. 10-15, 1987.

THEOFILOPOULOS, A.N.; BACCALA, R.; BEUTLER, B.; KONO, D.H. Type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v. 23, p. 307-36, 2005.

THOMAS, M.; BANKS, L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. **J General Virol**, London, v. 80, p. 1513-17. 1999.

THOMPSON-SNIPES, L.; DHAR, V.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W.; RENNICK, D.M. Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **J Exp Med**, New York, v. 173, n. 2, p. 507-510, 1991.

TIAN, W.; BOGGS, D. A.; UKO, G.; ESSIET, A.; INYAMA, M.; BANJOKO, B.; ADEWOLE, T.; DING, W. Z.; MOHSENI, M.; FRITZ, R.; CHEN, D. F.; PALMER, L. J.; FRASER, P. A. MICA, HLA-B haplotypic variation in five population groups of sub-Saharan African ancestry. **Genes Immun**, Houndmills, v. 4(7), p. 500-505, 2003.

TIENG, V.; LE BOUGUÉNEC, C.; DU MERLE, L.; BERTHEAU, P.; DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; CHARRON, D.; TOUBERT, A. Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 99(5), p. 2977-2982, 2002.

TJONG, MY.; VAN DER VANGE, N.; TEN KATE, F.J.; TJONG-A-HUNG, SP.; TER SCHEGGET, J.; BURGER, MP. Increased IL-6 e IL-8 levels in cervico vaginal secretions of patients of cervical cancer. **Gynecol Oncol**, New York, v. 73, p. 285-91, 1999.

TORRICO, F.; HERECHEGGET MANS, H.; RIVERA, M.T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol**, Bethesda, v. 146, n. 10, p. 3626-3632, 1991.

TOSATO, G.; SEAMON, K.B.; GOLDMAN, N.D.; SEHGAL, P.B.; MAY, L.T.; WASHINGTON, G.C.; JONES, K.D.; PIKE, S.E. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta-2 (BSF-2, IL-6). **Science**, v. 239, p. 502-504, 1988.

TRENT, J.M.; OLSON, S.; LAWN, R.M. Chromosomal localization of human leukocytes, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 79, n. 24, p. 7809-7813, 1982.

TSUKUI T., HILDESHEIM A., SCHIFFMAN M.H., et al. Interleukin 2 production *in vitro* by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. **Cancer Res**, Baltimore, v. 56, p. 3967-74, 1996.

TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Desativation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$ . **Nature**, London, v. 334, p. 260, 1988.

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M., SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene. **Eur J Immunogenetics**, Oxford, v. 24, p. 45, 1997.

VASSARSTATS: *web site* para estatística. Disponível em: [www.faculty.vassar.edu/lowry/vshome.html](http://www.faculty.vassar.edu/lowry/vshome.html)

VAN DEN BRULE, A.J.; POL, R.; FRANSEN-DAALMEIJER, N.; SCHOULS, L.M.; MEIJER, C.J.; SNIJDERS, P.J. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. **J Clin Microbiol**, v. 40(3), p. 779-87, 2002.

VELDMAN, T.; LIU, X.; YUAN, H.; SCHLEGEL, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to a cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100, p. 8211-16, 2003.

VIEIRA, P.; de WAAL-MALEFYT, R.; DANG, M.N.; FIORENTINO, D.F.; de VRIES, J.E.; RONCAROLO, M.G.; MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 88, p. 1172-1176, 1991.

VILLA, L.L.; COSTA, R.L.R.; PETTA, C.A.; ANDRADE, R.P.; AULT, K.A.; GIULIANO, A.R. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 e 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncol**, London, v. 6, p. 271-8, 2005.

WAHL, S.M. Transforming growth factor  $\beta$  in inflammation: a cause and a cure. **J Clin Immunol**, New York, v. 12, p. 61-74, 1992.

WAHL, S.M.; HINES, K.L.; CHRIST, M. et al. Adhesion, recruitment, and activation of mononuclear phagocytes in inflammation. **J Leukoc Biol**, New York, v. 54, p.74-81, 1993.

WAKEFIELD, L.M.; SMITH, D.M.; FLANDERS, K.C.; SPORN, M.B. Latent transforming growth factor  $\beta$  from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 263, p. 7646, 1988.

WALTER, M.R.; NAGABHUSHAN, T.L. Crystal structure of interleukin-10 reveals an interferon  $\gamma$ -like fold. **Biochemistry**, Washington, v. 34, p. 12118-12125, 1995.

WALTER, M.R.; WINDSOR, W.T.; NAGABHUSHAN, T.L.; LUNDELL, D.J.; LUNN, C. A.; ZAUODNY, P.J.; NARULA, S.K. Crystal structure of a complex between interferon- $\gamma$  and its soluble high affinity receptor. **Nature**, London, v. 367, p. 230-235, 1995.

WATANABE, Y.; JACOB, C.O. Regulation of MHC class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on IFN- $\gamma$ -induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell. **J Immunol**, Bethesda, v. 146, p. 899-905, 1991.

WATLING, D.; GUSCHIN, D.; MULLER, M.; SILVENNOINEN, O.; WTTUHN, B.A.; QUELLE, F.W.; ROGERS, N.C.; SCHINDLER, C.; STARK, G.R.; IHLE, J.N.; KERR, I.M. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon- $\gamma$  signal transduction pathway. **Nature**, London, v. 366, n. 6451, p. 166-170, 1993.

WERNES, B.A.; LEVINE, A.L.; HOWLEY, P.M. Association of human papillomaviruses type 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, p. 76-79, 1990.

WHO.IARC. Monographs on the evaluation and carcinogenic risks to human. Human Papillomavirus. Lyon, p. 64, 1995.

WILLIAMS, J.G.; JURKOVICH, G.J.; MAIER, R.V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 79-93, 1993.

WONG, G.H.W.; TARTAGLIA, L.A.; LEE, M.S.; GOEDEL, D. Antiviral activity of tumor necrosis alpha is signaled through the 55-kDa type I TNF receptor. **J Immunol**, Bethesda, v. 149, p. 3550-3553, 1992.

WOODWORTH C.G., SIMPSON S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized and carcinoma cell lines. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 142, p. 1544-55, 1993.

WU R., COLEMAN N., HIGGINS G. Lymphocyte-mediated cytotoxicity to HPV 16 infected cervical keratinocytes. In: Stanley, M.A. **Immunology of Human Papillomaviruses**. Plenum Press, New York, p. 255-9, 1994.

WU, C.Y.; DEMEURE, C.; KINIWA, M.; GATELY, M.; DELESPESE, G. IL-12 induces the production of IFN- $\gamma$  by neonatal human CD4 T cells. **J Immunol**, Bethesda, v. 151(4), p. 1938-1949, 1993.

YANG, L.; CARBONE, D. P. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. **Adv. Cancer Res**, New York, v. 92, p. 13-27, 2004.

YANG, Y.; CHANG, J.F.; PARNES, J.R.; FATHMAN, C.G. T cell receptor (TCR) engagement leads to activation-induced splicing of tumor necrosis factor (TNF) nuclear pre-mRNA. **J Exp Med**, New York, v. 188, p. 247-254, 1998.

YELEVARTHI, K.K.; HUNT, J.S. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor messenger RNA and protein in human placentas. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 143, p. 1131, 1993.

YOUNG, H.A.; ORTALDO, J.R. One-signal requirement for interferon-gamma production by human large granular lymphocytes. **J Immunol**, Bethesda, v. 139(3), p. 724-727, 1987.

YOUNG, H.A.; HARDY, K.J. Role of interferon- $\gamma$  in immune cell regulation. **J Leukoc Biol**, Bethesda, v. 58(4), p. 373-381, 1995.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X.F.; ACHONG, M.K. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory. **J Clin Invest**, New Haven, v.101, p. 311-320, 1998.

ZHANG, Y.; LAZARO, A. M.; ZOU, Y.; LAVINGIA, B.; MORAES, E. M.; MORAES, R. J.; STASTNY, P. MICA polymorphism in South American Indians. **Immunogenetics**, New York, v. 53(10-11), p. 900-906, 2002.

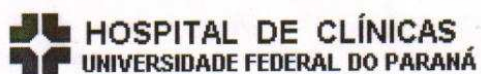
ZDANOV, A.; SCHALK-HIHI, C.; GUSTCHINA, A.; TSANG, M.; WEATHERBEE, J.; WLODAWER, A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon- $\gamma$ . **Structure**, London, v. 3, p. 591-601, 1995.

ZDANOV, A.; SCHALK-HIHI, C.; WLODAWER, A. Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. **Protein Sci**, New York, v. 5, p. 1955-1962, 1996.

ZDANOV, A.; SCHALK-HIHI, C.; MENON, S.; MOORE, K.W.; WLODAWER, A. Crystal structure of Epstein-Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10. **J Mol Biol**, London, v. 268, p. 460-467, 1997.

ZOODSMA, M.; NOLTE, I.M.; SCHIPPER, M.; OOSTEROM, E.; VAN DER STEEGE, G.; DE VRIES, E.G.; TE MEERMAN, G.J.; VAN DER ZEE, A.G. Interleukin-10 and Fas polymorphism and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. **Int J Gynecol Cancer**, Cambridge, v. 15(3), p. 282-90, 2005.

**ANEXOS**



Curitiba, 02 de maio de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Maria da Graça Bicalho**  
Nesta

Prezada Pesquisadora:

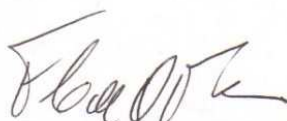
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE GENES DE CITOCINAS E CARCINOMAS DE COLO UTERINO ASSOCIADO À INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 26 de abril de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0033.0.208.000-05**  
**Protocolo CEP: 1008.047/2005-04**

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do primeiro relatório: 02 de novembro de 2005.**

Atenciosamente,



**Flávio de Queiroz Telles Filho**  
Vice Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR





### Comunicado de Aprovação de Projeto


Curitiba, 29 de setembro de 2006.

À Pesquisadora  
Maria da Graça Bicalho

Prezado Pesquisador,

Comunicamos que seu projeto de Pesquisa de nº 1411: "Polimorfismo Genético, Dosagem Plasmática de Citocinas e Displasias Cervicais Associadas ao HPV" foi aprovado pelo CEPEP no dia 29/09/2006 e pode ser iniciado de imediato. Ressaltamos que seja citado o nome do Hospital Erasto Gaertner como participante do desenvolvimento do projeto.

Atenciosamente,

  
Andressa Krause Miranda  
CEPEP - Pesquisa

**Relatório Parcial Previsto  
para:**

**Março/2007**

LIGH- LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA E HISTOCOMPATIBILIDADE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA- UFPR  
PROJETO: POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS E DISPLASIAS  
CERVICAIS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.

## ANAMNESE

 PACIENTE CONTROLE

## DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO/ ANÁTOMO-PATOLÓGICO

 NIC I NIC II NIC III

## 1) IDENTIFICAÇÃO

nº LIGH:

Nome (iniciais):

Data nasc.:

Idade:

Grupo Étnico:

Estado civil:

Escolaridade:

## 2) História pregressa:

Doenças agudas:  NÃO  SIM QUAIS ?Doenças crônicas:  NÃO  SIM QUAIS ?Doenças auto-ímmunes:  NÃO  SIM QUAIS ?Uso de medicações:  NÃO  SIM QUAIS ?

## 3) Antecedentes Ginecológicos

Início Atividade sexual:

< 14 anos       14-19 anos       >19 anos

Número de parceiros sexuais:

1       2       ≥3

Uso de método anticoncepcional oral:

- a) nunca
- b) às vezes
- c) regularmente (pelo menos 3 meses consecutivos)

Uso de preservativo masculino:

- a) nunca
- b) às vezes
- c) regularmente (pelo menos 3 meses consecutivos)

História de DST:

Chlamídia, gonorréia, sífilis, trichomonas, gardnerella ou outras?

Quantos Exames de Papanicolaou já realizou?

- Nunca tinha realizado
- 1
- 2
- 3 ou mais

4) Tabagismo

- NÃO       Nunca fumou
- Parou de fumar       Fumou por .....       Parou há.....
- SIM      Há quanto tempo?.....      Quantidade cigarros /d :
- .....

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

- a)** Você está sendo convidado a participar como paciente ( ) ou como controle ( ) de um estudo genético intitulado "POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE GENES DE CITOCINAS E CARCINOMA DE COLO UTERINO ASSOCIADO À INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO". É através das pesquisas, inclusive básica, que ocorrem os avanços na Medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b)** Este trabalho tem como objetivo pesquisar as possíveis diferenças no sistema de defesa do organismo que levariam a maioria das mulheres a eliminar o HPV (papilomavirus humano), que é um vírus transmitido através de relações sexuais desprotegidas, e que em algumas mulheres persiste por mais tempo, podendo levar a alterações no exame preventivo e até ao câncer de colo uterino. A participação de controles (indivíduos saudáveis, sem infecção por HPV) neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre pessoas saudáveis e portadoras da infecção por HPV poderemos chegar a conclusões importantes, que podem ser úteis no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, vacinas ou até medicamentos.
- c)** Caso você participe da pesquisa, será necessário apenas que você forneça uma amostra de sangue (10 ml) coletada de uma veia periférica, com seringas e agulhas esterilizadas, de onde o DNA (material genético) será extraído.
- d)** O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam dano a pacientes ou controles.
- e)** Não há riscos para você.
- f)** Para tanto você deverá comparecer ao LIGH-Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, ou no Hospital de Clínicas-UFPR, para a coleta do sangue.
- g)** Neste estudo iremos investigar a presença de associação entre os polimorfismos dos genes de citocinas: *IL6*, *TNF*, *IL10*, *TGFB1* e *IFNG* e os níveis séricos das citocinas relacionadas a estes genes, e sua influência na

infecção por HPV, bem como sua progressão para displasias e carcinoma cervicais.

h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa, inclusive acesso aos resultados, se for de sua vontade.

i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa.

j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas apenas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade/sigilo seja mantida. Não será permitido o acesso de terceiros (Seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, etc.) aos resultados.

l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles.

m) Pela sua participação na pesquisa, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código, para sua proteção quanto a qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva.

o) As pesquisadoras responsáveis pelo projeto são: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho - fone: 3361-1729 (Laboratório), cel.: 9973-5855 e Dr.<sup>a</sup> Renate von Linsingen – 9936-9093.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado à coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/controle      Data      Pesquisador