

ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DA IL-10 RELACIONADO COM A INFECÇÃO DO HPV E PROGRESSÃO PARA O CÂNCER CERVICAL EM MULHERES DO AGRESTE ALAGOANO.

Jean M. Ferreira^{1*}, Bárbara R. Correia dos Santos¹, Edilson L. de Moura¹, Ana Caroline M. dos Santos², Karol F. de Farias², Elaine Virginia M. de Souza Figueiredo³

1. Estudante de IC da Universidade Federal de Alagoas - UFAL

2. Pesquisadora da Universidade Federal de Alagoas - UFAL

3. Professora da Universidade Federal de Alagoas / Orientadora

Resumo:

O câncer do colo do útero (CC) tem relação com a infecção por HPV, porém, cofatores como SNPs parecem estar envolvidos, como os do gene da IL-10. Nosso objetivo foi analisar a influência do SNP -819 (C→T) desse gene entre mulheres com CC e HPV e pacientes saudáveis. Os Casos foram formados por pacientes com NIC e HPV, enquanto os Controles foram gerados pelas pacientes com citologia regular. A detecção do polimorfismo e a confirmação da presença viral foram realizadas por PCR em tempo real e PCR Nested, respectivamente. Os softwares utilizados foram o BioEstat versão 5.0 para análises estatísticas e SNPstats para análise associativa. Não foram observadas diferenças significativas entre as proporções genótipos e alélicas dos grupos Casos e Controles. O genótipo T/T foi mais frequente nos Controles. Nossos resultados não mostraram relação do SNP com o CC, entretanto, a influência de polimorfismos desse gene já foi estabelecida em tipos cancerosos em diferentes populações estudadas.

Autorização legal: O projeto foi submetido na Plataforma Brasil e ao comitê de ética da Universidade Federal de Alagoas, com aprovação sob parecer 921.700 (janeiro, 2015).

Palavras-chave: Citocinas; SNPs; Papilomavírus Humano.

Apoio financeiro: Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL.

Introdução:

O Papilomavírus Humano (HPV) é um agente infeccioso comum do trato urogenital. Uma porcentagem significativa dos casos de câncer do colo do útero (CC) está envolvida com HPV, nesta perspectiva, o papel etiológico do vírus tornou-se de grande importância na prevenção e entendimento do desenvolvimento da doença (WHO, 2015). Cerca de 500 mil casos de câncer cervical ocorrem por ano, acarretando em 270 mil fatalidades (WHO, 2015). No Brasil, o número de mortes por câncer do colo do útero aumentou 28,6% em 10 anos, passando de 4.091 óbitos, em 2002, para 5.264, em 2012 (AMÉRICO, 2015).

O HPV pertence à família Papillomaviridae, que apresenta mais de 100 tipos diferentes, subdivididos em de baixo risco e de alto risco (DE MELO et al, 2012). Apenas uma parcela das mulheres infectadas por vírus considerados de alto risco desenvolve o câncer cervical. Portanto, a infecção por HPV não é um fator exclusivo para a evolução do câncer cervical (HOORY et al., 2008).

Outros fatores juntamente com a infecção por HPV podem estar envolvidos no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais, como: imunidade/genética do hospedeiro, fatores ambientais e cofatores externos (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002). Muitos estudos têm investigado diversos fatores que podem estar associados ao desenvolvimento destas neoplasias, dentre estes se destacaram as variações na resposta imune do hospedeiro (CAMARA et al., 2008). Essas variações são associadas a diversos SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) que presentes em genes do sistema imunológico podem influenciar nos níveis de expressão gênica, modificar a estrutura ou a função das proteínas (CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006; DETTOGNI et al.).

Estudos têm investigado a possível associação de SNPs presentes no gene da citocina da interleucina-10 (IL-10) na

susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias (BARBISAN et al., 2012; GOVAN et al., 2006). O objetivo desta pesquisa foi analisar a influência do polimorfismo do gene *IL10* na posição -819 (SNP rs1800871 [C→T], região promotora) entre mulheres com neoplasias cervicais e infectadas por HPV e pacientes saudáveis, comparando os resultados com polimorfismos identificados com outras populações estudadas.

Metodologia:

Foram coletadas amostras sanguíneas periféricas (ASP) (4 mL) e de células cervicais esfoliadas através de swab (ACE) de mulheres alagoanas atendidas pelo SUS, todas as participantes assinaram o termo de consentimento e livre esclarecimento (TCLE). As amostras foram coletadas entre 2015-2016 e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular Expressão Gênica (LABMEG) da UFAL – *Campus Arapiraca*. As amostras de ASP e ACE foram armazenadas à -4 e -80 °C, respectivamente.

Os Casos foram formados pela presença de NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) e confirmação da presença do HPV. O grupo de Controles foi formado a partir do resultado do exame citológico sem indicações de alterações celulares, todos os Controles realizaram teste de detecção do HPV.

O DNA genômico humano foi obtido pelo Kit Qiagen através das ASP com EDTA (FlexiGene® DNA Handbook - Qiagen), enquanto o DNA viral foi obtido por meio das ACE pelo Kit comercial PROMEGA (Wizard® Genômico DNA Purification – PROMEGA, Company Eppendorf, Hamburg, Germany), seguindo em ambos os casos as instruções do fabricante.

As concentrações do DNA foram lidas usando Espectrofotômetro (Biophotometer plus - Eppendorf). Em seguida o material foi visualizado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para verificação da qualidade do DNA, que foi armazenado à -20 °C em tubos de 1,5 mL.

A detecção do polimorfismo foi realizada por PCR em tempo real. As reações foram realizadas em equipamento ABI StepOne plus da Applied Biosystems®. Os resultados foram fornecidos pelo software do aparelho.

A presença viral foi confirmada pelo método de PCR Nested, onde, após a realização de PCR convencional com o par de primer MY09/MY11 (fragmento de 450 pb, comum a alguns tipos de HPV), parte do produto foi usado em uma nova PCR com os primers GP5+/GP6+ (amplificando um

fragmento de 150 pb, que é comum em um grupo de vírus diferentes dos amplificados pelos primers MY09/MY11), aumentando a sensibilidade à presença do vírus (Nested). Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose à 2%, corado com brometo de etídio, onde a visualização de quaisquer bandas (450/150 pb) indica a presença de um ou mais tipos de HPV. Todas as reações foram acompanhadas de um controle usando os primers Hs_βact_Fw/Hs_βact_Rv (β-actina Humana).

As frequências genóticas e alélicas foram calculadas no Microsoft® Office Excel. A análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2) usando a tabela 2X2, (IC $\alpha > 5\%$). O software utilizado para análises estatísticas foi o BioEstat versão 5.0. Para a análise de associação foi utilizado o SNPstats software (2006; <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>), onde os modelos genéticos variados foram considerados para avaliar o risco de associação do SNP. Odds Ratio (OR) (com IC 95%) foram calculados, considerando $OR < 1$ e $OR > 1$ associados com proteção e susceptibilidade, respectivamente. Os Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatísticos.

Resultados e Discussão:

Os SNPs de 36 mulheres foram analisados (dentro do Equilíbrio de Hardy-Weinberg), 10 diagnosticadas com NIC e HPV (Casos) e 26 com citologia satisfatória (Controles). Na população, o alelo C foi mais presente (68%) comparado ao T (32%). As proporções alélicas e genóticas mantiveram-se semelhantes entre os Casos e os Controles. A maior frequência foi do genótipo T/T no grupo de Controles (modelos codominante e recessivo). Outro estudo brasileiro igualmente não obteve associação (CHAGAS et al., 2013). Porém um estudo realizado com inglesas indicou o alelo G do SNP -1082 [G→A] relacionado com a proteção contra lesões cervicais na infecção pelo HPV (FARZANEH et al., 2006).

Conclusões:

Nossos dados sugerem que o polimorfismo do SNP -819 do gene da INTERLEUCINA 10 não está relacionado com o câncer do colo do útero em nossa população. Entretanto, a influência de polimorfismos desse gene já foi estabelecida em tipos cancerosos em diferentes populações estudadas.

Referências bibliográficas

AMÉRICO, C. *Imunização*. 2015. Disponível

em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agenciasaude/16986-em-santa-atarina-mais-de-146-mil-meninas-devem-servvacinadas-contr-o-hpv>> Acesso em: 03 set. 2015.

BARBISAN, G.; PÉREZ, L. O.; CONTRERAS, A.; GOLJOW, C. D. **TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk.** *Tumor Biology*, v. 33, n. 5, p. 1549–1556, 2012.

CAMARA, G. N. N.; CRUZ, M. R.; VERAS, V. S.; MARTINS, C. R. F. **Os papilomavírus humanos–HPV: carcinogênese e imunogênese** - doi: 10.5102/ucs.v1i1.503. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 159–168, 2008.

CHAGAS, B. S.; GURGEL, A. P. A. D.; DA CRUZ, H. L. A.; AMARAL, C. M. M.; CARDOSO, M. V.; NETO, J. da C. S.; DA SILVA, L. A. F.; DE ALBUQUERQUE, E. M. B.; MUNIZ, M. T. C.; DE FREITAS, A. C. **An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives.** *Infection, Genetics and Evolution*, v. 19, p. 32–37, 2013.

CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. **Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics.** *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 155–166, 2006.

DE MELO, A. U. C.; RIBEIRO, C. F.; DE SANTANA SANTOS, T.; DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; DE AQUINO XAVIER, F. C.; RAMALHO, L. M. P. **Papilomavírus humano como fator de risco para o carcinoma bucal e de orofaringe.** [s.d.]

DETTOGNI, R. S.; TRISTÃO-SÁ, R.; DOS SANTOS, M.; DA SILVA, F. F.; LOURO, I. D. **Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons.** *Human immunology*, v. 76, n. 10, p. 717–23, out. 2015.

FARZANEH, F.; ROBERTS, S. A.; MANDAL, D.; OLLIER, B.; WINTERS, U.; KITCHENER, H. C.; BRABIN, L. **The IL-10 - 1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection.** *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 113, n.

8, p. 961–964, 2006.

GOVAN, V. A.; CONSTANT, D.; HOFFMAN, M.; WILLIAMSON, A.-L. **The allelic distribution of -308 Tumor Necrosis Factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women.** *BMC cancer*, v. 6, n. 1, p. 1, 2006.

HOORY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P.; WU, T.-C. **Molecular epidemiology of human papillomavirus.** *Journal of the Formosan Medical Association*, v. 107, n. 3, p. 198–217, 2008.

PINTO, Á. P.; TULLIO, S.; CRUZ, O. R. **HPV cofactors in cervical carcinogenesis.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 48, n. 1, p. 73–78, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Acesso em: 20 jul. 2016.