

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CAMPUS DE ARAPIRACA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

SILMARA FERREIRA DE SANTANA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -819 C>T (RS1800871) NO GENE *IL-10* COM
A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS
POR HPV DO AGRESTE ALAGOANO**

ARAPIRACA

2023

SILMARA FERREIRA DE SANTANA

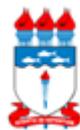
ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -819 C>T (RS1800871) NO GENE *IL-10* COM A
SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS POR
HPV DO AGRESTE ALAGOANO

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Karol Fireman de Farias

ARAPIRACA

2023



Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Campus Arapiraca
Biblioteca *Campus* Arapiraca - BCA

S232a Santana, Silmara Ferreira de
Associação do polimorfismo -819 C>T (RS1800871) no gene IL-10 com a suscetibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas por HPV do agreste alagoano / Silmara Ferreira de Santana. – Arapiraca, 2023.
61 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dra. Karol Fireman de Farias.
Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas.) -
Universidade Federal de Alagoas, *Campus* Arapiraca, Arapiraca, 2023.
Disponível em: Universidade Digital (UD) – UFAL (*Campus* Arapiraca).
Referências: f. 45-52.
Anexos: f. 53-61

1. Papilomavírus humano 2. Interleucina-10 3. Colo uterino - Câncer I. Farias,
Karol Fireman de II. Título.

CDU 57

SILMARA FERREIRA DE SANTANA

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -819 C>T (RS1800871) NO GENE *IL-10* COM A
SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS POR
HPV DO AGRESTE ALAGOANO

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
corpo docente do curso de Ciências Biológicas –
Licenciatura, da Universidade Federal de Alagoas,
Campus Arapiraca, como requisito parcial para
obtenção do grau de licenciado em Ciências
Biológicas.

Data da Apresentação: 31/10/2023

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **KAROL FIREMAN DE FARIAS**
Data: 30/10/2023 20:44:50-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Karol Fireman de Farias
Universidade Federal de Alagoas - *Campus* Arapiraca
Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **DENISE MACEDO DA SILVA**
Data: 30/10/2023 21:04:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Mestre Denise Macêdo da Silva
(Universidade Federal de Alagoas - *Campus* Arapiraca)

Documento assinado digitalmente
 **CRISTIANE DOS SANTOS FERREIRA**
Data: 30/10/2023 21:40:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Mestranda Cristiane dos Santos Ferreira
(Universidade Federal de Alagoas - *Campus* Arapiraca)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e capacitado ao longo da graduação, pelas oportunidades que surgiram em minha vida acadêmica, por ter me dado saúde, forças e coragem necessária para conseguir enfrentar e superar todos os desafios que me foram propostos.

Aos meus pais, Rosibel e Silvânia, minha irmã, Ana Raquel, que sempre me apoiaram nos estudos e nunca mediram esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Agradeço pelo amor, incentivo e apoio incondicional, por todas as orações e dedicação para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu companheiro Jerônimo, por sempre me incentivar nos estudos, pelo apoio nos momentos difíceis, me dando confiança e força para seguir em frente, dia após dia, e por ser parceiro e paciente o tempo todo. Sou grata por estar sempre ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória. Sua paciência, compreensão e carinho foram fundamentais para que eu pudesse alcançar a conclusão deste trabalho. A minha filha Rosa, que veio para iluminar a minha vida, e mostrar uma força que eu não imaginava que existia em mim. Seu sorriso alegra meus dias e me encoraja a não desistir.

Aos meus queridos amigos, quero agradecer pelo apoio, força, incentivo e amizade ao longo da graduação. Sou grata por todos os momentos que compartilhamos e pelos inúmeros desafios que enfrentamos juntos, conseguindo avançar e ultrapassar todos os obstáculos. As minhas amigas queridas, que me ajudaram com palavras de ânimo, motivação e incentivo, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Além disso, agradeço aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG), por todo conhecimento compartilhado.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas do *Campus* Arapiraca, que contribuíram com a minha formação acadêmica, por todo conhecimento passado e os incentivos durante a graduação. E aos profissionais do LABMEG, pelos ensinamentos e contribuições científica.

Agradeço a todos que me incentivaram ao longo desses anos, que torceram pelo meu sucesso e principalmente pela minha felicidade, acreditando no meu potencial. Sou muito grata.

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) em especial os tipos de maior potencial oncogênico, HPV 16 e 18, é considerado o principal fator etiológico do câncer cervical. No entanto, embora a infecção por HPV desempenhe um papel importante no desenvolvimento de lesões cervicais, a maioria das lesões contendo estes vírus de alto risco não progride para tumores cervicais, e mulheres infectadas pelos tipos virais considerados oncogênicos, podem nunca chegar a desenvolver uma neoplasia. Esse fato nos leva a investigar outros fatores associados, como a ineficiência da resposta imune do hospedeiro em combater o vírus. Alterações nos níveis de expressão de citocinas podem provocar limitações do sistema imune contra algum agente infeccioso, contribuindo para o surgimento de infecções. Nesse sentido, esta pesquisa tem por objetivo analisar a associação do polimorfismo -819 C>T (RS1800871) do gene da IL-10 na suscetibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas por HPV no Agreste Alagoano. Consiste em um estudo do tipo caso-controle, que ocorreu no período de novembro de 2014 a dezembro de 2015, no qual 179 pacientes com resultados citológicos normais e negativos para a infecção pelo HPV, compõem o grupo controle, e o grupo caso foi formado por 45 amostras de mulheres com câncer cervical e resultado positivo para a infecção por HPV, totalizando 224 pacientes. A detecção viral foi realizada através da amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os primers MY09/MY11, GP5+/GP6+ e *β-actina humana* (*Forward-FW e Reverse-RV*) como controle interno da reação. A técnica de PCR em tempo real foi usada para realizar a identificação dos polimorfismos, por meio do método de discriminação alélica. Os genótipos virais do HPV foram identificados por sequenciamento. Neste estudo foi observada associação de risco aumentado para o desenvolvimento de câncer cervical em mulheres infectadas por HPV, que possuem o genótipo -819C/T ou os carreadores T (-819C/T+TT). Alguns estudos não encontraram associação significativa entre esse polimorfismo e carcinogênese cervical. No entanto, estudos que avaliaram o polimorfismo -819C/T mostraram que as mulheres com HPV, e que são portadoras do alelo T, são mais suscetíveis a desenvolverem câncer cervical. O presente estudo colabora para entender melhor o papel da citocina IL-10 no câncer cervical, e contribui para identificar candidatos a biomarcadores genéticos de suscetibilidade ao risco de câncer cervical na infecção pelo vírus HPV.

Palavras chave: papilomavírus humano; interleucina 10; câncer do colo do útero.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV), especially the types with the greatest oncogenic potential, HPV 16 and 18, is considered the main etiological factor of cervical cancer. However, although HPV infection plays an important role in the development of cervical lesions, the majority of lesions containing these high-risk viruses do not progress to cervical tumors, and women infected with viral types considered oncogenic may never develop a neoplasm. This fact leads us to investigate other associated factors, such as the inefficiency of the host's immune response in combating the virus. Changes in cytokine expression levels can cause limitations of the immune system against an infectious agent, contributing to the emergence of infections. In this sense, this research aims to analyze the association of the -819 C>T polymorphism (RS1800871) of the IL-10 gene in susceptibility to cervical cancer in women infected with HPV in Agreste Alagoano. It consists of a case-control study, which took place from November 2014 to December 2015, in which 179 patients with normal and negative cytological results for HPV infection made up the control group, and the case group was formed by 45 samples from women with cervical cancer and positive results for HPV infection, totaling 224 patients. Viral detection was carried out through Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification, with primers MY09/MY11, GP5+/GP6+ and *human β -actin* (*Forward-FW* and *Reverse-RV*) as internal control of the reaction. The real-time PCR technique was used to identify polymorphisms, using the allelic discrimination method. HPV viral genotypes were identified by sequencing. In this study, an association of increased risk for the development of cervical cancer was observed in women infected with HPV, who have the -819C/T genotype or T carriers (-819C/T+TT). Some studies did not find a significant association between this polymorphism and cervical carcinogenesis. However, studies that evaluated the -819C/T polymorphism showed that women with HPV, and who carry the T allele, are more susceptible to developing cervical cancer. The present study helps to better understand the role of the cytokine IL-10 in cervical cancer, and contributes to identifying candidates for genetic biomarkers of susceptibility to the risk of cervical cancer in HPV infection.

Keywords: Human Papillomavirus; Interleukin 10; Cervical Cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero).....	18
Figura 2 – Taxas de mortalidade por câncer cervical na população mundial.....	19
Figura 3 – Estrutura morfológica e organização genômica do HPV	20
Figura 4 – Representação esquemática da estrutura e localização do gene IL-10 no } cromossomo 1 e os polimorfismos presentes nessa região	30
Figura 5 – Fluxograma de seleção dos estudos	37
Figura 6 – Gel de eletroforese da PCR com os primers β -actina humana para controle interno da detecção do HPV	39
Figura 7 – Gel de eletroforese da PCR com primers MY09/MY11 que anelam na região L1 do HPV para detecção viral.....	39
Figura 8 – Gel de eletroforese da nPCR com primers GP5+/GP6+ que anelam na região L1 do HPV para detecção viral.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre os genes de Papilomavírus Humano e suas requeridas funções	21
Tabela 2 – Classificação dos tipos de HPV de acordo com o seu tropismo tecidual.	22
Tabela 3 – Classificação dos tipos de HPV com base no potencial oncogênico.....	22
Tabela 4 – Primers e condições da reação utilizados na detecção do vírus HPV com base na técnica nested Polymerase Chain Reaction (nPCR).	35
Tabela 5 – Caracterização dos grupos câncer cervical e controles saudáveis	38
Tabela 6 – Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do SNP IL-10 -819 C>T e suas associações com o carcinoma cervical.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
C	Citosina
CD	Células Dendríticas
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Genes precoce (do inglês: <i>early</i>)
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EV	Epidermodisplasia Verruciforme
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTC- β	Fator Transformador do Crescimento-Beta
FW	<i>Forward</i>
G	Guanina
HIV	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HPV	Papiloma Vírus Humano
HSIL	Lesões Intraepiteliais Escamosas de alto grau
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN	Interferon
IL	Interleucina
<i>IL-10</i>	<i>Interleukin-10</i>
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
L	Genes tardio (do inglês: <i>late</i>)
LABMEG	Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica
L1	Proteínas de capsídeo maior
L2	Proteínas de capsídeo menor
LCR	Região regulatória (do inglês: <i>Long Control Region</i>)

MS	Ministério da Saúde
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Células Natural Killers
nPCR	Nestd-PCR
NPDC	Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	Região Aberta de Leitura (do inglês: <i>Open Reading Frame</i>)
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pRb	Proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma
RV	Reverse
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Únreo
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	<i>Toll likes Receptor</i>
TNF- α	Proteína Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
URR	Upstream regulatory region
UV	Ultra Violeta
VLPs	<i>Virus-Like Particles</i> (Vírus Semelhantes à Partículas)
VNTR	(do inglês: <i>variable number of tandem repeats</i>)
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral.....	15
2.2	Específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Contextualização histórica sobre o HPV	16
3.2	Aspectos epidemiológicos do HPV e Câncer Cervical.....	17
3.3	O Papilomavírus Humano (HPV)	19
3.3.1	Classificação do vírus HPV	19
3.3.2	Estrutura e genoma do HPV	20
3.3.3	Tipos virais	21
3.3.4	Transmissão	23
3.3.5	Infecção.....	23
3.3.6	Resposta Imunológica.....	24
3.4	Associação do HPV com o câncer cervical	25
3.5	Prevenção e diagnóstico do HPV e câncer cervical	26
3.6	Vacina contra o HPV	27
3.7	Citocinas	28
3.8	Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)	29
3.9	Interleucina – 10	29
3.10	Snp Il-10 -819 C>T (rs1800871).....	30
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Busca de dados	32
4.2	Aspectos éticos e desenho do estudo.....	33

4.3	Coleta e armazenamento do material biológico.....	33
4.4	Extração do DNA humano e viral.....	34
4.5	Quantificação e verificação do estado do DNA.....	34
4.6	Detecção viral.....	34
4.8	Análises estatísticas.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	Aspectos Gerais.....	37
5.2	Detecção do HPV.....	38
5.3	Genotipagem por discriminação alélica.....	40
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação da pesquisa pelo comitê de ética e pesquisa da UFAL.....	53
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	56
	ANEXO C – Protocolo do kit comercial para extração de DNA.....	60
	ANEXO D – Protocolo de extração de dna genômico poR NaCl (salting out).....	61

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado um problema de saúde pública no mundo, em virtude de ser o agente etiológico mais importante no desenvolvimento de diversos cânceres, a exemplo do câncer cervical (WHO FACT SHEET, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a maioria das pessoas sexualmente ativas será infectada em algum momento de suas vidas por esse vírus.

Estudos apontam que o HPV é o fator etiológico mais importante no início das anormalidades intraepiteliais cervicais, no entanto, a maioria das infecções por HPV desaparecem espontaneamente pelo organismo do indivíduo, sem o surgimento de sintomas e sem a necessidade de intervenções clínicas (DUVLIS *et al.*, 2020). Entretanto, uma pequena proporção das infecções por esse vírus pode persistir, contribuindo para o desenvolvimento de Lesões Intraepiteliais Escamosas de alto grau (HSIL) e para progressão destas lesões para o câncer cervical (INCA, 2023; OPAS, 2023).

O câncer cervical é a quarta neoplasia que mais acomete mulheres no mundo, em especial aquelas socioeconomicamente mais vulneráveis, caracterizado como a quarta causa de morte de mulheres no Brasil (INCA, 2021). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2022 cerca de 16.710 mil mulheres foram diagnosticadas com câncer cervical em todo o mundo e 4,60 óbitos por 100 mil mulheres, em 2020 (INCA, 2020; INCA, 2021). No Brasil, estima-se 17.010 mil novos casos de câncer cervical para o ano de 2023, com uma estimativa de aproximadamente 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022a).

A infecção persistente pelo HPV, em especial os tipos de maior potencial oncogênico, a exemplo do HPV 16 e HPV 18, apresentam-se como principal fator que se encontra envolvido no desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical (BONIN *et al.*, 2017; PRATA, *et al.*, 2015; SASAGAWA *et al.*, 2012). No entanto, diversos outros cofatores de risco estão envolvidos na carcinogênese, dentre os quais se destacam Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), multiplicidade de parceiros, início precoce da vida sexual, condições infecciosas e reativas, uso prolongado de anticoncepcionais orais, desregulação do sistema imunológico, tabagismo, condições imunológicas e genéticas (PHUTHONG *et al.*, 2018). Dessa forma, é possível a detecção do DNA viral, através de técnicas moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a prevenção do câncer cervical, em virtude das limitações que o diagnóstico sorológico apresenta em sua precisão. Além disso, quando se identifica no

início a infecção, é possível realizar o acompanhamento do paciente para que seja evitado o desenvolvimento de lesões ou realizar um tratamento precoce.

No entanto, embora a infecção por HPV desempenhe um papel importante no desenvolvimento de lesões cervicais, estudos mostram, que a maioria das lesões contendo estes vírus de alto risco não progride para tumores cervicais, e mulheres infectadas pelos tipos virais considerados oncogênicos, podem nunca chegar a desenvolver uma neoplasia. Esse fato nos leva à investigação de outros fatores associados, como a ineficiência da resposta imune do hospedeiro em combater o vírus (MACHADO *et al.*, 2004).

Várias citocinas desempenham funções essenciais na modulação da resposta imune, contribuindo para que a resposta imunológica seja eficaz (ALI, K. S.; ALI, H. Y.; JUBRAEL, J. M., 2012). Com isso, alterações nos níveis de expressão das citocinas podem provocar limitações do sistema imune contra algum agente infeccioso. Assim, quando os níveis séricos dessas moléculas sofrem alterações, isso pode intensificar o surgimento de infecções, a exemplo da infecção por HPV, e contribuir também para o desenvolvimento ou agravamento de lesões cervicais (TORRES-POVEDA, *et al.*, 2016). Deste modo, diversos estudos têm analisado o efeito de SNP's presentes em genes de citocinas, os quais podem alterar a atividade do gene, ocasionando uma diminuição ou aumento da expressão gênica (PEREIRA *et al.*, 2020; ZIDI *et al.*, 2015). Assim, estes SNP's podem ser considerados candidatos a biomarcadores de susceptibilidade a HSIL e ao câncer cervical.

Estudos têm mostrado que vários SNP's em gene de citocina foram associados a infecção persistente e ao desenvolvimento de HSIL e câncer do útero (MIN; PU; GU, 2018; TORRES-POVEDA, *et al.*, 2014). Um SNP bastante investigado é no gene que codifica a citocina Interleucina-10, localizado na posição -819 C>T (rs1800871 – número de identificação atribuído pelo NCBI a um grupo de SNPs que mapeiam para um local idêntico), que corresponde em uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T), que de acordo com alguns estudos presentes na literatura, o alelo T está associado ao aumento da expressão desta citocina, promovendo uma resposta imunológica diferenciada à infecção pelo HPV, nesse sentido, pode estar associado a uma maior susceptibilidade ou proteção no papel etiológico desse vírus sobre as lesões pré-malignas e câncer cervical (Torres-Poveda *et al.*, 2017; ZIDI *et al.*, 2015).

Entretanto, observa-se que os resultados sobre essa associação apresentam contradições na literatura, com isso o papel desse SNP sobre a susceptibilidade a doenças cervicais ainda não está claro. Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar a associação do polimorfismo -819 C>T (rs1800871) do gene da Interleucina-10 (IL-10) na suscetibilidade ao

câncer cervical em mulheres infectadas por HPV no Agreste Alagoano, visto a necessidade de maior compreensão do papel da citocina IL-10 na contribuição para o desenvolvimento de um biomarcador de infecção por HPV e que resulte na melhoria do tratamento e prevenção contra o câncer cervical.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar a associação do polimorfismo -819 C>T (RS1800871) do gene da IL-10 na suscetibilidade ao câncer cervical em mulheres infectadas por HPV no Agreste Alagoano.

2.2 Específicos

- Detectar a presença do HPV na amostra cervical de mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde no município de Arapiraca;
- Identificar as distribuições das frequências genotípicas e alélicas do SNP -819 C>T (rsTLR1800871) do gene da IL-10 na população do estudo;
- Comparar os resultados identificados na população do estudo, com outros estudos realizados no Brasil e no mundo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contextualização histórica sobre o HPV

Ao longo do tempo, pesquisadores tentam descobrir como surgem algumas doenças, as quais sabemos hoje que são causadas por vírus. No entanto, só no século XX, foi possível identificar os patógenos e compreender os processos de infecção, reprodução e transmissão dos vírus, pois nesse período, a ciência e as tecnologias vinham avançando e novos métodos e instrumentos foram criados possibilitando essas descobertas (Camara *et al.*, 2003). O doutor e filósofo Galeno (129-199 d. C.), escreveu diversos textos ensinando métodos simples de eliminação de verrugas, no entanto, somente no século XIX, foi descoberto a natureza infecciosa dessas verrugas, tendo como base as pesquisas de Joseph F. Payne. Em 1891, Joseph publicou um artigo intitulado “*On the contagiousness of common warts*”, contendo informações sobre o surgimento de verrugas por auto-inoculação. Já em 1894, o C. Licht e Gaston Variot, desenvolveram trabalhos que mostraram o caráter infeccioso de lesões em pacientes que apresentavam tecidos verrucosos macerados (Camara *et al.*, 2003).

Em meados do século XX, G. Ciuffo, começou a suspeitar que as verrugas eram causadas por vírus, por meio de trabalhos por auto-inoculação. Em 1933, Richard E. Shope, membro do Instituto Rockefeller para Pesquisa Médica, em Nova Jersey, descobriu que era possível a transmissão dos papilomas de coelhos selvagens (*Cottontail rabbits*) para os coelhos domésticos através de filtrados livres de células, e que os tumores eram causados por um vírus que possuía características parecidas com aqueles que produziam papilomas em grupos de mamíferos, a exemplo do homem. Em 1935, Peyton Rous e J. W. Beard, do Instituto Rockefeller para Pesquisa Médica, em Nova Iorque, descobriram que as verrugas em coelhos possuíam características para tornar-se malignas, e progredir para carcinomas escamosos (Garfield, 1988).

A virologia conseguiu ter avanços com o uso da microscopia eletrônica e o cultivo de células. Em 1949, com a utilização de microscópio eletrônico, Maurice Strauss conseguiu visualizar partículas que se assemelhavam aos vírus em amostras retiradas de papilomas da pele. Após um ano, Strauss conseguiu identificar o papilomavírus humano (HPV), como agente etiológico no desenvolvimento das verrugas, entretanto, só em 1963 foi possível desvendar a estrutura do genoma viral (Garfield, 1988). Apesar do conhecimento sobre o papilomavírus, até a década de 1970, ainda não tinha sido estabelecido associação do HPV com o câncer cervical, no entanto, no final dessa década, foi identificado alguns tipos virais em lesões de pele e em

mucosas como verrugas e carcinomas de cérvix uterina, contribuindo para fortalecer a importância médica desse vírus. Com isso, surgiu a hipótese de que os HPVs estavam envolvidos na etiologia dos cânceres cervical (doorbar; sterling, 2001).

Em 1980, com o avanço nas pesquisas, foi possível isolar os tipos de HPV localizados em biópsias de câncer uterino, com isso cresceu o número de estudos para compreender o papel e influência desses vírus em cânceres genitais. (zur hausen; villiers, 1994). Nesse sentido, em 1987 foi publicado o primeiro trabalho sobre HPV e câncer cervical, dando abertura para o surgimento de novos estudos como, epidemiológicos, clínicos e de biologia molecular. A partir desses estudos, foi sendo cada vez mais evidenciado o papel que alguns tipos de HPVs possuem em cânceres, a exemplo do câncer cervical (Villiers *et al.*, 1987).

3.2 Aspectos epidemiológicos do HPV e câncer cervical

O HPV é uma infecção sexualmente transmissível (IST), considerada a mais prevalente no mundo, apresentando uma incidência de 85% dos casos de infecções transmitidas através do ato sexual (BALOCH *et al.*, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2022), dentre as pessoas que são sexualmente ativas, uma pequena parcela será infectada em algum momento de suas vidas por esse vírus. A infecção por HPV se configura como um problema de saúde pública, pois apresenta um potencial etiológico durante o desenvolvimento de cânceres, como o câncer cervical (Deshmukh *et al.*, 2017; Lawrence *et al.*, 2015; Sasagawa *et al.*, 2012; Who Fact Sheet, 2016). Entre os 12 tipos de HPV considerados oncogênicos, por apresentar maior risco ou probabilidade de causar infecções persistentes e estarem associados com lesões precursoras de câncer, o HPV 16 e HPV 18 estão presentes em 70% dos casos de câncer uterino no mundo. Já os HPV tipo 6 e 11, estão presentes em 90% dos casos de verrugas anogenitais (Bonin *et al.*, 2017; INCA, 2023; OPAS, 2022; WHO, 2010).

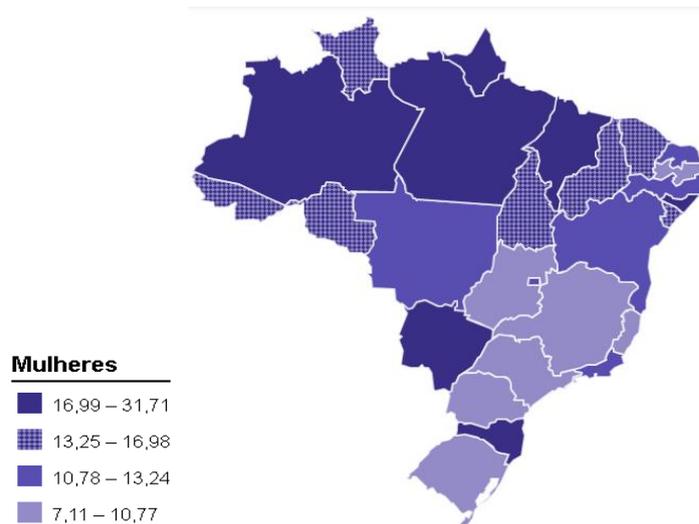
Estudos mostram que o HPV é o fator etiológico mais importante no início das anormalidades intraepiteliais cervicais, embora, a maioria das infecções por este vírus costumam desaparecer sem o surgimento de sintomas, espontaneamente pelo organismo do indivíduo, sem a necessidade de intervenções clínicas (Duvlis *et al.*, 2020). No entanto, uma pequena parcela das infecções pode persistir levando ao surgimento de Lesões Intraepiteliais Escamosas (HSIL), e progredir para o câncer cervical (INCA, 2023; OPAS, 2023).

O câncer cervical é considerado a quarta neoplasia que mais acomete mulheres no mundo (INCA, 2021). Segundo dados da OMS, em 2022 cerca de 16.710 mil mulheres foram

acometidas com câncer uterino em todo o mundo, com um risco considerado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2021).

No Brasil, o câncer do colo do útero é o segundo mais frequente nas regiões Norte (20,48/100 mil) e Nordeste (17,59/100 mil) e o terceiro na região Centro-Oeste (16,66/100 mil). Na região Sul (14,55/100 mil), esse câncer ocupa a quarta posição, e na região Sudeste (12,93/100 mil), a quinta. Estas discrepâncias nos resultados podem estar relacionadas a diversos fatores, como a implantação e execução de programas de prevenção e controle efetivos e pelo comportamento sexual da população (INCA, 2022a) (Figura 1).

Figura 1 – Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo a unidade da federação (neoplasia maligna do colo do útero)

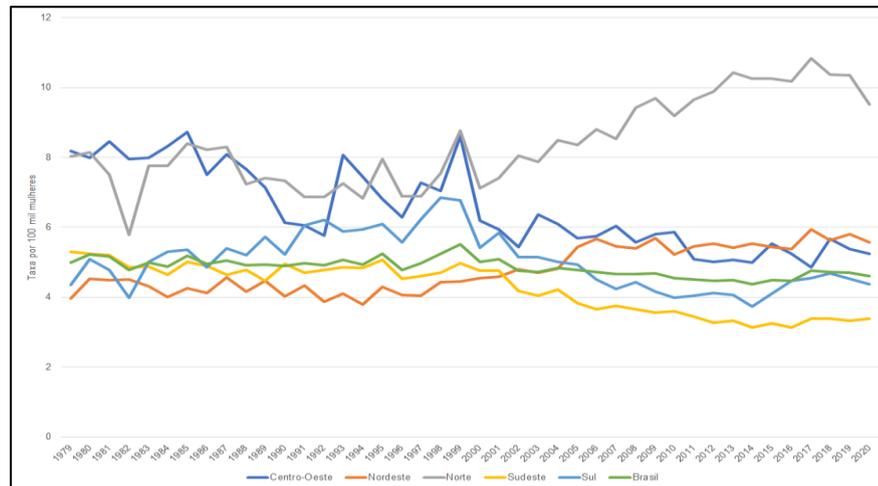


Fonte: INCA (2022).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (2022), no Brasil o câncer cervical apresenta uma estimativa de 17.010 casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025, com um risco estimado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres. Em 2023, a região Nordeste apresentou 5.280 mil casos, e o estado de Alagoas teve 370 casos de câncer uterino. A taxa ajustada de mortalidade por câncer do colo do útero com base na população mundial, foi 4,60 óbitos por 100 mil mulheres (INCA, 2022b). A região Norte apresentou as maiores taxas de mortalidade, em relação às outras regiões, com probabilidades de crescimento (Figura 2). Em 2020, a taxa nessa região foi de 9,52 mortes por 100 mil mulheres, sendo considerada como principal causa de óbitos por câncer nesta região. A região Nordeste, teve uma taxa de 5,58 e a região Centro-

Oeste apresentou 5,25 casos de mortes, na qual o câncer cervical ocupa a terceira posição. As regiões Sul e Sudeste possuem as menores taxas (4,37 e 3,38), ocupando a quinta e sexta posição (INCA, 2022a) (Figura 2).

Figura 2 – Taxas de mortalidade por câncer cervical na população mundial



Fonte: INCA. Atlas de Mortalidade. Acesso em 21/07/2022.

3.3 O Papilomavírus humano (HPV)

3.3.1 Classificação do vírus HPV

O Papilomavírus Humano (HPV) é o nome dado ao grupo de vírus que apresenta um caráter epiteliotrópico, pertencente à família *Papillomaviridae*, dividida em duas subfamílias: *Firstpapillomavirinae* (52 gêneros) e *Secondpapillomavirinae* (1 gênero) (BOCCARDO *et al.*, 2010; CARTER *et al.*, 2011; ICTV, 2018). Os HPVs não são classificados em sorotipos, mas por genótipos, e ao todo são conhecidos mais de 200 genótipos desse vírus, os quais se classificam com base na região da sequência do gene L1 do vírus.

O gênero *Alphapapillomavirus* do papilomavírus, se classifica por apresentar um maior número de casos clínico, composto por 14 espécies, sendo 64 tipos de papilomavírus. Dentre esses tipos, quinze são relacionados com infecções na região anogenital, classificados como alto risco, três com risco intermediário e onze de baixo risco conforme seu potencial carcinogênico nesse local (COSTA *et al.*, 2013). O gênero *Betapapillomavirus*, é o segundo maior gênero, tendo tipos de HPVs que estão envolvidos com infecções no epitélio cutâneo, e sua infecção se associa a verrugas cutâneas e câncer de pele. Os tipos de HPVs que fazem parte

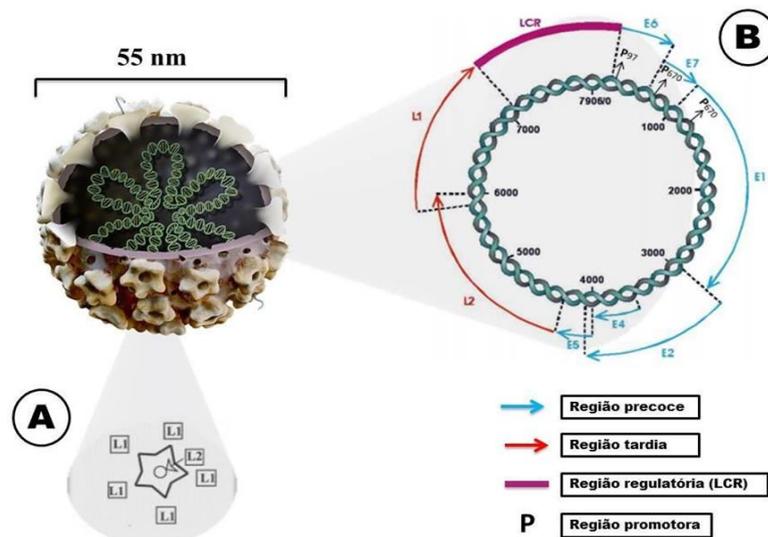
dos gêneros *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*, normalmente causam lesões benignas (LETO *et al.*, 2011).

3.3.2 Estrutura e genoma do HPV

O HPV é um vírus não envelopado de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros pentaméricos, que apresenta uma dimensão de 55 nanômetros (nm) de diâmetro. Possui um genoma de DNA de fita dupla circular, constituído de 8.000 pares de bases e enovelado em 30-32 octâmeros de histonas celulares, e envolto por um capsídeo, constituído pelas proteínas estruturais L1 e L2 (SOUTO; FALHARI; DA CRUZ, 2005) (Figura 3 A).

O genoma viral é constituído de três *open reading frames* (ORF), com base em sua localização e características funcionais. Essas regiões possuem seis genes que se expressam de forma precoce e dois de forma tardia, denominadas regiões E (*Early*) e L (*Late*), e região reguladora (upstream regulatory region - URR) (BOCCARDO *et al.*, 2010) (Figura 3 B).

Figura 3 – Estrutura morfológica e organização genômica do HPV



Legenda: (A) Estrutura tridimensional do capsídeo do vírion HPV. L1: capsídeo maior, L2: capsídeo menor. (B) Organização genômica do HPV, contendo 8.000 pb. Representação dos genes precoces (em azul), genes tardios (em vermelho), LCR - região regulatória (em roxo) e P (regiões promotoras).

Fonte: Adaptado de BOCCARDO *et al.*, (2010).

A região E (*Early*) apresenta uma expressão gênica precoce e compreende cerca de 4.000 pb, ocupando 50% do genoma viral, e codifica as proteínas precoces (não estruturais) do HPV, as E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Essas proteínas podem ser expressas logo após a infecção do vírus na célula hospedeira (GRAHAM, 2017). Os genes apresentam algumas funções: o gene

E1 participa do processo de replicação viral; E2, atua diretamente na replicação e transcrição viral; E4 está envolvido na maturação viral e no processo de alteração que ocorre na matriz intracelular; e os genes E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular (SOUTO; FALHARI; DA CRUZ, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação entre os genes de Papilomavírus Humano e suas requeridas funções

Expressão Gênica	Genes	Função
Precoce	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Controle da transcrição e replicação
	E4	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	E5, E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular
Tardia	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo

Fonte: Modificada de GRAHAM (2017).

A região denominada L (Late) apresenta uma expressão gênica tardia com cerca de 3.000 pb, ocupando 40% do genoma viral, formada pelas proteínas L1 (54 kDa) e L2 (76 kDa), com a função de codificar as proteínas do capsídeo viral (Tabela 1). O gene L1 é expresso durante a fase de infecção viral, pois a proteína L1 corresponde a 80% da proteína do vírus, sendo responsável por formar a maior parte do capsídeo, além disso ela pode ser utilizada no processo de identificação de novos tipos de HPV (HARIHARAN; PILLAI, 2009; RAUTAVA; SYRJANEM, 2011). Já o gene L2, está envolvido no processo de codificação das proteínas que participam do empacotamento do DNA viral (STANLEY; PETT; COLEMAN, 2007). A região reguladora LCR (*Long Control Region*) possui de 500 a 1.000 pb, e representa 10% do genoma do vírus, apresentando sequências regulatórias, as quais conseguem agir de forma direta nos processos de replicação, transcrição e pós-transcrição viral, a partir do elemento regulador tardio (do inglês: *Late Regulatory Element* - LRE) (GRAHAM, 2010).

3.3.3 Tipos virais

O vírus do HPV infecta tanto tecidos cutâneos como mucosas, sendo classificados com base no tropismo tecidual, em mucosotrópicos e cutaneotrópicos, divididos em três grupos:

cutâneo, mucosas e associados a Epidermodisplasia Verruciforme (EV), doença genética de caráter autossômico recessivo, na qual os indivíduos que são acometidos tendem a apresentar uma maior suscetibilidade à infecção disseminada por tipos diferentes do vírus HPV (LETO *et al.*, 2011) (Tabela 2). No entanto, essa categorização é considerada arbitrária, devido os tipos virais apresentarem tropismo no epitélio escamoso estratificado. Além disso, os tipos cutâneos também podem ser detectados nas regiões genitais.

Tabela 2 – Classificação dos tipos de HPV de acordo com o seu tropismo tecidual.

Localização	Tipos de HPV
Cutânea	1, 4, 41, 48, 60, 63, 65, 76, 77, 88, 95
Mucosa	6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 89
Cutânea e/ou musosa	2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62, 78, 91, 94, 101, 103
Cutânea associada à Epidermodisplasia Verruciforme (EV)	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20/46*, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50, 80, 75, 92, 93, 96, 107

* o HPV 46 é um subtipo do HPV 20

Fonte: Modificada DE VILLIERS *et al.* (2004).

Os tipos de HPVs também podem ser caracterizados quanto ao seu potencial oncogênico em: grupo de alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82); risco intermediário (HPVs 26, 53, 66); e baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) (COSTA, *et al.*, 2013) (Tabela 3). Os HPV que fazem parte do grupo de baixo risco, como os tipos virais 6 e 11, estão associados a lesões benignas e de baixo grau, como verrugas genitais (SCHIFFMAN *et al.*, 2007). Já os HPVs de alto risco, principalmente os tipos virais 16 e 18, estão associados de forma significativa com vários cânceres, incluindo o câncer uterino (BONIN *et al.*, 2017; NO *et al.*, 2010).

Tabela 3 – Classificação dos tipos de HPV com base no potencial oncogênico

Tipo de risco	Tipo de Papilomavírus Humano (HPV)
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 68, 73 e 82
Intermediário	26, 53 e 66
Baixo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70,72, 81 e CP6108

Fonte: Modificada de NO *et al.* (2010).

3.3.4 Transmissão

O vírus do HPV é transmitido através da pele e das mucosas de indivíduos infectados, tendo como principal via de transmissão o contato que ocorre de forma sexual, caracterizado como grande responsável pelo aumento dos casos (FEDRIZZI *et al.*, 2008). Contudo, o HPV também pode ser transmitido por vias não sexuais, como ocorre com os casos de verrugas cutâneas através do contato com a pele, ou por fômites (objetos pessoais, toalhas, peças íntimas etc.), e materno-fetal (gestacional, intra e periparto), ou seja, da mãe para o filho. Ainda não se sabe por quanto tempo o vírus sobrevive quando está fora do organismo, nesse sentido, a transmissão por fômites é viável por um curto período de tempo (SANTOS; MAIORAL; HAAS, 2011). A também outros mecanismos de transmissão do vírus HPV, que inclui a autoinfecção por contato genital-oral e transmissão a partir da prática de sexo oral.

3.3.5 Infecção

A infecção pelo HPV ocorre com a entrada do vírus na célula através das camadas basais do epitélio escamoso estratificado, por fissuras ou pequenas lesões cutâneas (HSUEH, 2009). Quando esse processo ocorre, o vírus passa um período adormecido (sem causar lesões) que dura duas a três semanas, tempo necessário para que os queratinócitos (presentes nas camadas basais) se diferenciam e descamam, pois, a replicação viral ocorre em queratinócitos diferenciados, primeiras células a serem infectadas (ROSA *et al.*, 2009; STANLEY, 2008). Para que ocorra replicação, as proteínas virais começam a retardar a condensação nuclear dos queratinócitos em diferenciação. Durante esse processo, são formados os coilócitos, células escamosas superficiais (maduras) do colo do útero (cérvis), as quais apresentam atipia nuclear e vacuolização perinuclear extranuclear.

Devido a interação que acontece entre as proteínas do capsídeo viral e os receptores localizados na membrana das células do hospedeiro, o vírion consegue entrar na célula e, nesse processo, ele perde seu capsídeo, deixando totalmente exposto o seu material genético à ação de enzimas nucleares, contribuindo para a expressão dos genes virais (DOORBAR; STERLING, 2001). Dessa forma, o genoma do vírus consegue ficar dentro do núcleo da célula hospedeira, na forma circular, sem está integrado ao genoma celular (forma episomal), podendo ser observado em tipos virais de baixo risco que levam à progressão das lesões benignas. Já nas infecções causadas pelos tipos virais de alto risco, que são responsáveis pelas lesões malignas, o DNA viral se integra aos cromossomos da célula hospedeira, dessa forma não ocorre a replicação viral, assim, favorece o surgimento das lesões e o desenvolvimento do câncer cervical, pois contribui para que ocorra a expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7 que são capazes de realizar a interação com proteínas, a exemplo das proteínas pRb (proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma) e p53, contribuindo para a ocorrência de alterações no ciclo celular (SANTOS; MAIORAL; HAAS, 2011).

3.3.6 Resposta imunológica

O sistema imunológico é composto por uma série de estruturas, com papel fundamental na defesa do organismo contra agentes infecciosos e células tumorais, com o objetivo de assegurar a homeostase do organismo, composto de dois mecanismos que atuam na eliminação dos antígenos (corpos estranhos) que invadem o organismo: a imunidade inata/nativa e imunidade adquirida/adaptativa (Cruvinel *et al.*, 2010; Machado, 2004; Sierra *et al.*, 2005). A imunidade inata ou nativa, atua no momento em que ocorre o contato do hospedeiro com os antígenos virais, já a imunidade adquirida ou adaptativa é restrita a determinado grupo de organismos, e se desenvolve quando o hospedeiro entra em contato com patógenos, de forma ativa ou passiva, de modo que os receptores das células começam a se desenvolver durante os rearranjos gênicos (Abbas Abul; Lichtman; Pillai, 2011; Magnadottir, 2006; Kawai; Akira, 2007).

Quando o vírus HPV consegue entrar no organismo através das mucosas cervico-vaginais, o sistema imunológico inato é ativado, produzindo contra o vírus as defensinas, proteínas que conferem proteção às membranas das células do hospedeiro. Além disso, ocorre a ativação de algumas células de defesa, como as células Natural Killers (NK), na secreção de interferons (IFNs) do tipo I (α e β) e de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , fator de

necrose tumoral- α) e na ativação dos fagócitos locais (Lorenzi; Coelho-Castelo, 2008). A secreção dos IFNs é iniciada pela ligação de receptores tipo-Toll (TLR) presentes em sequências específicas do vírus que desencadeiam a sinalização intracelular. Dentre as células presentes no organismo, as células NK e os fagocitose são utilizados no controle das infecções virais, sendo as principais células do sistema imunológico inato (Lehner, 2003).

As células dendríticas (DC) são as responsáveis por ativar o sistema imunológico adquirido. Além disso, as células dendríticas conseguem migrar para os órgãos linfoides secundários e assumem a função de células apresentadoras de antígenos (APC), após a maturação, processo esse que ocorre depois que acontece o reconhecimento do agente invasor. As células APC apresentam os antígenos aos linfócitos T naive, e seguem desencadeando uma resposta imunológica adquirida (Almeida, 2009; Lorenzi; Coelho-Castelo, 2008). A ativação dos receptores tipo-Toll por componentes virais, consegue estimular a resposta imunológica inata, perante a estimulação da síntese de citocinas, como interferons (IFNs) do tipo I, IL-1 β e IL-6, que conseguem atuar de forma direta na replicação viral. Esse processo faz com que as células imunológicas migrem para os locais de infecção e à ativação de células dendríticas, favorecendo a ocorrência da resposta imunológica adquirida (Almeida, 2009).

3.4 Associação do HPV com o câncer cervical

A infecção persistente pelo vírus HPV no colo do útero, causada por algum dos 15 genótipos carcinogênicos, vem sendo associada com o surgimento de lesões cervicais e carcinoma cervical (Phuthong *et al.*, 2018). Estudos mostram que mulheres com respostas pró-inflamatória reduzida para HPV, estão mais susceptíveis à persistência por esse vírus, dessa forma, são mais vulneráveis a desenvolver neoplasia cervical (Maragon *et al.*, 2013). Embora a infecção por HPV desempenhe um papel importante no desenvolvimento de lesões cervicais, estudos mostram que nem todas as lesões contendo os vírus de alto risco progride para tumores cervicais, e mulheres que são infectadas pelos tipos virais considerados oncogênicos (HPV 16 e HPV 18), podem nunca chegar a desenvolver uma neoplasia (Lehner, 2003). Esse fato nos leva à investigação de outros fatores associados, como a ineficiência da resposta imune do hospedeiro em combater o vírus

Mesmo que exista diversos outros cofatores de risco envolvidos na carcinogênese, é confirmado em vários estudos que o vírus HPV, principalmente o HPV 16 e 18, considerados de alto risco, é o fator etiológico mais importante no início das anormalidades intraepiteliais

cervicais, sendo Os tipos virais de alto risco identificados em 70% dos casos de câncer cervical no mundo (Bonin *et al.*, 2017; Gillison *et al.*, 2008; INCA, 2023; WHO, 2010).

Entretanto, embora a taxa de incidência da infecção por HPV seja elevada (cerca de 604 mil novos casos anualmente no mundo), ela é transitória, ou seja, desaparece sem o surgimento de sintomas, espontaneamente pelo organismo do indivíduo. Uma pequena parcela dessas infecções evolui para um quadro clínico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), que corresponde a uma lesão precursora de câncer (Pratap *et al.*, 2022).

3.5 Prevenção e diagnóstico do HPV e câncer cervical

O câncer cervical é uma afecção progressiva, a qual é definida por transformações intra-epiteliais, apresentando etapas definidas e evolução lenta, podendo evoluir para um estágio invasivo (Brasil, 2017). No entanto, o diagnóstico e tratamento precoces do HPV e lesões precursoras de câncer são eficientes, devido contribuírem para um tratamento mais rápido e eficaz podendo evitar a progressão para o câncer cervical invasivo (Davim *et al.*, 2005). Neste sentido, para a Organização Mundial de Saúde (2022), o método mais eficiente, seguro e de baixo risco para a prevenção e detecção precoce do câncer cervical é a colpocitologia oncótica ou exame Papanicolau (exame citopatológico do colo do útero), o qual tem causado modificações efetivas nas taxas de incidência e mortalidade por este câncer. Nesse exame é realizada a coleta de amostras do colo do útero para identificar anormalidades, como alterações de características morfológicas ou nucleares (Santana *et al.*, 2008).

Detectar e identificar o vírus HPV é importante para prevenir o surgimento do câncer uterino, pois este vírus é o agente etiológico da patologia. Desta forma, é possível realizar o diagnóstico da infecção através de exames histopatológicos das lesões, realizados através de biópsias, e técnicas moleculares como a hibridização e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *polimerase chain reaction*), para a prevenção do câncer cervical, em virtude das limitações que o diagnóstico sorológico apresenta em sua precisão. Quando a infecção é identificada no início, é possível realizar o acompanhamento do paciente para que seja evitado o desenvolvimento das lesões precursoras de câncer ou realizar um tratamento precoce (Molijn *et al.*, 2005). Além disso, em virtude de ser uma infecção sexualmente transmissível, se faz necessário a utilização de preservativos como forma preventiva, embora não ofereça 100% de proteção contra o vírus HPV. Não realizar a penetração vaginal também não garante proteção contra a infecção, pois estudos mostram que foi identificada a presença do vírus em

aproximadamente 20% das mulheres que nunca chegaram a ter relação sexual (Giraldo *et al.*, 2008).

3.6 Vacina contra o HPV

A vacinação se caracteriza como um método eficiente contra diversas doenças infecciosas. Visando combater o vírus HPV e conseqüentemente diminuir os casos de lesões induzidas por esse vírus, duas vacinas foram criadas e fornecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (OSIS; Duarte; Sousa, 2014). O desenvolvimento dessas vacinas para combater o vírus se mostrou a primeira alternativa profilática, visto que a prevenção ocorria através do exame Papanicolau. Sua aprovação ocorreu em 2006 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), agência de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Brasil (Silva *et al.*, 2009; Zardo *et al.*, 2014).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos aprovou a comercialização das vacinas: (1) Cervarix® ou Silgard® (bivalente) fabricada pela GlaxoSmithKline, contra os HPVs de alto risco, tipos 16 e 18 associados a infecções persistente e progressão de lesões precursoras de câncer cervical, e (2) Gardasil® (quadrivalente) fabricada pela Merck Sharp & Dohme, apresenta proteção contra quatro subtipos do HPV (6, 11, 16 e 18). Os HPVs de baixo risco, tipos 6 e 11, correspondem a 90% dos casos de verrugas na região genital (Castellsague *et al.*, 2011; Gutiérrez-Hoya; Soto-Cruz, 2020). Essas vacinas são formadas por partículas que se assemelham ao vírus (*virus-like particles* - VLP), sintetizadas pelo gene da proteína L1 presente no capsídeo do vírus HPV, no entanto, não possuem o DNA viral, sendo incapaz de causar uma infecção, atuando na produção de anticorpos para cada tipo de HPV presente na vacina, que serão liberados na mucosa genital, para evitar precocemente o quadro infeccioso (Castellsague *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2009).

Para a prevenção de câncer cervical, o Ministério da Saúde (MS) utiliza a vacina quadrivalente para imunizar a população brasileira, preferencialmente entre 9 e 14 anos, pois é quando ela é mais eficaz. Esses adolescentes receberam duas doses da vacina (0 e 6 meses) com intervalo de seis meses. Mulheres e homens dos 9 a 45 anos com HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), recebem um esquema de três doses da vacina (0, 2 e 6 meses), sendo recomendado antes de iniciar a vida sexual (Brasil, 2023).

Além dessas vacinas contra o HPV, foi fabricada uma terceira vacina, a Gardasil9 ou HPV9 (nonavalente), que protege contra nove tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 53 e 58) (Joura *et al.*, 2015). Desde março de 2023, o uso dessa vacina foi aprovado no Brasil contra o

HPV. Um estudo randomizado com 14.215 mil mulheres entre 16 a 26 anos, para avaliar a eficácia e a imunogenicidade da Gardasil9 contra infecções e câncer uterino, verificou eficiência da vacina contra lesões de alto grau, apresentando uma taxa de 96,7% (IC = 95%, 80,9-99,8) para mulheres vacinadas com a HPV9. Nesse sentido, enquanto que a vacina quadrivalente protege em 70% contra o HPV, a vacina nonavalente protege em cerca de 90% contra infecções causadas pelo papilomavírus e lesões precursoras de câncer cervical (LEVI, 2023).

3.7 Citocinas

Citocinas são moléculas de polipeptídeos ou glicoproteínas com peso molecular que varia de 8 a 30 kDa (Quilodalton), hidrossolúveis e extracelulares, capazes de apresentar um caráter pleiotrópico, de modo que uma mesma citocina pode apresentar efeitos sobre vários tipos de células, e as mesmas podem ser produzidas e secretadas por diferentes tipos celulares do sistema imune (DUVLIS *et al.*, 2020). Elas podem ser categorizadas com base na resposta inflamatória, sendo pró-inflamatórias (Th1), quando atuam aumentando a resposta imune, sendo elas as interleucinas (IL) 1, 2, 6 e 7 e o fator de necrose tumoral (TNF); e anti-inflamatórias (Th2), quando agem de forma atenuada, como as interleucinas (IL) 4, 10, 13 e fator transformador do crescimento – beta (FTC β), esta variação está relacionada com o microambiente que a citocina está inserida (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As citocinas são moléculas responsáveis por conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, contudo não é possível classificá-las de acordo com a célula de origem ou função biológica, dessa forma, são agrupadas em interleucinas (IL), recebendo numeração (IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento (FTC) (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Neste sentido, pode ser observado na literatura diversos estudos que tem o objetivo de investigar a associação de polimorfismos em gene de citocinas, que conseguem atuar diretamente modulando a resposta imunológica ou sua associação com infecções e suscetibilidade genética a inúmeras doenças, como a infecção pelo HPV e o câncer cervical (PEREIRA *et al.*, 2020).

3.8 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP)

Polimorfismos são variações genéticas que ocorrem na sequência de DNA, como consequência de mutações, podendo surgir de formas variadas, como: Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR do inglês, *variable number of tandem repeats*), que consiste na alteração do padrão de repetição de nucleotídeos, e o Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP - do inglês, *single nucleotide polymorphism*), ou seja, a troca de um nucleotídeo por outro. Os polimorfismos do tipo SNPs, se apresentam como os mais conhecidos e frequentes nos genomas, podendo ser encontrados em regiões distintas de um gene (éxons, íntrons e regiões reguladoras) (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004).

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) é considerada a classe mais geral de polimorfismos que surgem a partir de alterações em uma única base de nucleotídeo na sequência de DNA. Dessa forma, realizando a análise de polimorfismos nos genes de citocinas é possível determinar perfis genéticos distintos, traçar relações entre populações e compreender o papel que exercem na susceptibilidade genética a diversas doenças (MARAGON *et al.*, 2013).

3.9 Interleucina – 10

A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória, com funções imunossupressoras, em especial quando ocorre uma resposta imune para combater organismos estranhos que invadem o corpo e células tumorais, resultando numa diminuição na eficiência do processo de eliminação dos vírus, a exemplo do HPV, favorecendo a permanência da infecção por esse vírus, produzindo um microambiente imunossupressor, acelerando o crescimento do tumor (PARADKAR *et al.*, 2014; ZIDI *et al.*, 2015). A IL-10 tem como principal fonte os linfócitos T, conseguindo diminuir a produção e impedindo a ação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL -2, IL-6, IL-12, TNF- α e INF- γ), afetando uma resposta inflamatória eficaz contra patógenos (BIJJIGA; MARTINO, 2011; CHARGAS *et al.*, 2013). Além disso, ela impede a ativação dos macrófagos, que são responsáveis por iniciar a resposta imune e a eliminação de células danificadas e antígenos no organismo (GUO *et al.*, 2018).

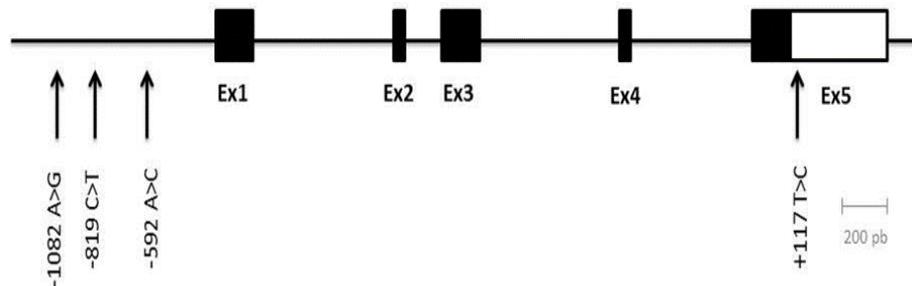
As inibições realizadas pela IL-10 afetam a qualidade das respostas imunes, contribuindo para a instalação de vírus, favorecendo o aparecimento de lesões cervicais após a infecção pelo vírus HPV (GUO *et al.*, 2018; STANCZUK *et al.*, 2001). Foi observado na literatura que 40 variantes de SNP no gene da IL-10 podem desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como câncer gástrico, de mama, pulmão, colorretal

e câncer cervical (BERTI *et al.*, 2017). Altos níveis de IL-10 foram encontrados na secreção cervico-vaginal de mulheres com HSIL associado a infecção causada pelo HPV (MHATRE *et al.*, 2012). E os níveis séricos de IL-10 se apresentaram altos em mulheres com HSIL e câncer cervical invasivo, em comparação com mulheres saudáveis (FENG *et al.*, 2012).

3.10 SNP IL-10 -819 C>T (rs1800871)

O gene da citocina IL-10 está localizado no cromossomo 1 entre 1q31 e 1q32, tendo um comprimento de 5 quilobases (kb), que compõem 5 éxons responsáveis por codificar a citocina. Diversos polimorfismos estão presentes em diferentes regiões do gene IL-10. Os mais conhecidos e estudados são: -1082 A>G, -819 C>T e -592 A>C, e um no éxon 5 (+117) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura e localização do gene IL-10 no cromossomo 1 e os polimorfismos presentes nessa região



Legenda: Ex: éxons; SNPs -1082 A>G, -819 C>T, -592 A>C localizados na região promotora do gene IL-10.

Fonte: COSTA *et al.* (2013).

Estudos mostram que a atividade transcricional do gene IL-10 pode ser regulada pelo haplótipo de três SNPs que estão localizados na região promotora do gene, são eles: -1082 A>G, -819 C>T e -592 A>C (ESKDALE *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1992). Estes SNPs afetam diretamente a atividade transcricional do gene IL-10, ocorrendo aumento ou diminuição nos níveis de expressão gênica. Foi verificado no estudo de Tesse *et al.*, (2012), que o haplótipo GCC (-1082, -819, -592) mostrou aumentar significativamente os níveis de produção da IL-10. Já no estudo de Singhal *et al.*, (2015), o haplótipo GTC (-1082, -819, -592) aumentou os níveis séricos de IL-10 em mulheres diagnosticadas com carcinoma cervical.

Uma importante variável no gene IL-10 é o SNP -819 C>T (rs1800871), presente na região promotora, denominado assim pois está localizado a 819 nucleotídeos anteriormente ao início da região transcrita, e sua variante consiste na troca por substituição de uma Citosina (C)

por uma Timina (T). Nesse sentido, este SNP foi associado à expressão diferencial do referido gene, de modo que indivíduos portadores do alelo T apresentaram maiores níveis de transcrição de RNAm e expressão de proteínas (TORRES-POVEDA *et al.*, 2017). Esta variação genética do hospedeiro está associada às diferentes respostas imunológicas, podendo estar relacionada com a suscetibilidade/proteção de algumas doenças. Com base nos resultados de estudos presentes na literatura, os SNPs que fazem parte da região promotora do gene *IL-10*, conseguem atuar na expressão da citocina, influenciando na susceptibilidade a doenças como o câncer cervical.

4 METODOLOGIA

4.1 Busca de dados

As buscas se iniciaram em junho de 2021, nas bases de dados PubMed, Science Direct, Embase, Portal Regional da BVS, Scopus e Web of Science, sem restrições de tempo e idioma. A pergunta de pesquisa foi elaborada com base no acrônimo PECOS com População (P): mulheres maiores de 18 anos de qualquer parte do mundo; Exposição (E): Polimorfismos no gene que codifica a IL-10; Controle (C): Mulheres saudáveis; Outcome/Desfecho (O): Câncer cervical; e Tipo de Estudo (S): Caso-Controlle. A pergunta foi sintetizada da seguinte forma: “O polimorfismo -819 C>T (RS1800871) no gene que codifica a Interleucina-10 está relacionado ao risco de desenvolver câncer cervical em mulheres infectadas por HPV no Agreste Alagoano?”.

A estratégia utilizada para realizar as buscas de artigos foi construída utilizando os operadores booleanos AND e OR, e descritores do DeCS (Descritores em Ciências da Saúde). Houve também a adição de sinônimos na estratégia de busca, tendo em vista as várias formas de escrita dos descritores. A estratégia ficou da seguinte forma: (“Interleukin-10” OR IL-10) AND (expression OR serum OR levels) AND (“HPV” OR “human papillomavirus”) AND (“cervical cancer” OR “cervical carcinoma”). Durante a seleção dos artigos foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: artigos provenientes de estudos primários; estudos do tipo caso-controlle; estudos que abordem a relação de polimorfismos no gene IL-10 e associação com o câncer cervical, sem restringir idiomas. E os critérios de exclusão foram: revisões e artigos que não respondessem à pergunta de pesquisa e que não apresentassem frequências genótípicas e alélicas.

Os resultados das buscas foram registrados no software Microsoft Office Excel Professional Plus 2019 e selecionados com base nos critérios citados. Os registros que foram obtidos nas buscas tiveram as duplicatas retiradas e seguiram para a etapa de leitura de título e resumo, sendo selecionados os artigos que abordassem os critérios de inclusão. Em seguida, foi realizada a leitura de texto completo, e excluídos os artigos que não atendessem aos critérios de inclusão.

4.2 Aspectos éticos e desenho do estudo

Este estudo é do tipo caso-controle, no qual o grupo caso, é composto por mulheres maiores de 18 anos que residem no agreste alagoano e que já iniciaram a atividade sexual. Para formar o grupo caso, foram seguidos os seguintes critérios de inclusão: mulheres diagnosticadas com câncer cervical, confirmado por biópsia, oriundas do atendimento no SUS do Agreste Alagoano, apresentando resultado positivo para a infecção do vírus HPV. Já o grupo controle, foi formado por mulheres saudáveis, sem alterações do epitélio cervical e com diagnóstico negativo para HPV. Os critérios de exclusão foram: mulheres imunossuprimidas, com imunodeficiência, menores de 18 anos e grávidas. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em janeiro de 2015, sob o parecer número 921.700 (ANEXO I). As mulheres que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) autorizando sua participação (ANEXO II).

4.3 Coleta e armazenamento do material biológico

As amostras foram coletadas de mulheres que tinham realizado o exame Papanicolau, atendidas pelas unidades de atenção primária do município de Arapiraca (AL), vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS), no período de novembro de 2014 a dezembro de 2015, para serem utilizadas no rastreamento do câncer cervical. Por meio do exame, foram coletados os seguintes materiais biológicos: sangue periférico, células do esfregaço da mucosa oral, células do esfregaço do colo uterino e tecido parafinado, ambos coletados com auxílio de escova citológica (Cytobrush®) e espátula de Ayre, por discentes do curso de enfermagem que foram capacitados pela UFAL, os quais estavam sendo supervisionados a todo momento por enfermeiros das unidades básicas. As amostras foram encaminhadas sob refrigeração para análise no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG), localizado no *campus* Arapiraca – UFAL, conservadas a -80% °C, onde receberam numeração para preservar a identidade das participantes. As participantes da pesquisa apresentaram resultados citológicos considerados dentro da normalidade, dessa forma, para compor o grupo caso, foi necessário utilizar um banco de amostras do Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer (NPDC) do município de Arapiraca. Esse banco apresentava 141 amostras com diagnóstico confirmado para o carcinoma cervical, no período entre 2015 a 2017.

4.4 Extração do DNA humano e viral

A extração do DNA genômico humano das amostras de células do esfregaço do colo uterino, sangue periférico e tecido parafinado foi realizada com base no protocolo do fabricante do kit comercial Promega® (*Company Eppendorf, Hamburg, Germany*). Para a extração do material genético de células do esfregaço da mucosa oral, foi utilizado o método NaCl, etanol a 70%-99,8%, e proteinase K diluída em 10 mg/mL seguindo as instruções do método *salting out*. Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas a -20° C em tubos de 1,5mL, nomeados com um código de identificação atribuído a cada uma das participantes do estudo.

4.5 Quantificação e verificação do estado do DNA

A concentração e pureza do DNA extraído passou por uma análise utilizando a técnica de espectrofotometria (*Biophotometerplus, Eppendorf*), pela razão das absorbâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (nanômetro), no qual os resultados que estiveram entre 1,7 e 1,9 tiveram um DNA mais puro. Em seguida, o material genético foi verificado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese a 100 V (volts) por 80 minutos. O DNA foi visualizado através do transluminador com luz UV (Ultra Violeta) e, para verificar a integridade do material genético, foi utilizado o equipamento de captura de imagem *L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil)*, onde foi possível fotografá-lo para posterior análise.

4.6 Detecção viral

As amostras que tiveram uma concentração satisfatória (>20 ng/μL) e um DNA em um bom estado após a verificação no gel, foram submetidas à amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês polymerase chain reaction), utilizando *primers* para realizar a detecção do gene da *β-actina humana*: forward (5'- AGCGGGAAATCGTGCGTG - 3') e reverse (5'- GGTGATGACCTGGCCGTC - 3'), que consegue amplificar um fragmento de 134 pb, utilizado para verificar a qualidade do DNA e também como controle interno da reação. Para amplificação dos fragmentos de DNA foi utilizado o equipamento termociclador Swift® de ESCO®, por meio das seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C

por 1 minutos, 1 ciclo com extensão final a 72°C por 5 minutos.

As amostras que amplificaram para o gene *β-actina humana* foram designadas a detecção viral utilizando a PCR com os primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGAT C-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG- 3') para amplificação do gene L1, localizado no material genético do vírus HPV. Para diminuir a probabilidade de resultados falso-positivos e obter um diagnóstico mais sensível, foi realizada a técnica de *Nested-PCR*, utilizando os iniciadores GP5+ (5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3') GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'). A PCR de ambos iniciadores foi realizada utilizando o termociclador Swift® de ESCO®, com 12,5µL de volume final, contendo 6,25µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega®), 1µL de cada primer (Forward-FW e Reverse-RV) e 3,25µL de H2O livre de nucleases, de acordo com o protocolo de Demathe *et al.* (2010).

Os resultados obtidos em cada reação foram submetidos a eletroforese com voltagem constante de 100 volts e as bandas visualizadas em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, e fotografado pelo aparelho *L.Pix Transilluminator* (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Assim, a presença da banda de beta-actina confirma a presença de DNA humano, e MY e GP confirmam a presença de DNA viral. Na Tabela 4 podem ser observadas as informações sobre a sequência dos primers utilizados na detecção do HPV, assim como os ciclos e o tamanho dos fragmentos esperados na amplificação por PCR.

Tabela 4 – Primers e condições da reação utilizados na detecção do vírus HPV com base na técnica nested Polymerase Chain Reaction (nPCR).

Iniciadores	Ciclos de reação	Tamanho do fragmento	Gene Alvo
MY09 5' - CGTCCMARRGGAWACTGATC -3'	95° por 2min. 95° por 30s 55° por 1min	450 pb	<i>L1</i> de HPV
MY11 5' - GCMCAGGGWCATAAYAATGG - 3'	72° por 1min 72° por 5min		
GP5+ 5' - TTTGTACTGTGGTAGATACTAC - 3'	95° por 2min. 95° por 1min 45° por 1min	150 pb	<i>L1</i> de HPV
GP6+ 5' -GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC- 3'	72° por 1min 72° por 5min		

Fonte: Autor desta pesquisa, (2023).

4.7 Genotipagem do polimorfismo

A genotipagem do polimorfismo no gene do *IL-10* (-819C>T (rs1800871)) foi realizada por PCR em tempo real, por meio do método de discriminação alélica utilizando sonda *TaqMan*. O volume final da reação foi de aproximadamente 10 μ L, contendo 5 μ L de solução *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems®), com TaqDNA polimerase, desoxirribonucleotídeos trifosfatados e tampão com MgCl₂; 0,125 μ L de sonda referente ao SNP rs1800871 (*IL-10* -819C>T) e 4,87 μ L de DNA extraído (4 ng/ μ L). As reações ocorreram utilizando o equipamento ABI StepOneplus da Applied Biosystems® de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 92 °C por 15s, anelamento e extensão 60 °C por 1 min. Em todas as reações foram utilizados os controles negativos, formados por todos os reagentes, exceto a amostra de DNA. Os resultados das reações foram fornecidos pelo StepOne Software versão 2.2.2 em forma de gráficos com as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada participante.

4.8 Análises estatísticas

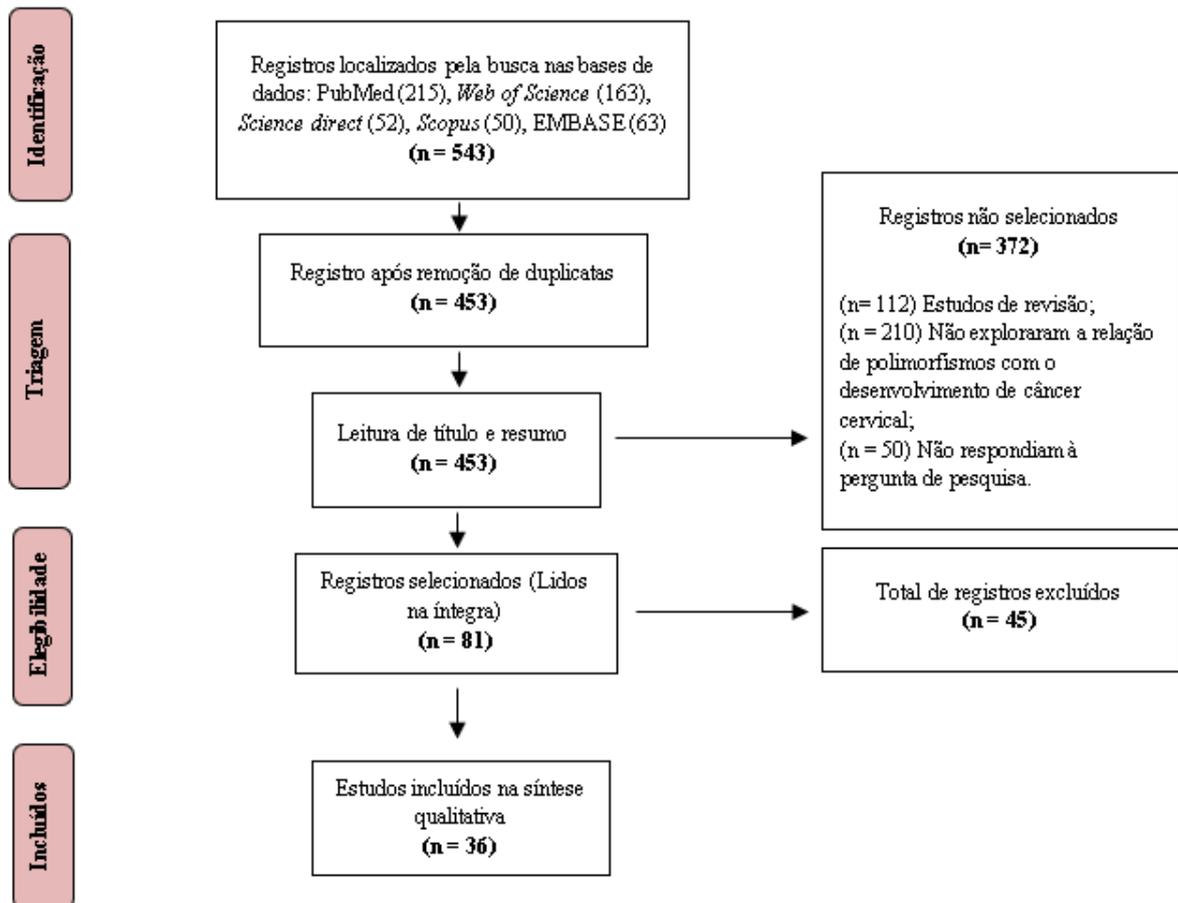
Para obter o resultado das análises estatísticas, foi utilizado o *software* SPSS 23.0. Através do teste de qui-quadrado (χ^2) foi possível testar as frequências genotípicas quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Por meio da regressão logística foi possível comparar as associações genotípicas e alélicas entre os grupos, e obter os valores de associação e *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%, na qual o valor de OR<1 está associado a proteção e OR>1 por sua vez, indica susceptibilidade/risco. Diferentes modelos genéticos (codominante, dominante, recessivo, sobredominante e log aditivo) foram utilizados para se chegar ao resultado das associações genéticas. Valores de *p* menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O poder da amostra foi analisado através do *software* Gpower versão 3.0, utilizando os testes Qui-quadrado, Goodness-of-fit: Contingency tables e Post hoc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos gerais

Utilizando a estratégia de busca mencionada na metodologia, foram identificados 543 documentos. Durante a etapa de seleção e aplicação dos critérios de elegibilidade, foram retirados da avaliação 507 artigos. Destes, 90 estavam duplicados, 112 eram revisões, 210 não abordavam a temática do estudo e 50 não respondiam à pergunta de pesquisa. Dos 81 estudos selecionados para leitura na íntegra, 45 foram excluídos por não se enquadrarem nos critérios de inclusão. Após a aplicação dos critérios de elegibilidade, 36 artigos foram incluídos na síntese qualitativa (Figura 5), sendo utilizados na construção dos tópicos desse presente estudo, e além desses artigos, foi realizada novas buscas nas bases de dados para complementar as informações.

Figura 5 – Fluxograma de seleção dos estudos



Fonte: Autor desta pesquisa (2023).

As características gerais dos grupos câncer cervical e controles saudáveis são apresentadas na Tabela 5, como idade, infecção pelo HPV e tipo de câncer do colo do útero. A distribuição por faixa etária (≤ 35 anos, 36-50, > 50) não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,144$). No grupo caso, o tipo de câncer cervical mais frequente foi o carcinoma de células escamosas (in situ) com 77,8% ($n=35$), e o menos frequente foi o adenocarcinoma (invasivo) com 4,4% ($n=2$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Caracterização dos grupos câncer cervical e controles saudáveis

Idade (Média)	*CC n (%)	Controles n (%)	χ^2	P
Idade por faixa etária				
≤ 35 anos	10 (22,2%)	58 (32,4%)	3.873	0.144
36-50	26 (57,8%)	54 (30,2%)		
> 50	9 (20%)	48 (26,8%)		
Não relataram idade	0 (0%)	19 (10,6)		
Infecção pelo HPV				
HPV-positivo	45 (100%)	0 (0%)		
HPV-negativo	0 (0%)	179 (100%)		
Tipo de câncer				
Carcinoma de células escamosas (in situ)	35 (77,8%)			
Carcinoma de células escamosas (invasivo)	4 (8,9%)			
Adenocarcinoma (in situ)	4 (8,9%)			

Legenda: *CC = carcinoma cervical.

Fonte: Autor desta pesquisa (2023).

5.2 Detecção do HPV

As mulheres que participaram da pesquisa nas unidades básicas de saúde, foram submetidas ao exame preventivo de rotina e apresentaram resultados negativos para a infecção pelo HPV, totalizando 179 participantes, as quais foram incluídas no grupo controle. Dessa forma, foi utilizado um banco de amostras de mulheres diagnosticadas com câncer cervical do Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer (NPDC), do município de Arapiraca no período entre 2015 a 2017, para compor o grupo caso. Essa amostra continha 141 blocos de tecido parafinado, no entanto, 96 não amplificaram na PCR do controle interno e da detecção viral, com isso, o material genético ficou degradado após a realização da extração do DNA. As

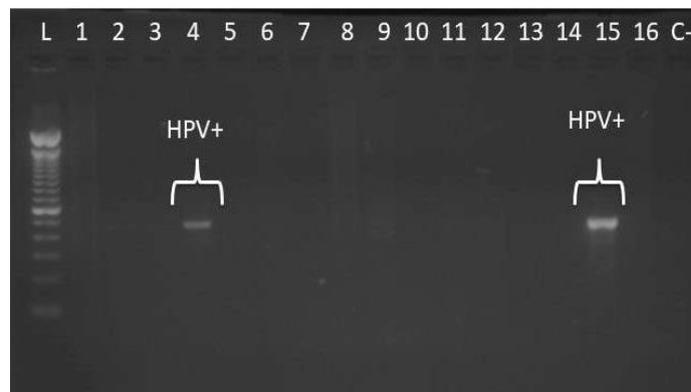
amostras que amplificaram (n=45) apresentaram HPV positivo, com isso o grupo caso foi composto por 45 amostras (tabela 5). Para obter o diagnóstico molecular do HPV, foi realizado um nPCR convencional com os primers β -actina humana (*Forward-FW e Reverse-RV*), MY09/MY11 e GP5+/GP6+. Os resultados foram visualizados em gel de agarose a 2% corado em brometo de etídio, como mostra nas figuras 6, 7 e 8.

Figura 6 – Gel de eletroforese da PCR com os primers β -actina humana para controle interno da detecção do HPV



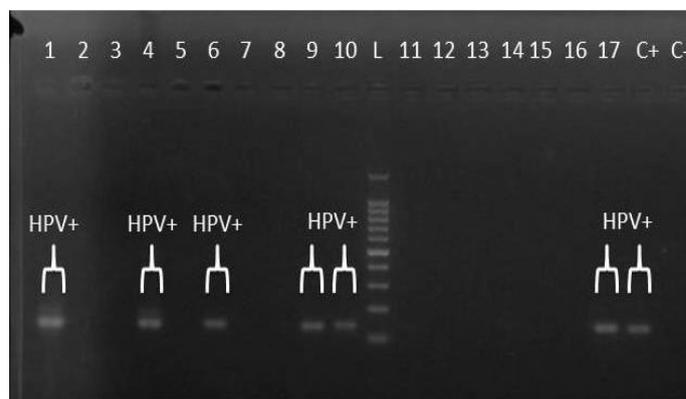
Legenda: L- ladder 100pb; 1-12: amostras; C+: controle positivo; C-: controle negativo; tamanho do fragmento: 134pb.
Fonte: Autor desta pesquisa (2023).

Figura 7 – Gel de eletroforese da PCR com primers MY09/MY11 que anelam na região L1 do HPV para detecção viral



Legenda: L- ladder 100pb; 1-16: amostras; C-: controle negativo; tamanho do fragmento: 450pb.
Fonte: Autor desta pesquisa (2023).

Figura 8 – Gel de eletroforese da nPCR com primers GP5+/GP6+ que anelam na região L1 do HPV para detecção viral



Legenda: L- ladder 100pb; 1-17: amostras; C+: controle positivo; C-: controle negativo; tamanho do fragmento: 150pb.

Fonte: Autor desta pesquisa (2023).

5.3 Genotipagem por discriminação alélica

A genotipagem do SNP *IL-10* -819C>T (rs1800871) foi realizada por discriminação alélica pela PCR em tempo real, como descrito na metodologia. A tabela 6 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genótípicas referente ao SNP (rs1800871). Após a realização da genotipagem, foi observado que a frequência do genótipo homozigoto -819C/C (49,1%) se apresentou mais frequente no grupo controle. Já o genótipo heterozigoto -819C/T (57,1%), foi mais predominante no grupo caso. Uma associação significativa foi observada entre o SNP *IL-10* -819 C/T e o câncer cervical (Tabela 6).

O genótipo -819C/T (57,1%) no modelo codominante, teve uma frequência maior no grupo caso, em relação ao genótipo -819C/C (28,6%), quando comparado ao grupo controle (-819C/T (38,9%) e -819C/C (49,1%)). Dessa forma, o genótipo -819C/T foi associado com o aumento do risco para câncer uterino e HPV positivo ($p=0,035$; OR com 95% IC = 2.52 [1.07-5.97]). Ao realizar a adição dos genótipos -819C/T+TT no modelo dominante, estes foram significativamente mais frequentes no grupo caso em relação ao grupo controle. Neste sentido, os carreadores do alelo -819T também foram associados com o aumento do risco para o câncer cervical em mulheres infectadas pelo HPV ($p=0,037$; OR com 95% IC = 2.41 [1.06-5.50]). Esta associação apresentou um poder amostral de 99%, indicando que a amostra é representativa para esta análise. Todos os resultados sugerem que os carreadores T (-819C/T+TT) podem

umentar o risco para o câncer cervical, em mulheres infectadas por HPV.

Tabela 6 – Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do SNP IL-10 -819 C>T e suas associações com o carcinoma cervical

<i>IL-10 -819C>T</i>		Controles	¹ CC	Controles versus CC	² EHW	Gpower
		Nº (frequências)		OR com 95% IC	P	
Associação alélica	C	148 (68,5%)	40 (57,1%)	Referência		
	T	68 (31,5%)	30 (42,9%)	1.63 (0.94-2.84)	0.083	
Modelos gênicos						
Codominante	C/C	53 (49,1%)	10 (28,6%)	Referência		
	C/T	42 (38,9%)	20 (57,1%)	2.52 (1.07-5.97)	0.035	0.71 99%
	T/T	13 (12%)	5 (14,3%)	2.04 (0.59-7.00)	0.258	
Dominante	C/C	53 (49,1%)	10 (28,6%)	Referência		
	C/T+T/T	55 (50,9%)	25 (71,4%)	2.41 (1.06-5.50)	0.037	
Recessivo	C/C+C/T	95 (88%)	30 (85,7%)	Referência		
	T/T	13 (12%)	5 (14,3%)	1.22 (0.40-3.70)	0.728	
Sobredominante	C/C+T/T	66 (61,1%)	15 (42,9%)	Referência		
	C/T	42 (38,9%)	20 (57,1%)	2.09 (0.97-4.54)	0,061	

Legenda: ¹CC = carcinoma cervical; ²EHW = Equilíbrio de Hardy Weinberg

Fonte: Autor desta pesquisa (2023).

A Interleucina 10 é uma citocina anti-inflamatória que apresenta atividades imunossupressoras, geralmente quando ocorre uma resposta imune contra organismos estranhos que invadem o corpo, assim como, durante infecções por vírus (Paradkar *et al.*, 2014). Alguns estudos mostraram que os níveis de expressão de IL-10 aumentaram em lesões cervicais e infecções virais (MIN; PU; GU, 2018). No estudo de Torres-Poveda *et al.*, (2016), pacientes com câncer cervical apresentaram altos níveis séricos de IL-10, em comparação com mulheres saudáveis. Devido às suas propriedades imunossupressoras, a IL-10 é capaz de desempenhar um importante papel na formação de um microambiente favorável à evasão da resposta imune contra o vírus HPV e à progressão de lesões precursoras de câncer uterino (PRATA *et al.*, 2015).

Quando há um predomínio de IL-10, ocorre uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o INF γ e TNF- α que desempenham funções importantes na atividade antiviral e antitumoral, prejudicando uma resposta inflamatória contra patógenos (Bijjiga; Martino, 2011; Chargas *et al.*, 2013). Diante disso, os altos níveis de IL-10 contribuem para possibilitar um efeito imunossupressor contra o vírus HPV, tornando possível o surgimento de infecções e câncer uterino. Segundo alguns estudos, os polimorfismos -1082 A/G, -592 A/C e -819 T/C, presentes no gene *IL-10*, podem afetar os níveis de expressão gênica (Khorrami *et*

al., 2022). Dessa forma, esses SNPs podem apresentar associação significativa com a susceptibilidade ao câncer cervical.

Neste estudo foi observado que o genótipo -819C/T e os carreadores T (-819C/T+TT), foram associados com o risco aumentado de desenvolver câncer cervical em mulheres infectadas por HPV. Em consonância com esses resultados, no estudo de Du *et al.*, (2019), realizado na china com 1.072 mulheres, o genótipo heterozigoto -819C/T apresentou associação de risco para câncer cervical ($p=0,013$; OR = 1,290; 95% CI = 1,055–1,577), e a combinação dos genótipos CC e CT foi significativa no modelo dominante ($p=0,028$; OR = 1,239; 95% CI = 1,023–1,501). No estudo de Torres-Poveda *et al.*, (2016), foi encontrado um aumento significativo dos genótipos CT + TT combinados ($p=0,006$; OR = 2,08; 95% CI = 1,237–3,514) e do alelo T ($p=0,003$; OR = 1,67; 95% CI = 1,192–2,353) em um grupo de 150 mulheres com o câncer cervical. Alguns estudos não encontraram associação significativa entre o SNP -819C>T e lesões ou carcinogênese cervical (Chagas *et al.*, 2013; Singhal *et al.*, 2015).

Estudos recentes investigaram os polimorfismos -1082 A>G e -592 C>A da região promotora do gene IL-10, e descobriram que eles estavam associados com o câncer do colo do útero, de modo que a presença desses SNPs aumentou os níveis séricos do gene contribuindo para um ambiente favorável para infecções (KHORRAMI *et al.*, 2022; PRATAP *et al.*, 2022). De acordo com o estudo de Singhal *et al.*, (2015), com 506 mulheres indianas, o haplótipo GTC das variantes (-1082, -819, -592) da região promotora do gene da IL-10, possui associação com o alto nível sérico de IL-10 e suscetibilidade ao câncer cervical ($p < 0,0001$; OR= 2,99). Em outro estudo, os níveis séricos de IL-10 aumentaram em mulheres com HSIL e câncer cervical invasivo, em comparação com mulheres saudáveis (Feng *et al.*, 2012).

Observa-se que, o papel da IL-10 na carcinogênese cervical ainda não está claro na literatura, no entanto, estudos que avaliaram o polimorfismo -819C/T mostraram que as mulheres com HPV, e que são portadoras do alelo T, são mais suscetíveis a desenvolverem câncer cervical (Torres-Poveda *et al.*, 2017; Zidi *et al.*, 2015). Assim, diversos estudos têm relacionado os polimorfismos de citocinas com o surgimento e progressão de lesões e carcinoma cervical, pois esses polimorfismos podem afetar o nível de expressão de IL-10, estando diretamente correlacionado com a gravidade dos cânceres cervicais (Barbisan *et al.*, 2012; Bermudez Morales *et al.*, 2011; Marangon *et al.*, 2013; Singhal *et al.*, 2015). Dessa forma, a associação entre a expressão de IL-10 em lesões cervicais e a infecção por HPV pode contribuir para um microambiente imunossupressor, elevando a proliferação celular e o desenvolvimento tumoral. O presente estudo colabora para entender melhor o papel dos

polimorfismos da citocina IL-10 no processo de carcinogênese cervical, os quais são potenciais biomarcadores imunológicos de susceptibilidade ou proteção para o câncer cervical.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, os carreadores do alelo T (C/T+T/T) do SNP -819C>T (rs1800871) do gene da IL-10, foi associado com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical em mulheres infectadas por HPV no Agreste Alagoano.

REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL K; LICHTMAN, ANDREW H; PILLAI, SHIV. Cellular and molecular immunology. ed. 7ª. Saunders. 2011.

ALI K.S.; ALI H.Y.; JUBRAEL J.M. Concentration levels of IL-10 and TNF α cytokines in patients with human papilloma virus (HPV) DNA⁺ and DNA⁻ cervical lesions. **J Immunotoxicol.** 2012.

ALMEIDA, Vera Sofia Teles. **Aplicação das técnicas PCR, SSCP e sequenciação automática na análise de polimorfismos no TLR7 em lesões do colo do útero.** 2009. Dissertação (Mestrado em Métodos Biomoleculares) - Universidade de Aveiro, Departamento de Química. p. 28-29, 2009.

BALASUBRAMANIAN S.P.; COX A.; BROWN N.J.; REED M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol.** 2004.

BALOCH, Zulqarnain; LI, Yuanyue; YUAN, Tao; FENG, Yue; LIU, Yan Qing; TAI, Wenlin; LIU, Li; WANG, Binghui; ZHANG, Amei; WU, Xiaomei; XIA, Xueshan. Epidemiologic characterization of human papillomavirus (HPV) infection in various regions of Yunnan Province of China. **BMC infectious diseases**, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, p.128, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. HPV. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>. Acesso em: 04 de abr. 2023.

BERMÚDEZ-MORALES, V. H.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; MORENO, J.; MADRID-MARINA, V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. **Molecular medicine reports**, 2011.

BERTI, Fernanda Costa Brandão; PEREIRA, Ana Paula Lombardi; TRUGILO, Kléber Paiva; CEBINELLI, Guilherme César Martelossi; SILVA, Lorena Flor da Rosa Santos; LOZOVYOY, Marcell Alysson Batisti; SIMÃO, Andréa Nome Colado; WATANABE, Maria Angélica Ehara; OLIVEIRA, Karen Brajão de. IL-10 gene polymorphism c.-592C>A increases HPV infection susceptibility and influences IL-10 levels in HPV infected women. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017.

BIJJIGA, Enoch; MARTINO, Ashley T. Interleukin 10 (IL-10) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, 2011.

BOCCARDO, Henrique; LEPIQUE, Ana P.; VILLA, Luisa L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 2010.

BONIN, Camila M.; Padovani Cacilda T. J.; Ferreira Alda Maria T.; Ávila Leandro S.; Machado Ana Paula; Prata Thiago T. M.; Fernandes Carlos Eurico S.; Tozetti Inês Aparecida. Predominant overexpression of CD25/FOXP3, IFN- γ , and suppressive cytokines in high-

grade lesion samples infected with human papillomavirus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2017.

CARTER, Jonathan R.; DING, Zongqun; ROSA, Bárbara R. HPV infection and cervical disease: a review. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 2011.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N.; PITISUTTITHUM, P.; FERRIS, D.; MONSONEGO, J.; AULT, K.; LUNA, J.; MYERY, E.; MALLARY, S.; BAUTISTA, O. M.; BRYAN, J.; VUOCOLO, S.; HAUPT, R. M.; SAAH, Um. End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24–45 years of age. **British journal of cancer**, 2011.

CHAGAS, Bárbara Simas; GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz; CRUZ, Heidi Lacerda Alves da; AMARAL, Carolina Maria Medeiros; CARDOSO, Marco Vinícius; NETO, Jacinto da Costa Silva; SILVA, Luiz Antônio Ferreira da; ALBUQUERQUE, Eugênia Maria Bezerra de; MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo; FREITAS, Antonio Carlos de. 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**, 2013.

COSTA, Fernando Augusto Miranda da. **Resposta imune in vitro aos antígenos de Papilomavírus Humano (HPV) em homens na cidade de São Paulo, Brasil**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

CRUVINEL, Wilson de Melo; JÚNIOR, Danilo Mesquita; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tiek Takao; SOUZA, Alexandre Wagner Silva de; SILVA, Neusa Pereira da; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira Reumatologia**, 2010.

DE LIMA CAMARA, Geni N.N.; CRUZ, Márcio Rojas; VERAS, Verônica Sales; MARTINS, Cláudia Renata F. Os papilomavírus humanos–HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências da Saúde**, 2003.

DE VILLIERS, Ethel-Michele; FAUQUET, Claude; CORRETOR, Thomas R.; BERNARD, Hans-Ulrich; HAUSEN, Harald de. Classification of papillomaviruses. **Virology**, 2004.

DE VILLIERS, E. M.; WAGNER, D.; SCHNEIDER, Um; WESCH, H.; MIKLAW, H.; WAHRENDORF, J.; PAPENDICK, U.; HAUSEN, Hzur. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. **The Lancet**, 1987.

DEMATHE Adriana, BERNABÉ, Daniel Galera; GARCIA, José Fernando; NUNES, Caris Maroni; MIYAHARA, Glauco Issamu. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. **J Bras Patol Med Lab**, 2010.

DESHMUKH, Ashish A.; CANTOR, Scott B.; FENWICK, Elizabeth; CHIAO, Elizabeth Y.; NYITRAY, Alan G.; STIER, Elizabeth A.; GOLDSTONE, Stephen E.; WILKIN, Timothy; CHHATWAL, Jagpreet. Adjuvant HPV vaccination for anal cancer prevention in HIV- positive men who have sex with men: The time is now. **Vaccine**, 2017.

DOOBAR, J.; STERLING, J.C.; The biology of human papilomavírus. **In Sterling JC & Tying SK (edit), Human papillomaviruses – clinical and scientific advances Londres, Arnold**, 2001.

DU, Guang-Hui; WANG, Jun-Kang; RICHARDS, Jackson R.; WANG, Jia-Jia. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 are associated with an increased risk of cervical cancer. **International immunopharmacology**, 2019.

DUVLIS, Sotirija; DABESKI, Drage; NOVESKI, Predrag; IVKOVSKI Ljube; PLASESKA-KARANFILSKA, Dijana. Association of IL-10 (rs1800872) and IL-4R (rs1805010) polymorphisms with cervical intraepithelial lesions and cervical carcinomas. **J BUON**. 2020.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, 1997.

FEDRIZZI, Edison N.; SCHLUP, Cristiane G.; MENEZES, Maria Elizabeth; OCAMPOS, Maristela. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, 2008.

FENG, Qinghua; WEI, Huafeng; MORIHARA, Janice; STERN, Joshua; YU, Mujun; KIVIAT, Nancy; HELLSTROM, Ingegerd; HELLSTROM, Karl Erik. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma. **Gynecologic Oncology**, 2012.

FERRIS, Daron G.; SAMAKOSES, Rudiwilai; STANLEY, Bloco L.; LAZCANO-PONCE, Eduardo; RESTREPO, Jaime Alberto; MEHLSSEN, Jesper; CHATTERIEE, Archana; IVERSEN, Ole-Erik; JOSHI, Amita; CHU, Jian-Li; KRICK, Andrea Likos; SAAH, Alfredo; DAS, Rituparna. 4-Valent Human Papillomavirus (4vHPV) Vaccine in Preadolescents and Adolescents After 10 Years. **Pediatrics**, 2017.

GILLISON, Maura L.; CHATURVEDI, Anil K.; LOWY, LOWY, Douglas R. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. **Cancer**, 2008.

GRAHAM, Sheila V. Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiology**, 2010.

GRAHAM, Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, 2017.

GRIFFITHS, Anthony, J. F.; WESSLER, Susan R.; LEWONTIN, Richard C.; CARROLL, Sean B. Introdução a Genética. ed. 9ª. Guanabara. 2006.

GUO, Chong; WEN, Li; SONG, Ju-Kun; ZENG, Weng-Jing; DAN, Chao; NIU, Yu-Ming; SHEN, Ming. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. **Oncotarget**. 2018.

GUTIÉRREZ-HOYA, Adriana; SOTO-CRUZ, Isabel. Papel da via JAK/STAT no câncer cervical: sua relação com as oncoproteínas HPV E6/E7. **Células**, 2020.

HARIHARAN, Indhu; PILLAI, Radhakrishna M. Genotypes of the human papillomavirus: relevance to Indian field trials of the vaccine. **Indian J Med Res**, 2009.

HSUEH, Po-Ren. Human papillomavirus, genital warts and vaccines. **J Microbiol Immunol Infect**. 2009.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 28 jul. 2018.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Detecção precoce do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//deteccao-precoce-docancer.pdf?_ga=2.33341110.963322304.1632144992-1846012608.1625166303. Acesso em: 20 set. 2021.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022a. Disponível em: [https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia#:~:text=No%20Brasil%2C%20exclu%C3%ADdos%20os%20de,mulheres%20\(INCA%2C%202022\)](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia#:~:text=No%20Brasil%2C%20exclu%C3%ADdos%20os%20de,mulheres%20(INCA%2C%202022)). Acesso em: 28 nov. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/mortalidade#:~:text=Na%20mortalidade%20proporcional%20por%20c%C3%A2ncer,%2C%25%20dos%20%C3%B3bitos%20respectivamente>. Acesso em: 04 mar. 2023.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: Câncer do Colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos>. Acesso em: 09 jan. 2023.

JOURA, Elmar A.; GIULIANO, Ana R.; IVERSEN, Ole-Erik; BOUCHARD, Céline; MAO, Constança; MEHLSEN, Jesper; NGAN, Edson D. Moreira Jr Yuen; PETERSEN, Solitária Kield; LAZCANO-PONCE, Eduardo; PITISUTTITHUM, Punnee; RESTREPO, Jaime Alberto; STUART, Gavin; WOELBER, Linn; YANG, Yuh Cheng; CUZICK, Jack; GARLAND, Suzanne M.; HUH, Warner; KIAER, Susanne K.; BAUTISTA, Oliver M.; CHAN, Ivan S. F.; CHEN, Josué; GESSER, Ricardo; MOELLER, Erin; RITTER, Michael; VUOCOLO, Scott; LUXEMBURGO, Alain. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. **New England Journal of Medicine**, 2015.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. TLR signaling. **Semin Immunol**. 2007.

KHORRAMI, S.; ZAMANI, H.; HASANZADEH, M.; MEHRAMIZ, M.; SOLEIMANI, A.; ZARE MARZOUNI, H.; FERNS, G. A.; ESMAEILI, H.; AVAN, A. Association of a genetic variant in Interleukin-10 gene with increased risk and inflammation associated with cervical cancer. **Gene**. 2022.

KIM, J. M. BRANNAN, C. L.; 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**, 1992.

LAWRENCE, Michael S.; SOUGNEZ, Carrie; LICHTENSTEIN, Lee; CIBULSKIS, Kristian; LANDER, Eric; GABRIEL, Stacey B. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, 2015.

LEHNER, Thomas. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. **Vaccine**, 2003.

LETO, Maria das Graças Pereira; JÚNIOR, Gildo Francisco dos Santos; PORRO, Adriana Maria; TOMIMORI, Jane. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2011.

LEVI, Mônica. Sociedade Brasileira de Imunizações. Atualização das vacinas HPV em uso no Brasil: introdução da nonavalente (HPV9). 2023.

LIN, Ken; ROOSINOVICH, Elena; MA, Bárbara; HUNG, Chien-Fu; WU, T.-C. Vacinas terapêuticas de DNA contra HPV. **Pesquisa imunológica**, 2010.

LORENZI, Julio Cesar Cetrulo; COELHO-CASTELO, Arlete Aparecida Martins. Resposta imune contra infecções virais. **Scire Salutis**, 2011.

MACHADO, Paulo R.L.; ARAÚJO, Maria Ilma A. S.; CARVALHO, Lucas; CARVALHO, Edgar M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2004.

MAGNADÓTTIR, Bergljót. Innate immunity of fish (overview). **Fish & shellfish immunology**, 2006.

MARANGON, Amanda Vansan; GUELSIN, Gláucia Andreia Soares; VISENTAINER, Jeane Eliete Laguilá; BORELLI, Sueli Donizete; WATANABE, Maria Angélica Ehara; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes; CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany Rizzieri; RUDNICK, Cristiane Conceição Chargas; VENDE, Ana Maria. The Association of the Immune Response Genes to Human Papillomavirus-Related Cervical Disease in a Brazilian Population. **BioMed Research International**, 2013.

MHATRE, Mohak; ANDREW, Thomas M.; CARPENTER, Colleen; BURK, Robert D.; EINSTEIN; HEROLD, Betsy C. Cervical Intraepithelial Neoplasia Is Associated With Genital Tract Mucosal Inflammation. **Sexually Transmitted Diseases**, 2012.

MIN, Zhihong; PU, Xiaowen; GU, Zhengrong. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection. **Oncol Lett**. 2018.

NO, Jae Hong; KIM, Mi-Kyung; JEON, Yong-Tark; KIM, Yong-Beom; SONG, Youg-Sang. Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention. **Molecular Carcinogenesis**, 2011.

OLIVEIRA, Caio Marcio Barros de; SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado; GEROLA, Luis Roberto; SALOMÃO, Reynaldo. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 2011.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Folha informativa - HPV e câncer do colo do útero. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/hpv-e-cancer-do-colo-do-utero>. Acesso em: 05 de set. 2022.

OSIS, Maria José Duarte; DUARTE, Graciana Alves; DE SOUSA, Maria Helena. SUS users' knowledge of and attitude to HPV virus and vaccines available in Brazil. **Revista de Saude Publica**, 2014.

PARADKAR, Prajakta Hemant; JOSHI, Javashree Vinay; MERTIA, Privanka Nirmalsingh; AGASHE, Shubhada Vidyadhar; VAIDYA, Rama Ashok. Rolw of Cytokines in Genesis, Progressio, and Prognosis of Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2014.

PEREIRA, Ana Paula Lombardi; TRUGILO, Kleber Paiva; OKUYAMA, Nádia Calvo Martins, SENA, Michelle Mota; COUTO-FILHO, José D'Oliveira, Watanabe Maria Angelica Ehara, de Oliveira Karen Braiã. IL-10 c.-592C>A (rs1800872) polymorphism is associated with cervical cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2020.

PHUTHONG, Sophia; SETTHEETHAM-ISHIDA, Wannapa; NATPHOPSUK, Sitakan; ISHIDA, Takafumi. Genética Polimorfismo da glutationa S-transferase Pi 1 (GSTP1) e suscetibilidade à doença cervical Câncer em mulheres do nordeste da Tailândia infectadas pelo vírus do papiloma humano. **Ásia Pac J Câncer Anterior**, 2018.

PLOTKIN, Stanley A. Vaccines: the fourth century. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, 2009.

PRATA, Thiago Theodoro Martins; BONIN, Camila Mareti; FERREIRA, Alda Maria Teixeira; PADOVANI, Cacilda Tezelli Junqueira; FERNANDES, Carlos Eurico dos Santos; MACHADO, Ana Paula; TOZETTI, Inês Aparecida. Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. **Immunology**, 2015.

PRATAP, Pushpendra D.; RAZA, Syed Tasleem; ZAIDI, Ghazala; KUNWAR, Shipra; AHMAD, Sharique; CHARLES, Marco Reitor; EBA, Ale; RAJPUT, Muneshwar. Genetic Variants in Interleukin-10 Gene Association with Susceptibility and Cervical Cancer Development: A Case Control Study. **Glob Med Genet**. 2022.

RAUTAVA, Jaana; SYRJANEM, Stina. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **J Am Dent Assoc**, 2011.

ROSA, Maria Inês da; MEDEIROS, Lídia Rosi; ROSA, Daniela Dornelles; BOZZETI, Mary Clarisse; SILVA, Fábio Rosa; SILVA, Bruno Rosa. et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. Cad. **Saúde Pública**. 2009.

SANTANA, Ercília A.; BISELLI, Patrícia M.; BISELLI, Joice, M.; ALMEIDA, Margarete T.G.; BERTELLI, Érika C. P. Câncer cervical: etiologia, diagnóstico e prevenção. **Arquivos de ciências da saúde**, 2008.

SANTOS, Iris Mattos; MAIORAL, Mariana Franzoni; HAAS, Patrícia. Infecção por HPV em homens: Importância na transmissão, tratamento e prevenção do vírus. **Estudos de Biologia**, 2011.

SASAGAWA, Toshiyuki; TAKAGI, Hiroaki; MAKINODA, Satoru. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2012.

SCHIFFMAN, Mark; CASTLE, Philip E.; JERONIMO, José; RODRIGUEZ, Ana C.; WACHOLDER, Sholom. Wacholder. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, 2007.

SIERRA, Saleta; KUPFER, Bernd; KAISER, Rolf. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **Journal of clinical virology**, 2005.

SINGHAL, Pallavi; KUMAR, Anoop; BHARADWAI, Soham; HUSSAIN, Showket; BHARADWAI, Mausumi. Association of IL-10 GTC haplotype with serum level and HPV infection in the development of cervical carcinoma. **Tumor Biology**, 2015.

SILVA, Maria José Penna Maisonnette de Attayde; GONÇALVES, Ana Katherine da Silveira; GIRALDO, Paulo César; PONTES, Ana Claudine; DANTAS, Gilzandra Lira; SILVA, Ricardo José de Oliveira; SILVA, Luis Guilherme Pessoa da. A eficácia da vacina profilática contra o HPV nas lesões HPV induzidas. **Femina**, 2009.

SOUTO, Rafael; FALHARI, Júlio Pedro Borgo; DA CRUZ, Aparecido Divino. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2005.

STANCZUK, Grazyna A.; SIBANDA, Elopy N.; PERREY, Chris; CHIRARA, Mike; PRAVICA, Vera; HUTCHINSON, Ian V.; TSUANA, Sam A. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **International Journal of Cancer**, 2001.

STANLEY, M. A., PETT, M. R., COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochem Soc Trans**. 2007.

STANLEY, Margaret. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, 2008.

TESSE, Ricardo; VECCHIO, Giovanni Carlo Del; MATTIA, Domenico De; SANGERARDI, Maria; VALENTE, Frederica; GIORDANO, Paola. Association of interleukin-(IL)10 haplotypes and serum IL-10 levels in the progression of childhood immune thrombocytopenic purpura. **Gene**, 2012.

TORRES-POVEDA, Kirys; BAHENA-ROMÁN, Margarida; MADRID-GONZÁLEZ, Claudia; BURGUETE-GARCÍA, Ana I.; BERMÚDEZ-MORALES, Victor Hugo; PERALTA-ZARAGOZA, Oscar; MADRID-MARINA, Vicente. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. **World J Clin Oncol**. 2014.

TORRES-POVEDA, Kirys; BAHENA-ROMÁN, Margarida; MADRID-GONZÁLEZ, Claudia; BURGUETE-GARCÍA, Ana I.; BERMÚDEZ-MORALES, Victor Hugo; PERALTA-ZARAGOZA, Oscar; MADRID-MARINA, Vicente. Risk allelic load in Th2 and Th3 cytokines genes as biomarker of susceptibility to HPV-16 positive cervical cancer: a case control study. **BMC cancer**, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); ICO Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Disponível em: www.who.int/hpvcentre. Acesso em: 20 jul. 2010.

WHO FACT SHEET. **WHO | Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acesso em: 15 out. 2022.

ZARDO, Geisa Picksius; FARAH, Flávia Peixoto; MENDES, Fernanda Gabriela; FRANCO, Camila Ament Giuliani dos Santos; MOLINA, Giseli Vieira Machado; MELO, Giseli Vieira Machado; KUSMA, Solena Ziemer. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2014.

ZIDI, Sabrina; GAZOUANI, Ezzedine; STAYOUSSEF, Mouna; MEZLINI, Amel; AHMED, Salma K.; YACOUBI-LOUESLATI, Besma; ALMAWI, Wassim Y. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms as genetic biomarkers of cervical cancer susceptibility among Tunisians. **Cytokine**. 2015.

ZUR HAUSEN Harald; VILLIERS Ethel-Michele de. Human Papillomavirus. Annu. **Rev Microbiol**. 1994.

ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação da pesquisa pelo Comitê de ética e pesquisa da UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo genético dos pacientes com dengue no estado de Alagoas e a sua relação com a infecção e progressão da doença

Pesquisador: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 18558913.1.0000.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 405.940

Data da Relatoria: 04/10/2013

Apresentação do Projeto:

Infecções pelo vírus da dengue ocorrem em mais de 100 países. A infecção pode causar dengue clássica (DF), que se caracteriza por um estado febril, ou pode progredir para uma dengue hemorrágica (DHF) caracterizada por manifestações como a síndrome hemorrágica de choque na dengue (DSS). Esse é um estudo de casos e controles que busca demonstrar, a exemplo de outros já realizados, a relação entre os polimorfismos genéticos no sistema imune inato humano e respostas diferenciais à infecção ocasionada pelo Vírus da dengue, de forma que estejam associados com uma maior susceptibilidade a esta infecção, promovendo uma progressão mais grave para a doença. Os pacientes e casos controle do estudo serão do agreste alagoano. A genotipagem será realizada utilizando combinação entre reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise dos fragmentos gerado por enzimas de restrição (PCR-RFLP). O foco do estudo será os genes do Fator de necrose tumoral, IL-10 e complemento (C3 e C4). Todos os resultados serão analisados e publicados com o intuito de gerar e ampliar competência científica em grupo de pesquisa em polimorfismos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Campus A . C Simões Cidade Universitária

Bairro: Tabuleiro dos Martins

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

Fax: (82)3214-1700

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

Continuação do Parecer: 739.340

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Identificar a presença do HPV por PCR em amostras cervicais;
- Avaliar os principais marcadores genéticos (polimorfismos) de risco envolvidos nas infecções por HPV;
- Investigar os fatores de risco socioambientais para o câncer cervical em mulheres infectadas;
- Avaliar a associação de polimorfismos dos genes envolvidos na resposta imune inata humana e a susceptibilidade à infecção pelo vírus HPV;
- Identificar a correlação dos polimorfismos com os fatores ambientais para a predisposição de infecção por HPV com a construção do banco de dados;
- Mensurar a atividade e expressão de enzimas humanas e proteínas presentes nas amostras das pacientes atendidas no SUS;
- Realizar diagnósticos de biologia molecular e celular na plataforma diagnóstica;
- Identificar os tipos de vírus circulantes na população de mulheres do agreste alagoano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se classifica como risco mínimo e será utilizado o sangue do indivíduo saudável ou com o vírus do HPV com o consentimento do mesmo. A coleta sanguínea é um procedimento simples e que não traz nenhum risco para a população de estudo, e será realizada utilizando as boas práticas laboratoriais. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da veia. Complicações de coleta de sangue

rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. O acesso ao prontuário do paciente poderá conter informações pessoais e sigilosas, e a exposição dessas poderá ser constrangedora para os participantes da pesquisa. Porém, os pesquisadores envolvidos afirmam que os resultados da pesquisa não terão os pacientes identificados. O sigilo e a privacidade do pesquisado será mantida e após o término da pesquisa, os resultados

serão divulgados em encontros científicos e em publicação em revistas especializadas.

Benefícios:

Todos os resultados serão analisados com o intuito de gerar e ampliar o conhecimento sobre o polimorfismo na doença e informações referentes ao acompanhamento, caso esteja ocorrendo com algum dos sujeitos. Obter na população de estudo a frequência gênica na população normal e com HPV, bem como o efeito do polimorfismo no organismo com a doença.

O Relator não entende que a minimização dos riscos encontrem-se adequados a resolução

Endereço: Campus A . C Simões Cidade Universitária
Bairro: Tabuleiro dos Martins **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041 **Fax:** (82)3214-1700 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 739.340

466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados de acordo com a Resolução 466/12

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As solicitações apontadas para adequação do protocolo de pesquisa foram realizadas, portanto o mesmo encontra-se de acordo com a 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MACEIO, 05 de Agosto de 2014

Assinado por:
Deise Juliana Francisco
(Coordenador)

Endereço: Campus A . C Simões Cidade Universitária
Bairro: Tabuleiro dos Martins **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041 **Fax:** (82)3214-1700 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.”
(Resolução nº 466/12 – V, do Conselho Nacional de Saúde).

Você está sendo convidado para participar, como voluntária, na pesquisa **“ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS COM HPV EM AMOSTRAS CERVICAIS NAS PACIENTES ATENDIDAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE DO AGRESTE ALAGOANO”**. Após ser esclarecida sobre os objetivos do projeto, e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Alagoas pelo telefone (82) 3214-1041.

Os objetivos principais deste estudo constituem o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce, rápido, eficiente e de baixo custo para doenças causadas pelo papilomavírus, como por exemplo, o câncer do colo do útero, bem como, a formulação de novos medicamentos que possam ser usados na prevenção da infecção ou no tratamento da doença causada por este micróbio.

Participar desta pesquisa é uma opção e no caso de não aceitar participar ou desistir em qualquer fase da pesquisa fica assegurado que não haverá perda de qualquer benefício no tratamento que estiver fazendo. Caso aceite participar deste projeto de pesquisa gostaríamos que soubesse que:

- A) Sua contribuição consiste na doação de sangue e/ou SWAB bucal (utilizando a escovinha com uma leve pressão na mucosa da boca), células epiteliais e/ou biópsia para diagnósticos laboratoriais a partir de amostras da região perineal, vulva, vagina e/ou colo do útero. A coleta de sangue não faz parte do procedimento padrão de exames ginecológicos implementados pelo Ministério da Saúde, sendo este um desconforto adicional. O estudo consistirá ainda em entrevista semi-estruturada e acesso ao seu prontuário, arquivado na unidade de saúde em que ele esteja arquivado, município de Arapiraca - AL.

- B) Neste projeto, sua identidade será totalmente preservada. Fica claro que você como participante não terá ganho ou perda financeira relacionada com a participação no projeto, e a qualquer momento pode desistir de colaborar da pesquisa.
- C) Com a participação no projeto às informações geradas pelo diagnóstico serão informadas através da equipe do posto de saúde em que você foi atendida, e no caso de necessidade de tratamento será dado o encaminhamento devido.
- D) Assim como num exame ginecológico periódico, existe apenas um desconforto no momento da observação do colo do útero, de onde será feita uma coleta. Os riscos relacionados à coleta de sangue, que não faz parte do exame ginecológico periódico, são: leve desconforto no momento da coleta, e possibilidade de surgimento de um pequeno trauma no local da coleta que desaparecerá após 24 ou 48 horas. Os riscos à minha saúde física e mental são mínimos. Eu terei como benefício ser informado (a) do resultado da minha contribuição e da pesquisa em geral.
- E) As informações obtidas desta pesquisa serão publicadas em congressos, jornais e revistas científicas, bem como, veiculadas em meios de acesso do público em geral, sempre respeitando o sigilo dos participantes da pesquisa. Os produtos e serviços obtidos a partir desta pesquisa serão disponibilizados a toda a população, principalmente aos colaboradores do referido projeto.
- F) O estudo se destina as mulheres atendidas nas unidades de saúde pública do município de Arapiraca - AL. Esse estudo começará em Maio 2014 e terminará em Maio de 2016.

Tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo; recebi da pesquisadora Prof^a. Dr^a. Karol Fireman de Farias do curso de graduação em enfermagem – UFAL - Campus Arapiraca, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. Que as informações conseguidas através da minha participação no estudo não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto pelos responsáveis, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Que não haverá ressarcimento de despesas, caso eu apresente algum custo na realização desta pesquisa e de que eu não serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.

G) Caso aceite participar, uma cópia deste termo onde consta o nome, telefone e endereço do principal pesquisador, será disponibilizada para o esclarecimento de dúvidas sobre o desenvolvimento projeto a qualquer momento.

Declaro ter recebido as devidas explicações sobre a referida pesquisa, que a participação é voluntária e que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento sem que ocorram quaisquer prejuízos físicos, mentais ou no acompanhamento deste serviço.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Eu, _____
(nome da paciente), portadora do RG _____,
residente _____
fone: _____, aceito participar desta pesquisa.

1 Nome da mãe: _____

Endereço do(a) participante-voluntário(a):

Domicílio (rua, praça, conjunto): _____ Bloco, nº _____
Complemento: _____ Bairro: _____
CEP/cidade: _____ Telefone: _____
Ponto de Referência: _____

2 Endereço da responsável pela pesquisa:

Sr.(a): Karol Fireman de Farias Endereço: Rua São Cristovão, nº 302.

Bairro: Primavera, Cidade: Arapiraca-AL

CEP: 57304-400 FONE: (82) 9620-6444 / 8174-8192

E-mail: karolfireman@hotmail.com

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:

Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária. Maceió-AL. Telefone: 82 3214-1041

Arapiraca, _____ de _____ de 2014.

Assinatura da paciente

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha 1

Assinatura da testemunha 2

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos, através dos telefones (82) 9620-6444 / 81748192, falar com **Karol Fireman de Farias**, pesquisadora responsável pela pesquisa.

ANEXO C – Protocolo do kit comercial para extração de DNA



3.D. Isolating Genomic DNA from Tissue Culture Cells and Animal Tissue

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- 15ml centrifuge tubes (for animal tissue)
- small homogenizer (Fisher Tissue Tearor, Cat.# 15-338-55, or equivalent) (for animal tissue)
- trypsin (for adherent tissue culture cells only)
- PBS (for tissue culture cells)
- liquid nitrogen (optional; for tissue culture cells, Step 1.d; for animal tissue grinding, Step 2.b, in place of small homogenizer; and for mouse tail, Step 3.b)
- mortar and pestle (optional; for animal tissue grinding, Step 2.b, in place of small homogenizer; and for mouse tail, Step 3.b)
- 95°C water bath (optional; for tissue culture cells, Step 1.d)
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 0.5M EDTA (pH 8.0) (for mouse tail)
- Proteinase K (20mg/ml in water; Cat.# V3021) (for mouse tail)
- 55°C water bath (for mouse tail)

1. Tissue Culture Cells

- a. Harvest the cells, and transfer them to a 1.5ml microcentrifuge tube. For adherent cells, trypsinize the cells before harvesting.
- b. Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g$ for 10 seconds to pellet the cells.
- c. Remove the supernatant, leaving behind the cell pellet plus 10–50µl of residual liquid.
- d. Add 200µl PBS to wash the cells. Centrifuge as in Step 1.b, and remove the PBS. Vortex vigorously to resuspend cells.

Note: For cells that do not lyse well in Nuclei Lysis Solution alone (e.g., PC12 cells), perform an additional freeze-thaw step as follows before proceeding to Step 1.e: Wash the cells as in Step 1.d; then freeze in liquid nitrogen. Thaw the cells by heating at 95°C. Repeat this procedure for a total of 4 cycles.

- e. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution, and pipet to lyse the cells. Pipet until no visible cell clumps remain.
- f. Proceed to Section 3.D, Step 4.

2. Animal Tissue (Mouse Liver and Brain)

- a. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution to a 15ml centrifuge tube, and chill on ice.
- b. Add 10–20mg of fresh or thawed tissue to the chilled Nuclei Lysis Solution and homogenize for 10 seconds using a small homogenizer. Transfer the lysate to a 1.5ml microcentrifuge tube. Alternatively, grind tissue in liquid nitrogen using a mortar and pestle that has been prechilled in liquid nitrogen. After grinding, allow the liquid nitrogen to evaporate and transfer approximately 10–20mg of the ground tissue to 600µl of Nuclei Lysis Solution in a 1.5ml microcentrifuge tube.

ANEXO D – Protocolo de extração de DNA genômico por NaCl (salting out)

1. Aos tubos contendo swab adicionar **600µl** (para tubos de 2ml) ou **400µl** (para tubos de 1,5ml) de TES (Tris HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e **7 µl** (para 600 µl) ou **10 µl** (para 400 µl) de proteinase K (10mg/ml);
2. Incubar por 2h a 42°C;
3. Após a incubação retirar o swab (este passo exige o máximo de cuidado para a retirada da escova que deve ser realizada com uma pinça pequena e exclusiva para o procedimento);
4. Adicionar **84µl** (para 600 µl) ou **116 µl** (para 400 µl) de NaCl e agitar manualmente com vigor;
5. Centrifugar por 1 minuto a 15.000×g;
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 2 vezes **(800 µl)** o volume de etanol absoluto;
7. Agitar e centrifugar os tubos por 1 minuto a 15.000×g;
8. Descartar o etanol absoluto e adicionar **1ml** (1000 µl) de etanol a 70%;
9. Inverter os tubos diversas vezes para lavar o pellet;
10. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 15.000×g e desprezar o sobrenadante;
11. Deixar os tubos abertos por 30min invertidos em papel limpo, para evaporação do etanol residual;
12. Dissolver o DNA em **60µl** de TE 10:0,1 (Tris HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM)
OBS: Passar no vortex;
13. A concentração de DNA obtida é em torno de **80ng/µl**.