

2.02.05 - Genética / Genética Humana e Médica.

INFECÇÃO PELO HPV E PROGRESSÃO PARA O CÂNCER CERVICAL RELACIONADAS AO POLIMORFISMO +874 A/T DO GENE DO INTERFERON – GAMA EM MULHERES DO AGRESTE ALAGOANO

Alexandre Wendell Araujo Moura^{1*}, Adriely Ferreira da Silva¹, Rubens Pereira bezerra², Edilson Leite de Moura³, karol fireman de Farias⁴, Ana Caroline Melo dos Santos⁵, Elaine Virgínea Martins de Souza Figueiredo⁶

1. Estudante de Enfermagem da UFAL

2. Estudante de Ciências Biológicas da UFAL

3. Mestrando do PPGCS da UFAL

4. Doutoranda do PPGCS da UFAL

5. Prof. Dra. da UFAL

6. Pesquisadora Prof. Dra. da UFAL/ORIENTADORA/ elainevms@yahoo.com.br

Resumo:

O HPV é indicado como o principal fator desencadeador das lesões precursoras e conseqüentemente ao câncer cervical. Estudos mostram que polimorfismos em genes de citocinas participantes da imunidade inata estão associados com a progressão para o câncer Cervical. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo compreender o papel do polimorfismo +874 A/T no gene do interferon – gamma (IFN – γ) na infecção pelo HPV e progressão para o câncer cervical. O grupo caso foi formado por 24 pacientes com HPV+ e o grupo controle foi composto por 30 indivíduos saudáveis com HPV-. A análise do polimorfismo ocorreu por meio da técnica de PCR-ARMS. A distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo +874 A/T do IFN – γ não apresentaram significância entre os grupos casos e controle. Entretanto, após verificação da significância do poder amostral através do G-Power podemos inferir que de fato não há associação entre o polimorfismo estudado com a infecção pelo HPV.

Autorização legal: Comitê de Ética e Pesquisa da UFAL, sob o parecer Nº 931.700 e C.A.A.E 31450014.9.0000.5013.

Palavras-chave: Genética; Câncer do colo do útero; Imunidade inata;

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia mais frequente nas mulheres brasileiras, enquanto o câncer de mama é o mais constante. Com estimativas de 18.430 casos novos com 4.800 mortes a cada ano (BRASIL, 2012). Já na população mundial são estimados cerca de 500 mil casos de câncer cervical anualmente, conduzindo para 270 mil mortes (WHO, 2016).

Estudos mostram que a infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) é um fator importante para a progressão do câncer cervical, principalmente quando relacionada à infecção pelos tipos considerados de alto risco. Estudos têm mostrado que em cerca de 87% dos casos do câncer cervical na população mundial há a presença do vírus do HPV, tornando este o principal agente etiológico desta malignidade (SMITH, 2007).

Segundo estudos, o HPV não é um fator determinante para sua ocorrência, embora desempenhe papel fundamental para o desenvolvimento do câncer cervical. Outros fatores como: infecção persistente por HPV de alto risco, tipo do vírus, co-fatores externos e a predisposição imunidade/genética do hospedeiro são de extrema importância para o desenvolvimento do câncer (PINTO, 2002).

Os fatores genéticos têm ganhado muita ênfase no cenário atual. Vários estudos têm mostrado que polimorfismo em genes que codificam citocinas importantes na imunidade inata e processo inflamatório são responsáveis por variações fenotípicas associadas a diversas doenças (VISENTAINER, 2008).

O Interferon-gamma é importante no controle da infecção por HPV e neoplasias associadas ao HPV. O polimorfismo +874 A / T localizado no primeiro intron do gene IFN- γ pode influenciar a secreção de IFN- γ . Estudos associam os genótipos com baixa (AA), média (AT) e alta (TT) expressão desta citocina (Pravica et al., 2000). Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência do polimorfismo +874 A / T IFN- γ na infecção pelo vírus do HPV em mulheres do agreste alagoano para estabelecer critérios de riscos para o desenvolvimento de Câncer cervical.

Metodologia:

As amostras foram obtidas de pacientes do sexo feminino que buscaram atendimento na atenção básica para realizar a colpocitologia oncótica. Foram coletados amostras de sangue periférico total, células do epitélio bucal e endocérvice, ambas com escova citológica (citobrush). O grupo caso foi composto por mulheres com HPV+, confirmada por técnica de PCR convencional. O grupo controle foi composto por indivíduos

saudáveis selecionados aleatoriamente na população alagoana com HPV-.

A extração do DNA foi realizada a partir de células intra-epiteliais da endocérvice do colo uterino conforme o protocolo do kit comercial PROMEGA®. Por meio da técnica de espectrofotometria (Biophotometerplus) as amostras foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza do material extraído.

A identificação da presença do DNA do HPV nas amostras cervicais foi realizada através da amplificação de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene L1 presente no material genético do vírus, utilizando os primers MY09/11 e nested PCR com os primers GP5+/6+. E como controle interno da reação foi utilizado o primer do gene β -actina humano.

O polimorfismo do gene IFN – γ (+874 A/T) foi identificado por Reação em Cadeia da Polimerase convencional por Sistema Refratário de Amplificação de Mutação (ARMS). As amostras que apresentaram amplificação para DNA viral do HPV foram submetidas ao sequenciamento de DNA para tipagem viral utilizando sequenciador automático de DNA 3500 GeneticAnalyzer 8ch RUO. O Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) foi utilizado para comparar a semelhança entre os produtos amplificados e o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Também foi realizada uma metanálise onde a busca foi realizada nas bases de dados: PubMed, Web of Science, Scopus e Portal de Periódicos da Capes. A busca foi utilizando os seguintes descritores de acordo com a estratégia PICOS (patients, intervention, compared, outcome e study design): polymorphism and interferon-gamma and HPV and papillomavirus human and cervical cancer. O pacote metafor do software livre R versão 3.2.4 foi utilizado para análise dos dados da metanálise incluindo Odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% disposto no forestplot, análise de heterogeneidade (I² e Q²). A investigação de potencial viés foi conduzida pelo teste de regressão de Egger's e visualizados pelo gráfico de funil, considerando o valor de p menor que 0,05.

Para análise estatística de associação alélica e genotípica foi utilizado o programa BioEstat versão 5.0. As frequências e as associações genotípicas foram calculadas pelo software on-line SNPstat por regressão logística, será considerado a influência de fatores intrínsecos com ajuste para a idade dos indivíduos do estudo.

O valor de Odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% foi calculado considerando OR1 associado com a susceptibilidade/risco. Valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e Discussão:

O estudo foi composto de 24 pacientes positivos para HPV no grupo caso com média de idade igual a 34,7 anos (± 11.2), dentre estes 07 eram de baixo risco e 17 de alto risco oncogênico. E 30 mulheres com HPV negativo para o grupo controle com média de idade equivalente a 34,4 anos (± 10.3). As frequências genotípicas dos grupos controle e caso estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todas as participantes do estudo eram de nacionalidade brasileira e residiam no agreste alagoano.

A tabela 1 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genotípicas referentes ao SNP +874 A/T IFN – γ . Não houve diferença significativa nas distribuições alélicas entre os grupos caso e controle (OR 0,77- P=0,75). Quando comparamos o grupo controle com os pacientes com HPV de alto risco não foi encontrada associação alélica (OR 0,81, p=0,888). As frequências genotípicas entre os grupos casos e controles também não mostraram diferenças significativas. No entanto, foi observado um aumento na frequência do Genótipo TT entre o grupo caso (11,8%) com relação a grupo controle (3,6%).

Tabela 1. Distribuição alélica e genotípica do IFN- γ SNP em pacientes e controles.

SNPs	Grupos	Alelo (%)		Genótipo (%)			HWE
		A	T	AA	AT	TT	
IFNGrs2430561	Caso	37 (77)	11 (23)	10 (58.8)	5 (29.4)	2 (11.8)	0.22
	Alto risco	26 (76)	8 (24)	7 (63.6)	2 (18.2)	2 (18.2)	
	Controle	48 (80)	12 (20)	19 (67.9)	8 (28.6)	1 (3.6)	

Quando analisamos a relação do SNP do IFN- γ baseados nos modelos gênicos também não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo caso e controle com base nestes modelos.

Vários estudos têm relacionado polimorfismos em citocinas com a prevalência do câncer cervical induzido pelo HPV, como o TNFA (GHADERI, 2000) e IL10 (STANCZUK, 2002).

O IFN é secretado por células T citotóxicas e estimuladas por células natural killers e desempenha papel imprescindível durante a resposta imune na defesa contra vírus e na resposta inflamatória (NAKAMURA, 1997). Alterações na produção de IFN- γ podem ter associação com o aumento da gravidade de lesões do colo uterino (TARTOUR, 1998). O polimorfismo +874 A / T do gene do IFN- γ influencia os níveis de expressão desta citocina onde, os genótipos AA, AT e TT são relacionados com a baixa, média e alta expressão respectivamente (Pravica et al., 2000).

Em um estudo com mulheres Brasileiras também não foi encontrada associação entre o polimorfismo +874A/T do IFN- γ com a susceptibilidade para lesões cervicais relacionadas ao HPV (FERNANDES, 2008).

Em uma população do norte da Índia um estudo associou o genótipo AA com a baixa produção do IFN- γ e conseqüentemente ao alto risco de câncer cervical (GANGWAR, 2009). No entanto, em um estudo feito em uma população africana o polimorfismo IFN- γ +874 também não foi associado com a susceptibilidade ou proteção ao câncer cervical associado à infecção pelo HPV (GOVAN, 2003).

Utilizando o software Gpower encontramos um poder amostral de 92%. Isto implica que, embora a população do estudo seja relativamente pequena, o tamanho amostral está adequado para a implicação dos resultados. Desta forma podemos inferir que na população estudada o polimorfismo +874A/T do gene do IFN- γ não desempenha associação com a infecção do vírus do HPV.

Para melhor compreensão e integração das evidências sobre a associação do polimorfismo +874A/T do gene do IFN- γ com o câncer cervical realizamos uma revisão sistemática com metanálise. Oito artigos foram selecionados elegíveis de acordo com os critérios de inclusão, com 2.611 casos de câncer e 2.197 controles. Dos estudos, 2 foram realizados com população brasileira, 2 indianas, 2 chinesas e 2 na população indiana.

Os resultados da análise mostram que o modelo overdominante pode estar associado a susceptibilidade ao câncer cervical OR=0.64, 95% IC 0.44, 0.95, P= 0.003. Os gráficos funnelplot mostraram evidências de assimetria nos estudos.

Ao aplicarmos o teste de Egger encontramos evidências de viés de publicação provavelmente metodológico ao analisarmos a variação étnica e amostral dos estudos. Assim como, o teste de heterogeneidade o que dificulta a interpretação dos resultados (Tabela 2).

Tabela 2. Estratificação dos resultados da Metanálise

	OR (95% IC)	TESTE DE ASSOCIAÇÃO Z (P)	TESTE DE HETEROGENIDADE		Egger (p)
			Chi ² (p)	I ²	
T	0.95 (0.75, 1.22)	0.37 (0.71)	34.42 (<0.00001)	80%	5.2954 (p <0.0001)
A	1.33 (0.75, 2.33)	0.98 (0.33)	168.44 (<0.00001)	96%	6.9063 (p <0.0001)
TT	1.10 (0.93, 1.30)	1.12 (0.26)	17.09 (0.02)	59%	6.6208 (p <0.0001)
AT	1.32 (0.96, 1.82)	1.71 (0.09)	40.08 (<0.00001)	83%	6.2891 (p <0.0001)
AA	1.51 (0.72, 3.14)	1.10 (0.27)	193.44 (<0.00001)	96%	3.6041 (p = 0.0003)
Dominante	1.18 (0.40, 3.47)	0.31 (0.76)	102.91 (<0.00001)	95%	NA
Recessivo	0.72 (0.41, 1.26)	1.15 (0.25)	40.53 (<0.00001)	83%	5.7714 (p <0.0001)
Overdominante	0.64 (0.44, 0.95)	2.19 (0.03)	1,61 (0,45)	0%	NA

Conclusões:

Na população do agreste alagoano o polimorfismo +874A/T do gene do IFN- γ não obteve associação significativa em relação à suscetibilidade a infecção pelo papilomavírus humano e conseqüentemente ao desenvolvimento do câncer cervical. O poder da amostra assegura o resultado implicando que o aumento da população não alteraria significativamente os resultados encontrados. As diferenças encontradas entre as populações dos estudos mostram a importância da avaliação do perfil genético da população.

Na metanálise a associação do modelo overdominante implica que os indivíduos homocigotos têm maior susceptibilidade a infecção pelo HPV como encontrado em algumas populações citadas na discussão do estudo.

A realização de estudos referentes a polimorfismo genético mostra-se de grande importância para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos relacionados à progressão de neoplasias cervicais em meio à infecção por HPV. Portanto, torna-se necessário a realização de mais estudos analisando outras regiões do gene, receptores ou demais proteínas relacionadas ao IFN- γ para análise da associação com o HPV nesta população.

Referências bibliográficas

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011 [citado 2012 Ago 21]. Disponível em:

FERNANDES APM, Goncalves MAG, Simoes RT, et al. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J ObstetGynecolReprodBiol* 2008; 140:241-4.

NAKAMURA T, Lee RK, Nam SY, et al. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J Immunol* 1997;158:2648-53.

PINTO, A. P.; TULLIO, S.; CRUZ, O. R. [{}]. Hpv cofactors in cervical carcinogenesis[{}]. *Rev Assoc Med Bras*, v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.

PRAVICA V, Perrey C, Stevens A, et al (2000). A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol*, 61, 863-6.

SMITH JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-32.

TARTOUR E, Gey A, Sastre-Garau X, et al. Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:287-94.

VISENTAINER, Jeane Eliete Laguila et al. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n4, p. 739-748, 2008.

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