ASSOCIAÇÃO ENTRE TNF α -308 E SUSCEPTIBILIDADE À CARCINOGENESE CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16

B. S. CHAGAS¹, D. L. SANTOS¹, S. S. L. PAIVA Jr², A. C. M. RIOS¹, R. C. O. SILVA¹,
E. TIBÚRCIO Jr¹, R. C. P. LIMA¹, M. N. CORDEIRO¹, T. S. P. C. NEVES¹, A. H. P.
SILVA Jr¹, A. P. A. D. GURGEL³, M. R. BARROS Jr¹, M. V. A. BATISTA⁴, A. C.
FREITAS¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada

³Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Engenharia e Meio ambiente

⁴Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Biologia

E-mail para contato: babisimas@gmail.com; daffanysantos@outlook.com; acf_ufpe@yahoo.com.br

RESUMO – *O Papilomavírus humano (HPV) é responsável por lesões cervicais de alto grau e câncer cervical. A inflamação desempenha um papel fundamental na progressão do câncer cervical. O presente trabalho teve como objetivo investigar a possível associação entre o polimorfismo do promotor de TNF α e a infecção por HPV no risco de carcinogênese cervical. Um total de 654 amostras foi avaliada neste estudo. A detecção e genotipagem do HPV foram realizadas por PCR. A genotipagem de TNF α -308 (rs1800629) foi realizada com sonda fluorogênica alelo-específica. Nossos dados mostram uma associação significativa nas frequências de alelos e genótipos entre os grupos de casos e controles para o polimorfismo de TNF α avaliado e infecção por HPV-16. Nosso estudo indica que a associação de polimorfismo genético em genes relacionados à inflamação representa um risco para a suscetibilidade no desenvolvimento de câncer de colo do útero em mulheres infectadas por HPV-16.*

Palavras chave: Polimorfismo, citocina, câncer cervical.

ABSTRACT – *Human Papillomavirus (HPV) is responsible for high-grade cervical lesions and cervical cancer. Inflammation plays a key role in the progression of cervical cancer. The present study aimed to investigate the possible association between TNF α promoter polymorphism and HPV infection in the risk of cervical carcinogenesis. A total of 654 samples were evaluated in this study. HPV detection and genotyping were performed by PCR. Genotyping of TNF α -308 (rs1800629) was performed with allele-specific fluorogenic probe. Our data show a significant association in allele and genotype frequencies between the case and control groups for the evaluated TNF α polymorphism and infection by HPV-16. Our study indicates that the association of genetic polymorphism in genes related to inflammation represents a risk for susceptibility in the development of cervical cancer in women HPV-16 infected.*

Keywords: Polymorphism, cytokine, cervical cancer.

1. INTRODUÇÃO

A infecção por Papilomavírus humano (HPV) é considerada a doença transmitida sexualmente mais comum. Estudos indicam que a infecção persistente por HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (Bosch et al., 2002). No entanto, o HPV de alto risco é um fator de risco necessário, mas não suficiente para iniciar a transformação maligna de células cervicais e desenvolvimento de câncer cervical (Freitas et al., 2012). Fatores genéticos do hospedeiro também são importantes para a predisposição à doença (Freitas et al., 2012). As citocinas são moléculas importantes na defesa do organismo contra infecções virais, atuando através da determinação de um padrão de resposta imune e inibição da replicação viral (Fernandes et al., 2005). O desenvolvimento do câncer tem sido associado a várias citocinas que são responsáveis pela modulação do controle imunológico, e os genes envolvidos na resposta imune à infecção viral já foram associados à susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer cervical (Dranoff et al., 2004).

TNF α é uma citocina pró-inflamatória importante na resposta imune, sendo secretada por macrófagos ativados (Duarte et al., 2005). A expressão de *TNF α* é regulada a nível transcricional e polimorfismos dentro da região promotora tem sido associada ao nível de produção de TNF- α (Kirkpatrick et al., 2004). O presente trabalho teve como objetivo investigar a possível associação entre o polimorfismo do promotor de TNF α e a infecção por HPV no risco de carcinogênese cervical.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, 654 amostras foram coletadas, no Hospital das Clínicas (Universidade Federal de Pernambuco) e no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Universidade de Pernambuco), aleatoriamente por raspagem cervical com *cytobrush*. O DNA foi extraído a partir das células cervicais utilizando Dneasy Blood Tissue Kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Aprovação do Comitê de Ética - CEP/CCS/UFPE N °491/11 e HUOC/PROCAPE 64/2010. O DNA de HPV foi detectado por PCR utilizando primers degenerados MY09/11. A tipificação de HPV foi realizada por PCR utilizando iniciadores específicos para o HPV-16. A genotipagem do polimorfismo -308 G/A (rs1800629) no promotor do gene *TNF α* foi realizada com sondas fluorogênicas específicas. A análise estatística foi realizada utilizando o software R (R Core Team, 2014). A conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada usando o teste do qui-quadrado com a correção de continuidade de Yates. O teste exato de Fisher foi utilizado para a comparação em pares de alelos e tabelas de contingência de genótipos. Para todos os testes, o nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 654 amostras foram examinadas quanto à presença de HPV: 397 (60,7%) foram positivas para HPV e 257 (39,3%) eram HPV-negativas. A Tabela 1 mostra os resultados da genotipagem de polimorfismos na região promotora do gene *TNF α* . Todos os polimorfismos (casos e controle) estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 1 – Genotipagem de polimorfismo do gene *TNF α* em pacientes HPV-16 infectadas.

	HPV-16		
	Caso ^a	Controle ^b	<i>p</i> -value; OR (95% CI)
TNFα rs1800629			
Alelos			
G	85 (82%)	670 (89%)	Referência
A	19 (18%)	80 (11%)	0.02; 1.87 (1.08 - 3.24)
Genótipos			
GG	34 (65.4%)	300 (80%)	Referência
GA/AA	18 (34.6%)	75 (30%)	0.02; 2.12 (1.13 - 3.96)

$p < 0.05$ – Estatisticamente significativa. Modelo dominant.

^aCaso: Pacientes HPV-16 infectada (com e sem coinfeção com outros HPVs).

^bControle: Todas as pacientes não infectadas com HPV-16.

A distribuição das frequências alélicas do TNF-308 (rs1800629) e da infecção por HPV-16 mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle para o polimorfismo TNFα avaliado (alelo G vs. A: OR = 1.87, IC: 1.08-3.24 e $p = 0.02$) (Tabela 1). Em relação à distribuição de frequências genotípicas, foi observado mais do que duas vezes o aumento do risco de câncer cervical em pacientes infectadas com HPV-16 (infecção única ou coinfeção) (GG vs. GA / Genótipo AA: OR = 2.12, IC: 1.13-3.96 e $p = 0.02$) (Tabela 1).

Estudos indicam que vários polimorfismos genéticos em genes de citocinas têm sido relacionados ao aumento do risco de carcinogênese cervical (Hardikar et al., 2015; Torres-Poveda et al., 2012). O TNFα é uma citocina pró-inflamatória relacionada à proliferação e diferenciação celular (Wajant et al., 2003). Nossos dados mostraram que a variação G-308A na região promotora de TNFα foi encontrada associada ao risco de câncer cervical, em que as mulheres com genótipos GA/AA foram estimadas como apresentando um risco significativamente maior de desenvolvimento de câncer cervical do que as mulheres com o genótipo GG quando infectado por HPV-16. Portanto, esse resultado pode sugerir a contribuição deste polimorfismo para o desenvolvimento do câncer cervical. De acordo com Mehta et al. (2017), em várias populações, este polimorfismo tem sido associado ao desenvolvimento de neoplasia cervical em mulheres infectadas com HPV-16.

4. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram uma diferença estatisticamente significativa nas frequências de alelos e genótipos entre os grupos caso e controle para o polimorfismo de TNFα avaliado e infecção por HPV-16. Nosso estudo indica que a associação de polimorfismo genético em genes relacionados à inflamação representa um risco para a suscetibilidade no desenvolvimento de câncer de colo do útero em mulheres infectadas por HPV-16.

5. REFERÊNCIAS

- BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, p. 244-265, 2002.
- DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer.** v. 4, p. 11-22, 2004.
- DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biophys Res Commun.** v. 334, p. 588-592, 2005.
- FERNANDES, A.P.; GONÇALVES, M.A.; DUARTE, G.; CUNHA, F.Q. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. **Virology**, v. 334, p. 294-298, 2005.
- FREITAS, A.C.; GURGEL, A.P.A.D.; CHAGAS, B.S. Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecol. Oncol.**, v. 126, p. 304-311, 2012.
- GONZÁLEZ, J.R.; ARMENGOL, L.; GUINÓ, E. SNPAssoc: SNPs-based whole genome association studies. R package version 1.9-2. <http://CRAN.R-project.org/package=SNPAssoc>. 2007.
- HARDIKAR, S.; JOHNSON, L.G.; MALKKI, M.; PETERSDORF, E.W.; GALLOWAY, D.A.; SCHWARTZ, S.M. A population-based case-control study of genetic variation in cytokine genes associated with risk of cervical and vulvar cancers. **Gynecol. Oncol.**, v. 139, p. 90-96, 2015.
- KIRKPATRICK, A.; BIDWELL, J.; VAN DEN BRULE, A.J.; MEIJER, C.J. TNF alpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. **Gynecol. Oncol.**, v. 92, p. 675-679, 2004.
- MEHTA, A.M.; MOOIJ, M.; BRANKOVIC, I.; OUBURG, S. Cervical carcinogenesis and immune response gene polymorphisms: A review. **Immunol. Res.**, v. 201, p. 1-12, 2017.
- TORRES-POVEDA, K.; BURGUETE-GARCÍA, A.I.; CRUZ, M.; MARTÍNEZ-NAVA, G.A. The SNP at-592 of human IL-10 gene is associated with serumIL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. **Infect. Agent. Cancer.**, v. 7, p. 32, 2012.
- WAJANT, H.; PIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death and Differentiation**, v.10, p. 45-65, 2003.

6. AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).