



Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-6 (rs1800795) e
TGF- β (rs1982073 e rs1800471) e suas relações com o grau de lesão
cervical em pacientes infectados pelo Papillomavirus humano**

SÉRGIO FERREIRA DE LIMA JÚNIOR

Recife, 2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-6 (rs1800795) e
TGF- β (rs1982073 e rs1800471) e suas relações com o grau de lesão
cervical em pacientes infectados pelo Papillomavirus humano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Recife, 2012

Lima Júnior, Sérgio Ferreira de

Avaliação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL 6 (RS 1800795) e TGF- β (RS 1982073) e RS 1800471) e suas relações com o grau de lesão cervical em pacientes infectados pelo *Papillomavírus* humano/ Sérgio Ferreira de Lima Júnior. – Recife: O Autor, 2012.

66 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. HPV (Vírus) 2. Polimorfismo (genética) 3. Sequenciamento de nucleotídeo I. Título.**

571.9648

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-059

Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Avaliação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-6 (rs1800795) e
TGF- β (rs1982073 e rs1800471) e suas relações com o grau de lesão
cervical em pacientes infectados pelo Papillomavirus humano

Banca Examinadora:

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Departamento de Biologia

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Departamento de Patologia

Universidade Federal de Pernambuco

**Dedico este trabalho a todas as famílias
que lutam contra o fantasma do câncer e
àquelas que perderam essa luta.**

Agradecimentos

Ao criador, por sua complexa criação cheia de mistérios aos quais temos o prazer de decifrar.

A minha mãe, Neuza, por ter me dado tudo aquilo que precisava pra crescer e seguir um rumo: amor, carinho, compreensão e disciplina.

Ao meu grande amor, Elisângela França, por ter me mostrado que a vida vale muito mais a pena quando temos alguém ao lado para ajudar a trilhar nosso rumo.

Aos Professores Sergio Crovella e Paulo Souza, por serem, além de grandes profissionais, grandes humanos, merecedores de respeito e admiração.

A professora Maria de Mascena, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de trilhar o rumo da ciência.

A todos os professores do PPGBAS, em especial ao Professor Luiz de Carvalho, pelo grande apoio e determinação em fazer com que o programa se torne melhor a cada dia.

A todos de nossa turma de mestrado: Arthur, Eduardo e Mayara. E aos meus amigos desde a graduação: Hugo, Ariane, Rafael, Fernanda, Chico, Taciana, Renata e Marcela.

A todos do LGBS e aos “my friends”: Aurélio, Diego e João.

A minha falecida vó: Lucimar Sarmiento, por ter me dado a educação e a base para ser quem sou. E ao meu também falecido tio Urias Lima, por ser meu exemplo de determinação.

A CAPES e aos CNPq pela concessão das bolsas e pelo financiamento do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

*“Tudo é precioso para aquele que por
muito tempo foi privado de tudo.”*

Friedrich Nietzsche.

Resumo

O câncer cervical (CC) é o segundo tipo de câncer mais comum a afetar mulheres em todo mundo. O Papillomavírus humano (HPV) é encontrado em 99% dos casos de CC e a infecção por esse vírus é considerado um fator de risco para o desenvolvimento do câncer. Muitos estudos tem demonstrado uma relação entre polimorfismos nos genes de citocinas e doenças infecciosas. Polimorfismos nos genes da Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Crescimento Transformador (TGF) β 1, importantes mediadores do sistema imunológico, tem sido associados com níveis séricos elevados destas citocinas e no desenvolvimento de muitas doenças e tipos de cânceres. O objetivo desse estudo foi verificar se o SNP -174G/C do gene da IL-6 e T869C e G915C do gene do TGF- β 1 estão relacionados com o desenvolvimento de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC). 115 amostras de pacientes saudáveis e 115 de pacientes com lesões foram analisadas. As análises dos SNP foram realizadas através do sequenciamento automático de DNA utilizando o “MEGABACE 1000”. Os genótipos do polimorfismo -174G/C da IL-6 que possuem pelo menos um alelo C parecem estar envolvidos no desenvolvimento de NIC induzida pelo HPV ($p=0.05232$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da TGF- β 1 nos dois grupos analisados. Além disso, polimorfismos nos genes da IL-6 e TGF- β 1 não estão envolvidos na progressão do CIN. Este estudo sugere que o polimorfismo -174G/C do gene da IL-6 pode ser usado como um gene marcador da susceptibilidade a infecção pelo HPV, mas não como um marcador de progressão de NIC na população Pernambucana.

Palavras chave: HPV, IL-6, TGF- β 1, Neoplasia Intraepitelial cervical, Sequenciamento de DNA

Abstract

Cervical cancer (CC) is the second most frequent cancer type that affects women worldwide. Human Papillomavirus (HPV) is founded in 99% of the cases of CC and the infection for this virus is considered a risk factor for cancer development. Many studies have been showed a relationship between cytokine genes polymorphisms and infectious diseases. Polymorphisms at genes of Interleukin-6 (IL-6) and Transforming Growth Factor (TGF) β 1, important mediators of immunologic system, has been associated with high serum levels of that cytokines and on the development of many diseases and cancer types. The purpose of this study was verify if the SNP -174G/C of IL-6 gene and T869C and G915C of TGF- β 1 gene are related with the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). 115 samples of health patients and 115 patients with lesions were analyzed. The SNP analysis was performed trough DNA sequencing using "MEGABACE 1000". Genotypes of IL-6 -174G/C that had at least one C allele seems to be involved in the development of CIN induced by HPV ($p=0.0532$). No significant differences were founded between allelic and genotypic frequencies of TGF- β 1 polymorphisms in two groups analyzed. Moreover, polymorphisms of IL-6 and TGF- β 1 genes are not involved on the progression of CIN. This study suggest that the -174G/C polymorphism of IL-6 could be used how a gene marker of HPV susceptibility but no how a progression marker at Pernambuco population.

Key words: HPV, IL-6, TGF- β 1, cervical intraepithelial neoplasia, Sequencing of DNA

Lista de Abreviaturas e Siglas

IL-6	-Interleucina-6
HPV	-Papillomavírus Humano
NIC	-Neoplasia Intraepitelial Cervical
TGF- β 1	-Transforming Growth Factor- β 1 / Fator de Crescimento Transformador- β 1
ICTV	- The International Committee on the Taxonomy of Viruses
ORF	-Open reading frame
LCR	-Long Control region
CD	-Célula dendrítica
MHC	-Major histocompatibility complex
NK	-Natural killer
PAMP	-Pathogen associated molecular pattern
RRP	-Receptores de reconhecimento padrão
TLR	-Toll-like receptor
APC	-Antigen presenter cell
IFN	-Interferon
CSF	-Colony stimulator factor
TNF	-Tumor necrosis factor
SNP	-Single nucleotide polymorphism
CC	Cervical Cancer / Câncer Cervical

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo T869C do gene do TGF- β 1 (rs1982073) em mulheres com Neoplasia intraepitelial cervical e nos controles saudáveis. Pág. 60

Tabela 2 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo G915C doo gene do TGF- β 1 (rs rs1800471) em mulheres com Neoplasia intraepitelial cervical e nos controles saudáveis. Pág. 61

Tabela 3 – Frequência estimada dos haplótipos os polimorfismos T869C (rs1982073) e G915C (rs1800471) do gene do TGF- β 1. Pág.62

Tabela 4 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo -174G/C do gene da IL-6 (rs1800795) em mulheres com Neoplasia intraepitelial cervical e nos controles saudáveis. Pág. 63

Tabela 5 – Comparação das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene da IL-6 (rs1800795) entre as populações de Pernambuco, São Paulo, Áustria e populações estudadas pelo projeto HapMap. Pág. 64

Tabela 6 – Frequências alélicas dos polimorfismos T869C (rs1982073) e G915C (rs1800471) do gene do TGF- β 1 em diferentes grupos étnicos. Pág. 65

Sumário

Revisão Bibliográfica	12
1. Papillomavírus Humano	12
1.1 Tipos de HPV	13
1.2 Componentes virais e propriedades físicas	15
1.3 Genoma, proteínas e ciclo de vida	16
2. A Imunidade Humana	20
2.1 Citocinas	23
2.2 Interleucina-6	25
2.3 Fator de Crescimento Transformador	27
Referências Bibliográficas	29
Artigo	43
Interleukin-6 is associated with cervical lesions induced by HPV but not with progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia	44
Abstract	45
1. Introduction	46
2. Materials and Methods	48
2.1 Patients	48
2.2 HPV detection	48
2.3 Molecular genotyping	48
2.4 Statistical Analysis	48
3. Results	49
4. Discussion	50
5. Conclusion	52
6. Acknowledgments	53
7. References	54

Revisão Bibliográfica

1. Papillomavírus

Papillomavírus (latim *papila* - projeção ou saliência em forma de mamilo, e da desinência – *oma*, usada pelos antigos médicos gregos para designar as tumorações ou os entumescimentos). Os papillomavírus causam lesões epiteliais tanto em humanos quanto em animais, sendo encontrados em mais de vinte diferentes espécies de mamíferos, aves e répteis. A infecção por estes vírus são espécie-específicos. [1, 2).

Os Papillomavirus foram originalmente agrupados juntos com os polyomavirus em uma única família, a *Papovaviridae*. Isto aconteceu baseado em similaridades como, capsídeos não-envelopados e o genoma composto de uma única molécula de DNA fita-dupla. Posteriormente reconheceu-se que os dois grupos de vírus possuíam diferentes tamanhos e organização completamente diferente dos genomas e não possuíam similaridade na maioria das sequencias de nucleotídeos ou sequencias de aminoácidos, e, por isso, foram oficialmente reconhecidos pelo – *The International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) – como duas famílias separadas, A *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* [3].

1.1 Tipos de HPV

Por causa da sua importância médica, os HPV têm sido extensivamente estudados, e mais de 100 diferentes tipos já foram identificados. Os genótipos são nomeados pela abreviação HPV seguida de um número que é dado sequencialmente, à medida que diferentes tipos são descobertos [4].

A classificação em genótipos ou tipos baseia-se na comparação de sequências de nucleotídeos do gene L1 dos diversos HPV. Cada tipo de HPV difere dos outros em pelo menos 10% na sequência de nucleotídeos de L1. Quando a diferença na sequência desse gene varia entre 2 a 10%, o isolado é considerado subtipo. Se a divergência for menor que 2%, fala-se em variante do tipo [5].

Os papillomavírus são perfeitamente adaptados ao seu hospedeiro natural, e possuem tropismo específico por células epiteliais escamosas da pele e mucosas, ao qual utilizam a maquinaria celular em benefício próprio. Dos mais de 100 genótipos de HPV já caracterizados, cerca de 30 infectam a mucosa do trato urogenital e anal, podendo causar lesões tanto benignas, quanto malignas [2].

Os HPV mucosotróficos podem ser categorizados em baixo risco, como por exemplo, HPV 6, 11, 42, 43 e 44, ou alto risco, exemplo, HPV 16,18, 31, 33, 45, 58, de acordo com o seu potencial oncogênico [6, 7]. Os HPV de baixo risco estão presentes na maioria das infecções clinicamente aparentes como tumorações benignas, verrugas ou condilomas acuminados. Já condições

malignas, que aparecem na forma subclínica, como NIC e o carcinoma invasivo estão associados aos HPV de alto risco [8].

Os HPV 16 e 18 são os tipos mais prevalentes, sendo encontrados em mais de 70% das amostras de câncer cervical no mundo, por isso, são considerados os principais causadores desta doença e das lesões precursoras [9].

1.2 Componentes virais e propriedades físicas

Papillomavirus são vírus pequenos, não envelopados e icosaédricos que possuem um diâmetro de 52-55nm. As partículas virais consistem de uma única molécula de DNA fita dupla de aproximadamente 8000 pares de base (bp) ligadas a proteínas histonas. Este material está contido em um capsídeo proteico composto de 72 capsômeros pentâmeros. O capsídeo contém duas proteínas estruturais – late (L)1 (tamanho de 55kda; 80% das proteínas virais) e L2 (70kda) – as quais são codificadas pelo vírus. O virion intacto tem densidade de 1.34g/mL em cloreto de cério e um coeficiente de sedimentação de 300 [10, 11].

1,3 Genoma, proteínas e ciclo de vida

Os genomas de todos os tipos de HPV contém aproximadamente oito ORFs. Essas ORFs podem ser divididas em três partes funcionais: A região early (E) que codifica proteínas (E1-E7) necessariamente para replicação; a região late (L) que codifica proteínas estruturais (L1 – L2) que são necessárias para a montagem do vírion; e uma grande região não codificante que é conhecida *long control region* (LCR) (figura 1), a qual contém elementos cis, que são necessários para a replicação e transcrição do DNA viral. As proteínas virais E são transcritas através do promotor “early” enquanto as proteínas L são transcritas, principalmente, através do promotor “late” [12].

Por razões desconhecidas, a infecção pelo HPV tende a causar câncer em áreas referidas como “zonas de transformação”. Nestas áreas, são onde ocorre um processo chamado de metaplasia, em que um epitélio foi ou está sendo gradualmente substituído por outro. A cérvix e o ânus são exemplos de tecidos que contém essas zonas de transformação aos quais estão mais propensos ao processo de carcinogênese do HPV. No caso da cérvix, a zona de transformação é a área onde o epitélio colunar está sendo, ou foi substituído pelo epitélio escamoso metaplásico [13].

O ciclo de vida produtivo dos HPV está diretamente relacionado à diferenciação celular epitelial. Tem sido sugerido, que para manutenção da infecção, o HPV tem que infectar as células da camada basal, uma vez que estas são as únicas no epitélio escamoso que são capazes de se dividir [14]. Para que as partículas virais consigam chegar às células da camada basal, é

necessário que haja fissuras ou micro lesões no epitélio estratificado. Estas fissuras normalmente ocorrem como resultado, por exemplo, da atividade sexual [15].

As proteínas E1 e E2 do HPV atuam como fatores que reconhecem a origem de replicação; a proteína E2 é também o principal regulador da transcrição do gene viral. Acredita-se que a proteína E4 está envolvida nos estágios finais do ciclo de vida do vírus e E5 pode funcionar tanto na fase precoce quanto na fase tardia. As proteínas E6 e E7 tem como alvo um número de reguladores negativos do ciclo celular, primariamente p105Rb e p53, respectivamente. Durante o ciclo viral, E6 e E7 facilita a manutenção estável dos episomas virais e estimula a diferenciação das células fazendo com que elas entrem novamente na fase S. As proteínas L1 e L2 montam os capsômeros, formando capsídeos icosaedricos em torno do genoma viral durante a geração da progênie de virions [12].

Um subconjunto de HPV mucosotrópicos pertencentes ao gênero alpha, incluindo os tipos de HPV de alto risco 16 e 18, estão associados com mais de 99% dos casos de câncer cervical [16]. Nesses cancers, o genoma do papillomavirus encontra-se frequentemente integrado ao cromossomo do hospedeiro [17, 18, 19]. Células epiteliais cervicais que tem integrado ao seu genoma o DNA do HPV 16 possuem uma vantagem de crescimento quando comparado a outros tipos de HPV contendo genoma viral na sua forma extra cromossomal. Esta vantagem de crescimento está associada com o aumento da expressão de dois genes virais em particular, E6 e E7 [20]. A expressão dos genes virais E6 e E7 é necessária para o crescimento contínuo de linhagens celulares derivadas do câncer cervical [21, 22]. Estes fatos suportam a hipótese

de que E6 e E7 causalmente relacionados ao início e manutenção de cânceres cervicais humanos. Além disso, a expressão contínua dessas proteínas precoces pode levar a acumulação de mutações no genoma celular que são necessárias a carcinogênese [23] Tanto E6 quanto E7 cooperam para indução da transformação de células epiteliais [24], no entanto, um fenótipo totalmente maligno somente é observado após um cultivo prolongado de células transformadas [25, 26].

Na maioria das mulheres infectadas pelo HPV cervical, as lesões causadas pelo vírus não progridem ao câncer. Porém, em algumas mulheres, as lesões não regredem com sucesso, podendo persistir e progredir de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) 1, para NIC 2, NIC 3 e ao carcinoma invasivo [27]. Isto sugere que em torno do HPV que exerce um papel fundamental para a carcinogênese, orbitam outros fatores que influenciam direta ou indiretamente na instalação desse mecanismo no epitélio escamoso cervical [28].

O câncer cervical é o tipo mais comum de câncer nos países em desenvolvimento e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. A estimativa de novos casos de câncer cervical por ano é de 525.000 [3]. O número de casos novos de câncer do colo do útero esperado para o Brasil no ano de 2012 será de 17.540, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres [29]. Na América Central e na América do Sul a taxa de incidência é cerca de cinco vezes maior que na Europa Ocidental [30].

Além do câncer cervical, o DNA do HPV é encontrado em aproximadamente 10% de todos os cânceres humanos, bem como em

condições pré-cancerosas. Cerca de 26% dos cânceres de cabeça e pescoço estão ligados a infecção por HPV [31]. Enquanto que as infecções por HPV são comuns em todos os grupos sócio demográficos, alta prevalência foi encontrada entre mulheres não casadas, com baixo nível de escolaridade, que possuem baixa condição socioeconômica e que pertencem a certos grupos étnicos [32].

2. A imunidade humana

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e células transformadas, incluindo o câncer. Para a quase totalidade das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir esses microrganismos e impedir a progressão da infecção. Em contraste, as deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata ou da imunidade adaptativa, são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções [33].

O sistema de defesa dos humanos consiste em dois mecanismos de proteção: 1- Barreiras anatômicas e fisiológicas responsável por respostas rápidas, sendo filogeneticamente mais primitiva e não específica; 3- Imunidade adquirida, envolvendo uma resposta mais lenta, porém de longa duração, específica e capaz de gerar memória [34, 35].

A resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do patógeno ou de outro material estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação com a finalidade de eliminá-lo do organismo. A imunidade inata age como nossa primeira linha de defesa contra infecções, e é um componente antigo na evolução da defesa do hospedeiro, pois está presente em todos os organismos multicelulares. Independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, a resposta inata não se altera [36].

As respostas imunes são mediadas por uma variedade de células e moléculas solúveis que estas secretam como resposta a eventos perigosos como patógenos e células transformadas. As principais células efetoras da

imunidade inata são: células dendríticas (CDs), macrófagos, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e células natural killer (NK). Os componentes humorais incluem proteínas do complemento, proteínas de fase aguda, citocinas, dentre outras [34].

As células da imunidade inata possuem limitado repertório de receptores que reconhecem moléculas altamente conservadas por vários microrganismos ou Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs), que são moléculas essenciais para a fisiologia e a sobrevivência deles. Os PAMPs são reconhecidos por Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs), como os da família dos receptores *toll-like* (TLRs) [37, 38].

A imunidade adquirida consiste em linfócitos T e B e seus mediadores humorais, incluindo citocinas e anticorpos. Em contraste com o limitado número de receptores para patógenos do sistema imune inato, o sistema imune adquirido possui um repertório extremamente diversificado de receptores, gerados aleatoriamente através de rearranjos somáticos nos genes [39].

A resposta da imunidade adquirida à primeira exposição ao patógeno é lenta e demora geralmente cinco dias para expansão clonal dos linfócitos T e B antígeno-específicos. Porém, a imunidade adquirida é capaz de gerar memória imunológica, respondendo de forma mais rápida se houver uma segunda exposição ao patógeno [40].

Através de manifestações de inflamação e morte ou dano celular, efetores celulares e humorais da imunidade inata são ativados e recrutados para o local. As CDs agem como células apresentadoras de antígeno (APCs), e se tornam ativadas ao encontrarem o agente infeccioso. Elas fagocitam, processam e expressam o antígeno em um receptor da superfície celular

chamado de complexo de histocompatibilidade principal de classe dois (MHC II), e depois apresentam o antígeno para os linfócitos. [41].

Os linfócitos T utilizam seus receptores antígeno-específicos (TCRs) para reconhecer os peptídeos antigênicos ligados às moléculas do MHC. Os dois principais tipos de linfócitos T são indentificados pelos de marcadores de superfície da célula CD4 ou CD8. Os linfócitos T CD4+ reconhecem atígenos apresentados pelo MHC de classe II que são expressos por APCs; Os linfócitos T CD8+ reconhecem antígenos apresentados pelo MHC de classe I que são expressos por células infectadas que se marcam para ser o alvo da citotoxicidade destes linfócitos [33].

Os linfócitos T CD8+ possuem atividade citotóxica, como citado anteriormente, enquanto os linfócitos T CD4+ possuem função de regulatória da atividade de outras células através da secreção de mediadores solúveis chamados de citocinas. Os linfócitos T CD4+ podem ser divididos em dois tipos, de acordo com o perfil de secreção de citocinas [42]:

- Th1: Secreta a interleucina 2 e o interferon gama que facilita a resposta mediada por células, incluindo a ativação de macrófagos, células NK e linfócitos T CD8+, auxiliando-os na destruição de patógenos intracelulares
- Th2: Secreta as interleucinas 4, 5, 6 e 10, que ajudam na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e na secreção de anticorpos.

As citocinas têm um papel central na imunidade, pois elas determinam que tipo de resposta a ser dada para fornecer uma ótima proteção ao hospedeiro contra agentes infecciosos particulares [33].

2.1 Citocinas

As citocinas são um diversificado grupo de proteínas ou glicoproteínas solúveis que fazem parte de uma rede de sinalização, mediando interações entre células. Elas podem ser agrupadas em várias subfamílias: Interleucinas (numeradas de IL-1 a IL-26), interferons (IFNs), fatores estimuladores de colônia (CSFs), fatores de necrose tumoral (TNFs), fatores de crescimento (TGF) e quimiocinas. Esta nomenclatura é um pouco arbitrária, pois as citocinas possuem múltiplas funções, podendo várias ter ações semelhantes, de modo que existe uma redundância em pelo menos alguns de seus papéis [43, 44].

As citocinas são liberadas por provavelmente todas as células humanas em concentrações diminutas, formando importantes proteínas “mensageiras” solúveis. Atuam geralmente em pequenas distâncias, de maneira autócrina (agindo sobre as próprias células) ou parácrina (agindo sobre células próximas), com exceção de uma minoria que pode ter uma ação sistêmica, como a IL-6. Elas interagem com receptores específicos das células ligados a um segundo mensageiro intracelular, ao qual estabelece uma cascata de reações que leva à indução ou à inibição da transcrição de inúmeros genes por vias de sinalização celular [43, 44].

Diferente dos hormônios endócrinos que são produzidos diariamente com a finalidade de assegurar o funcionamento eficiente dos órgãos, a produção de citocinas é transitória e rigorosamente controlada. Elas têm um papel fisiológico na restauração da função normal dos tecidos, quando estes

são submetidos a desafios importantes ou mudanças, como em eventos que ocorrem normalmente durante infecções ou traumas [43].

Assim, além de terem um papel importante na defesa e reparação dos tecidos, as citocinas também têm a função de controlar as respostas da imunidade inata e adquirida, incluindo: inflamação, defesa contra infecções virais, proliferação e controle das funções diferenciadas dos linfócitos T e B.

O estímulo clássico para a produção de citocinas é através da interação dos PAMPs com os receptores *Toll-like* das células da imunidade inata. Estes receptores irão desencadear uma cascata de sinais intracelulares, e resulta na transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α que são capazes de induzir a inflamação [45].

Embora a inflamação seja um processo auto limitado que atua na defesa do organismo contra infecções ou danos, a resolução inadequada das respostas inflamatórias geralmente leva a doenças crônicas, incluindo o câncer [46]. Extensivos estudos sobre polimorfismos genéticos têm sido descritos, e em muitos casos, estes polimorfismos aumentam os níveis das citocinas que induzem a inflamação, estando ligado a uma variedade de doenças [47].

2.2 Interleucina-6

Interleucina-6 (IL-6) ou Interferon Beta-2 (IFNB2) (número OMIM 147620), uma glicoproteína 212 aminoácidos, é uma citocina pleiotrópica imunoregulatória que ativa a maquinaria de sinalização da superfície celular composta de IL-6, IL6RA e o sinalizador compartilhado gp130 [48]. É produzida por uma variedade enorme de células, e desempenha um papel central na defesa do organismo. Esta citocina está envolvida em diferentes processos fisiológicos e patofisiológicos, tais como, metabolismo ósseo, hematopoese, diferenciação e/ou ativação de macrófagos e células T, crescimento e diferenciação terminal das células B, síntese de CP (proteína C-reativa) e carcinogênese [49, 50] (DIEHL, 2002; ASSCHERT, 1999).

A expressão da IL-6 é induzida como uma resposta a estímulos inflamatórios de IL-1 e TNF- α [51]. Por sua vez, a IL-6 induz quimiocinas e aumenta o número de moléculas de adesão nas células endoteliais, colaborando na geração de respostas inflamatórias [52]. Além disso, a IL-6 também modula a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e inibição da apoptose [53].

A presença da IL-6 nos tecidos não é uma ocorrência anormal, mas sua produção sem controle leva a uma inflamação crônica subsequente, sendo elevados níveis desta citocina associado com o desenvolvimento de diversas doenças malignas incluindo diferentes tipos de câncer [54, 55]. A IL-6 é um fator de crescimento para o mieloma múltiplo, carcinoma de células renais, linfomas não-Hodgkin, câncer de bexiga e câncer colorectal [56], também

atuando conjuntamente com outras citocinas na produção de outros sinais promotores de tumor [57, 58].

Resultados experimentais sugerem que este papel se dá pela regulação aumentada da expressão de receptores de adesão em células endoteliais, tais como Molécula de adesão intercelular-1 e Molécula de adesão de leucócitos-1, e pela estimulação da produção de fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento de hepatócitos e fator de crescimento endotelial vascular [59, 60, 61]. Muitos estudos clínicos encontraram que, em diferentes tipos tumorais, um alto nível sérico da IL-6 esteve associado com o avanço no estado da doença [62, 63, 64, 65] e com um mau prognóstico [62, 66, 67].

O gene da IL-6, localizado em humanos no braço curto do cromossomo 7 (7p21), apresenta um polimorfismo de base única (SNP) na região promotora (-174 G/C) o qual parece estar associado com variações na expressão da IL-6 e nos níveis séricos [68]. Aumento nos níveis de citocina ocorreram no genótipo GG tanto em estudos “in vitro” quanto em estudos “in vivo” [68, 69; 70], embora alguns autores descrevam valores aumentados para o genótipo CC [71, 72]. No entanto, é importante levar em consideração que a IL-6 tem uma meia-vida curta e os ensaios envolvendo a mesma são complexos [73].

Este SNP também está associado com o prognóstico de câncer gástrico [74], carcinoma de células renais [75] e câncer de próstata [76]. No câncer cervical, a IL-6 parece estar envolvida na progressão do tumor e metástase [74, 77].

2.3 Fator de Crescimento Transformador

O fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), localizado no cromossomo 19 (19q13), é uma molécula fundamental de homeostase entre o crescimento celular e a apoptose. O balanço entre proliferação celular, sobrevivência e morte celular é central para muitos processos fisiológicos e sua desregulação pode induzir doenças. Enquanto o excesso de apoptose é observado em doenças crônicas degenerativas e imunodeficiência, apoptose insuficiente pode participar em processos cancerígenos e de autoimunidade. Ademais, apoptose é um processo crítico na seleção de células T no sistema imune [78].

De acordo com a ideia de que TGF-b pode atuar como um promotor tumoral, mRNA TGF-b1 aumentado ou expressão de proteínas em células tumorais e/ou seus níveis plasmáticos têm sido correlacionados com progressão tumoral aumentada, em câncer coloretal, carcinoma gástrico, câncer pulmonar e câncer de próstata [79, 80, 81, 82]. Níveis de TGF-b no soro são significativamente maiores em pacientes com câncer de pulmão ou câncer coloretal que tiveram metástase para os linfonodos [79, 80]. Além disso, imunomarcção de TGF-b mostra ser forte no local de invasão de linfonodos (metástase) comparado com o sítio primário do tumor em câncer coloretal e de mama [82, 83]. Tumores primários que sofreram metástase tem uma marcação mais forte do que aqueles que não sofreram, e a metástase também exibe forte marcação de TGF-b. Esta é uma forte evidência que sugere que o TGF-b é um importante fator que promove a metástase em fases tumorais tardias. Esse fato está correlacionado com a habilidade do TGF-b em induzir a transição epitelial

– mesenquimal (EMT), invasão e migração tanto de células não transformadas como de células tumorais in vitro [85, 86]. Altos níveis de TGF- β em tumores também têm sido correlacionados com angiogênese. A expressão de TGF- β é associada com alta densidade vascular em câncer de próstata [84] e altos níveis plasmáticos de TGF- β em pacientes com carcinoma hepatocelular está correlacionado com a vascularização tumoral [87].

O gene da TGF- β 1 possui muitos polimorfismos, incluindo 988 C/A, 800 G/A e 509 C/T na região promotora, inserção (C) na região não traduzida e C263T, T869C, G915C na região codificante [88]. Entre eles, três polimorfismos: 509 C/T, T869C e G915C tem sido associados com o nível sérico de TGF- β 1 [89, 90]. O SNP T869C está localizado no códon 10 do exon 1 e resulta numa mudança da leucina para prolina, enquanto o SNP G915C está localizado no códon 25 e resulta numa mudança de arginina para prolina. Estudos têm mostrado que o alelo variante C do SNP T869C e o alelo selvagem G do SNP G915C estão associados com um aumento na produção do TGF- β 1 [89, 91, 92]. Esses polimorfismos estão ligados a uma grande variedade de doenças e cânceres humanos, tais como o câncer de mama, câncer cervical, câncer de pulmão e câncer gástrico [93, 94, 95, 96].

Referências Bibliográficas

- [1] van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Academic Press 2000; 1176
- [2] Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 2005; 32S: S1-S6.
- [3] IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2007; 90.
- [4] Bernard HU, CHAN SY, MANOS MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994; 170: 1077-85.
- [5] Doorbar J, Sterling JC. The biology of human papillomaviruses *In Sterling JC, Tying SK. Human papillomaviruses – clinical and scientific advances* Londres, Arnold 2001; 10-23.
- [6] Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. Comparison of the in vitro transforming properties of human papillomavirus types. EMBO J 1988; 7: 1815-20.
- [7] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer

Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–27.

[8] Delius H, Saegling B, Bergmann K, Shamanin V, de Villiers EM. The genomes of three of four novel HPV types, defined by difference of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology* 1988; 240(2): 359-65.

[9] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta- analyses update. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-32.

[10] Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992; 89: 12180–4.

[11] Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993; 67: 315–22.

[12] Fehrman F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 2003; 77: 2819–31

[13] Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24: 3-51.

- [14] Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003; 207: 251-4.
- [15] Schneider A. Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirology* 1994, 37 (3-4): 201-14.
- [16] Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJJ, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12–9.
- [17] Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984; 3: 1151–57
- [18] Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314: 111–4.
- [19] Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985; 119: 361–6.
- [20] Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc natl Acad Sci USA* 1995; 92: 16548.

- [21] Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, Sakai H. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* 2000, 74: 3752–60.
- [22] Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, Howley PM. Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21CIP-dependent pathways. *EMBO J* 2000, 19: 5762–71.
- [23] zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin. Cancer Biol* 1999; 9: 405–11.
- [24] Münger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley, P.M. & Schlegel, R. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63: 4417–21.
- [25] Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc nat. Acad Sci USA* 1991; 88: 570–74.
- [26] Dürst M, Seagon S, Wanschura S, zur Hausen H, Bullerdiek J. Malignant progression of an HPV 16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK 1A) in vitro. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 85: 105–12
- [27] Gross GE, Barrasso R. Human papillomavirus infection: a clinical atlas. Berlin: Ullstein Mosby; 1997

- [28] Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24(3): S3/1–S3/10.
- [29] Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro. INCA 2009, 98 p.
- [30] Arossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003; 45(3):306-14.
- [31] Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004; 363:1488-89.
- [32] Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297: 813–819. doi: 10.1001/jama.297.8.813.
- [33] Janeway Jr CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001, 3: 1167-71.
- [34] Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J of A and Clin Immunol* 2010; 125: 24-32.
- [35] Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006; 24: S1 S1/16-S1/22.
- [36] Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-44.
- [37] Janeway Jr CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54: 1-13.

- [38] Medzhitov R, Janeway Jr CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296: 298-300.
- [39] Maruyama K, Selmani Z, Ishii H, Yamaguchi K. Innate immunity and cancer therapy. *J of A and Clin Immunol* 2010; 125: 33-40.
- [40] Bonilla FA, OETTGEN HC. Adaptive immunity. *J of A and Clin Immunol* 2010; 125: S33-S40.
- [41] Delves PJ, Roitt D. The Immune System – First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 37-50.
- [42] WU TC. Immunology of the human papillomavirus in relation to cancer. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 746-54.
- [43] Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine* 2003; 5: 45-57.
- [44] Dunlop RJ, Campbell CW. Cytokines and Advanced Cancer. *J of P and Symp Manag* 2000, 20: 214-32.
- [45] Shalaby MR, Waage A, Aarden L, Espevik T. Endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53: 488–98.
- [46] Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 69–83.
- [47] Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene

polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 2001; 2: 61–70.

[48] Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003; 300 (04): 2101–21.

[49] Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002; 39: 531–6.

[50] Asschert JG, Vellenga E, Ruiters MH, de Vries EG. Regulation of spontaneous and TNF/IFN-induced IL-6 expression in two human ovarian-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1999; 82: 244–9.

[51] Snick V. Interleukin 6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 253–78.

[52] Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leucocyte recruitment. *Immunity* 1997, 6: 315–25.

[53] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175–83.

[54] Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem* 2005; 95: 497–505.

[55] Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007; 110: 1911–1928.

- [56] Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006; 72 (11): 1605–21.
- [57] Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 2002; 104: 153–69.
- [58] Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004; 14 (6): 433–9.
- [59] Hutchins D, Steel CM. Regulation of ICAM-1 (CD54) expression in human breast cancer cell lines by interleukin 6 and fibroblast-derived factors. *Int J Cancer* 1994; 58: 80 –4.
- [60] de Jong KP, van Gameren MM, Bijzet J, Limburg PC, Sluiter WJ, Slooff JH, de Vries EGE. Recombinant human interleukin-6 induces hepatocyte growth factor production in cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 636 – 40.
- [61] Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi B Z. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736 –41.
- [62] Zhang GJ, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anti-cancer Res* 1999; 19: 1427–32.
- [63] Shariat SF, Andrews B, Kattan MW, Kim J, Wheeler TM, Slawin K M. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology* 2001; 58: 1008 –815.

- [64] Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozaiki M, Abe T, Iizuka N, Hazama S, Hirazawa K, Hayashi H, Tangoku A, Hirose K, Ishihara T, Suzuki T. Relationship between serum levels of interleukin-6, various disease parameters, and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 2776–80.
- [65] Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, Khayat D, Soubrane C. Endogenous interleukin-6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1405–9.
- [66] Berek JS, Chung C, Kaldi K, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1038–43.
- [67] Wu CW, Wang SR, Caho MF, Wu TC, Lui WY, Peng FK, Chi CW. Serum interleukin-6 levels reflects disease status of gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1417–22.
- [68] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369–76.
- [69] Bonafé M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Mayegiani F, Cardelli M, Pieri C, Marra M, Antonicelli R, Lisa R, Rizzo MR, Paolisso G, Monti D, Franceschi C. A gender—dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2357-61.

- [70] Giacconi R, The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Experimental gerontology* 2004; 39(4): 621-8.
- [71] Haddy N, Sass C, Maumus S, Marie B, Droesch S, Siest G, Lambert D, Visvikis S. Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF-alpha and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. *Eur J Hum Genet* 2005;13(1): 109-17.
- [72] Jerrard-Dunne P, Sitzler M, Risley P, Steckel DA, Buehler A, von Kegler S, Markus HS; Carotid Atherosclerosis Progression Study. Interleukin-6 promoter polymorphism modulates the effects of heavy alcohol consumption on early carotid artery atherosclerosis: the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke* 2003; 34(2): 402-7.
- [73] Neal B. Quantifying the importance of interleukin-6 for coronary heart disease. *PLoS Med* 2008; 5(4): e84.
- [74] De Vita F, Romano C, Orditura M, Galizia G, Martinelli E, Lieto E, Catalano G. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21(1): 45-52.
- [75] Tsukamoto T, Kumamoto Y, Miyao N, Masumori N, Takahashi A, Yanase M. Interleukin-6 in renal cell carcinoma. *J Urol* 1992; 148: 1778-82.
- [76] Nakashima I, Fujihara K, Misu T, Okita N, Takase S, Itoyama Y. Significant correlation between IL-10 levels and IgG indices in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 111(1-2): 64-7.

- [77] Kinoshita T, Ito H, Miki C. Serum IL-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal cancer. *Cancer* 1999; 85: 2526–31.
- [78] Gupta S. Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin Immunol* 2000; 20: 229–39.
- [79] Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-b1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 91:964–71.
- [80] Shim KS, Kim KH, Han WS, Park EB. Elevated serum levels of transforming growth factor-b1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer* 1999; 85: 554–61.
- [81] Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. The expression of transforming growth factor-b1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1455–62.
- [82] Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-b 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:381–9.
- [83] Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman E. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor b1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 497–504.

- [84] Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A. Transforming growth factor b1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 1998; 37: 19–29.
- [85] Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL. Transforming growth factorb1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001;12: 27–36.
- [86] Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grünert S. Ras and TGFb cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 2002; 156: 299–313.
- [87] Ito N, Kawata S, Tamura S, Shirai Y, Kiso S, Tsushima H, Matsuzawa Y. Positive correlation of plasma transforming growth factor-b 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 1995; 89: 45–8.
- [88] Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996; 28: 881-7.
- [89] Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014-20.

- [90] Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type b1. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 93–7.
- [91] Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, Luben RN, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Metcalfe JC. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63(10): 2610-5.
- [92] Kaklamani VG, Baddi L, Liu J, Rosman D, Phukan S, Bradley C, Hegarty C, McDaniel B, Rademaker A, Oddoux C, Ostrer H, Michel LS, Huang H, Chen Y, Ahsan H, Offit K, Pasche B. Combined genetic assessment of transforming growth factor-beta signaling pathway variants may predict breast cancer risk. *Cancer Res* 2005; 65(8): 3454-61.
- [93] Shu XO, Gao YT, Cai Q, Pierce L, Cai H, Ruan ZX, Yang G, Jin F, Zheng W. Genetic polymorphisms in the TGF-beta 1 gene and breast cancer survival: a report from the Shanghai breast cancer study. *Cancer Res* 2004; 64: 836–9
- [94] Stanczuk GA, Tswana SA, Bergstrom S, Sibanda EN. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Immunogenet* 2002; 29: 417–21
- [95] Kang HG, Chae MH, Park JM, Kim EJ, Park JH, Kam S, Cha SI, Kim HC, Park RW, Park SH, Kim YL, Kim IS, Jung TH, Park JY Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer *Lung Cancer (Amsterdam, The Netherlands)* 2000; 52: 1–7

[96] Jin G, Wang L, Chen W, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, Wang J, Hua Z, Ding W, Shen J, Zhang Z, Wang X, Xu Y, Shen H. Variant alleles of TGFB1 and TGFB2 are associated with a decreased risk of gastric cancer in a Chinese population *Int. J. Cancer* 2007; 120: 1330–5

Artigo a ser submetido ao periódico “Human Immunology”. ISSN: 0198-8859. Editora: Elsevier. Fator de Impacto: 2.872

Interleukin-6 is associated with cervical lesions induced by HPV but not with progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia

Lima Júnior SF¹, Fernandes MCM¹, Heráclio SA², Amorim MMR², Souza PRE³, Crovella S¹

- 1- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil
- 2- Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife-PE Brazil
- 3- Departamento de Genética, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil

Corresponding Author: Souza PRE – Telefone – E-mail – Endereço

Abstract

Cervical cancer (CC) is the second most frequent cancer type that affects women worldwide. Human Papillomavirus (HPV) is founded in 99% of the cases of CC and the infection for this virus is considered a risk factor for cancer development. Many studies have been showed a relationship between cytokine genes polymorphisms and infectious diseases. Polymorphisms at genes of Interleukin-6 (IL-6) and Transforming Growth Factor (TGF) β 1, important mediators of immunologic system, has been associated with high serum levels of that cytokines and on the development of many diseases and cancer types. The purpose of this study was verify if the SNP -174G/C of IL-6 and T869C and G915C of TGF- β 1gene are related with the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). 115 samples of health patients and 115 patients with lesions were analyzed. The SNP analysis was performed trough DNA sequencing using "MEGABACE 1000". Genotypes of IL-6 -174G/C that had at least one C allele seems to be involved in the development of CIN induced by HPV ($p=0.0532$). No significant differences were founded between allelic and genotypic frequencies of TGF- β 1 polymorphisms in two groups analyzed. Moreover, polymorphisms of IL-6 and TGF- β 1 genes are not involved on the progression of CIN. This study suggest that the -174G/C polymorphism of IL-6 could be used how a gene marker of HPV susceptibility but no how a progression marker at Pernambuco population.

Key words: HPV, IL-6, TGF- β 1, cervical intraepithelial neoplasia, Sequencing of DNA

1. Introduction

Cervical cancer represents a significant public health problem. Worldwide, cervical cancer has a great impact, every year about 525,000 new cases are expected and 275,000 deaths are reported [1]. In Brazil, the cervical cancer is the second type of cancer more frequent between women. Around 17,540 new cases of this cancer are expected for 2012 which will represent 9.3% of cancer types [2].

Infections with oncogenic types of human papillomavirus are responsible for, virtually, all cases of cervical cancer and precancerous intraepithelial lesions [3]. Besides of cervical cancer, HPV-DNA has been found in about 10% of all types of human cancer as well in precancerous conditions. Around 26% of head and neck cancers are linked with the HPV infections [4].

Although the incidence of HPV infections is high, the most part of these infections are transient and not lead to CIN or cancer, suggesting that other factors such as immunity and host genetic factors influence the risk of development of this disease [5].

Natural polymorphisms or genetic variations between individuals in genes related to immunity have been reported how important on the susceptibility to several diseases and could be interesting on the identification of susceptibility factors for HPV infection persistence and on the identification of susceptibility factor for the carcinoma [6].

Local immune response seems to play an important role on the natural history of HPV infection on uterine cervix. Cytokines are important regulators of the HPV transcription [7]. Furthermore, they have an important role on the defense against HPV infection, modulating the viral replication and polarizing the Th1 and Th2 response [8].

The Interleukin-6 (IL-6) gene, located on the short arm of the human chromosome 7 (7p21), present a single nucleotide polymorphism (SNP) on the promoter region (-174 G/C) (rs1800795) which seems to be associated with variations on the expression of IL-6 and on the serum levels [9]. This SNP is associated with a bad prognosis of gastric cancer [10] renal cells carcinoma [11]

and prostate cancer [12]. On the cervical cancer, the IL-6 seems to be involved on tumoral progression and metastasis [10, 13].

Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) is a fundamental molecule of homeostasis between cellular growth and apoptosis, located on the long arm of the human chromosome 19 (19q13) [14]. TGF- $\beta 1$ has many polymorphisms, including -988 C/A, 800 G/A, and 509 C/T on the promoter region, an insertion (C) on the non-transcript region, and C263T, T869C, and G915C on the coding region [15]. The T869C (rs1982073) single nucleotide polymorphism (SNP) is located at codon 10 of exon 1 and results in a leucine-to-proline change, whereas G915C (rs1800471) is located at codon 25 and results in an arginine-to-proline change. Studies have shown that the variant C allele of T869C is associated with increased production of TGF- $\beta 1$ [16, 17] (DUNNING, 2003; KAKLAMANI, 2005), whereas it is the wild-type G allele of G915C that is associated with increased production of TGF- $\beta 1$ [18] (AWAD, 1998). Furthermore, Circulating levels of TGF- $\beta 1$ have been associated with several diseases, including cancer [19, 20, 21].

How fewer studies have been made associating SNP of the Interleukin-6 and Transforming growth factor with the progression of precursor lesions that lead to cervical cancer, our objective is evaluate if this polymorphisms are associated with the development and the progression of cervical intraepithelial neoplasia.

2. Materials and Methods

2.1 Patients

115 Brazilian women treated in the Centro de Saúde da Mulher from the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) at Pernambuco and who had some type of cervical injury. The samples were collected from the cervical scrape, with the aid of appropriate brushes such as "cytobrush". After collected the brushes were immediately placed in maintenance buffer containing 1.5 mL of TE buffer (Tris-HCl 10mM and EDTA 1mM at pH 8.0) and stored at a temperature of -20° C. Data from this group were compared with those 115 Brazilian health women which were tested and presented negative for HPV infection. The study was previously approved by the local Research Ethics Committee (No. 355/08), and all the included patients agreed to participate by signing the Term of Consent.

2.2 HPV detection

All samples were tested for HPV infection using primers consensus following the described for [22].

2.3 Molecular genotyping

The samples were amplified for IL-6 as described for [23] and for the two regions of TGF- β 1 as described for [24]. After the amplification the amplicons were submitted to sequencing reaction using "DyEnamic ET Dye Terminator Cycle" sequencing kit (GE Healthcare) according to manufacturer's recommendations and were sequenced at "MegaBACE 1000 DNA Sequencer".

2.4 Statistical Analysis

Genotypic and Allelic frequencies of IL-6 and TGF- β 1 were compared by χ^2 and fisher tests using the software Bioestat 5.0 [25]

3. Results

The samples were classified according to lesion grade showed with exception of just two samples, that were removed for the CIN analysis.

The populations of patients and controls, including the populations subgroups classified according to lesion grade, were in Hardy-Weinberg equilibrium for the all polymorphisms analyzed.

The polymorphisms T869C and G915C of TGF- β 1 gene not showed significant differences on the allelic and genotypic frequencies between the patients and control group ($p=0.9242/0.9252$ and $p=0.4697/1.000$, respectively). No relationships were founded between the grades of cervical intraepithelial lesions and the polymorphisms of TGF- β 1 (Table 1 and 2). When analyzed the haplotypes no significance difference were founded too. The haplotype TC just appear one time on control group and not appear on patients and seems to be rare on the Pernambuco population (Table 3).

The polymorphism -174G/C of the interleukin-6 gene not showed significant difference of allelic and genotypic frequencies ($p=0.1116/0.1690$) between control and patients groups (Table 4). However, when we combined the genotypes that carrier at least one G allele, the difference of that genotypes showed significant difference ($p=0.0532$) (Table 4). No difference was observed when compared the different grades of CIN.

4. Discussion

The production and release of IL-6 by transformed cells results on autocrine and paracrine induction of prometastatic genes and, subsequently, lead to prolonged proliferation and survive of cancer squamous cells [26]. Therefore, clinical studies in patients with cervical cancer have been demonstrated that high serum levels of IL-6 are associated with a worst outcome [27]

Our study have demonstrated that the genotypes that carry at least one G allele, on the polymorphism -174G/C of IL-6 gene, could be associated with the risk of development of cervical intraepithelial neoplasia induced by HPV. That result could be related with the fact that *in vivo* and *in vitro* studies have been demonstrated that the presence of G allele on the genotypes lead to an increase of IL-6 production that could create a microenvironment favorable to lesions development [9, 28-31].

Previous studies relating the polymorphism -174G/C of IL-6 and cervical cancer have been reported contradictory results. A study realized at Austria did not observed significant difference between patients group and control group [32]. On study realized in São Paulo, southeast of Brazil, was observed significant difference between patients and controls, nevertheless, the authors related the risk of cervical cancer development to the presence of C allele [33].

These contradictions between the results founded can be explained for the characteristics of the populations studied. The allelic and genotypic frequencies of our study varied widely between the populations of the two studies previously cited and the populations studied by the HapMap project [34] (Table 5). Only the population of Tuscan on Italy, when compared the genotypic frequency, and the populations of São Paulo (Brazil) and Mexicans ancestrally on United States, when compared allelic frequencies, did not show significant differences. This result is related with the fact that allelic and genotypic frequencies vary between the populations worldwide, were one polymorphism could influence in a population and in other no. Moreover the Pernambuco population is composed by an admixture of 40% whites, 40% Afro-Americans and 20% amerinds [35].

TGF- β 1, produced by virtually every cell in the body including epithelial cells, is involved in immunosuppression, regulation of cell cycle progression, tumor suppression and progression, angiogenesis, and metastasis [36-39]. As a member of antigen-specific T cells (termed Th3), TGF- β 1 is capable of suppressing Th1 and Th2 responses [40]. Promotion of imbalances in Th1 and Th2 cytokine levels by Th3 cells may aid in the persistence of viral infections.

Our study not founded any relationship between the polymorphisms of TGF- β 1 and the risk of lesions induced by HPV neither on the progression of precursor lesions of cervical cancer. Previous studies showed to be controversy in their results. Comparison between that polymorphisms and the development of cervical cancer not showed any relation on the Zimbabwe population, Africa [41], and on the Shaaxi population, China neither [42]. But in study performed on Texas, United States, where was compared the susceptibility to HPV16 infection and the polymorphisms used in our study the authors have observed that patients that carry at least one C allele on the T869C genotype had more risk to develop oropharynges cancer, while was not observed significant differences on the polymorphism G915C [43].

The allelic frequencies of TGF- β 1 polymorphisms vary according to the population studied, nevertheless our frequency showed quite similar to the Caucasian and Afro-American populations, corroborating with the description of our population made by Alves-Silva *et al.* [35] (Table 6).

5. Conclusion

The polymorphism -174G/C of IL-6 gene may be involved on the susceptibility of the development of cervical intraepithelial lesions induced by HPV in Pernambuco population. Nevertheless, that polymorphism seems to not be associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia. The allelic and genotypic frequencies of that polymorphism is quite different of others populations.

The polymorphisms G869C and T915C are not associated with susceptibility to infection neither with progression of lesions and the allelic frequencies of that polymorphism not fluctuate so widely as IL-6 polymorphism.

Therefore, -174G/C polymorphism of IL-6 could be used how a gene marker of HPV susceptibility but not how a progression marker in Pernambuco population.

6. Acknowledgments

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES).

7. References

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008,cancer incidence and mortality Worldwide: IARC CancerBase 2010; 10 [Internet] Available from: <<http://globocan.iarc.fr>> Access in January 2012.
- [2] Brasil. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Available from: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>>. Access in: January 2012.
- [3] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–27.
- [4] Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004; 363: 1488-9.
- [5] Wu X, Levine AJ. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3602–6.
- [6] Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003, 31: 35–40.
- [7] Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa O, Hakura A. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 1994, 200(1): 130-9.
- [8] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
- [9] Fishman D, faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369–76.

- [10] de Vita F, Romano C, Orditura M, Galizia G, Martinelli E, Lieto E, Catalano G. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 45–52.
- [11] Tsukamoto T, Kumamoto Y, Miyao N, Masumori N, Takahashi A, Yanase M. Interleukin-6 in renal cell carcinoma. *J Urol* 1992; 148: 1778–82.
- [12] Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, Murai M. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2702–6.
- [13] Kinoshita T, Ito H, Miki C. Serum IL-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal cancer. *Cancer* 1999; 85: 2526–31.
- [14] Gupta S. Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin Immunol* 2000; 20: 229–39.
- [15] Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996; 28: 881-7.
- [16] Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, Luben RN, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Metcalfe JC. A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2610–5.
- [17] Kaklamani VG, Baddi L, Liu J, Rosman D, Phukan S, Bradley C, Hegarty C, McDaniel B, Rademaker A, Oddoux C, Ostrer H, Michel LS, Huang H, Chen Y, Ahsan H, Offit K, Pasche B. Combined genetic assessment of transforming growth factor- β signaling pathway variants may predict breast cancer risk. *Cancer Res* 2005; 65: 3454–61.

- [18] Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene: association with transforming growth factor- β 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014–20.
- [19] Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350–8.
- [20] Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor β in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078–93.
- [21] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117–29.
- [22] Lima Júnior SF, Fernandes MCM, Heráclio SA, Souza PRE, Maia MMD. Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2011; 33(10): 315-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032011001000008>.
- [23] Depboylu C, Lohmuller F, Gocke P, Du Y, Zimmer R, Gasser T, Klockgether T, Dodel RC: An interleukin-6 promoter variant is not associated with an increased risk for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 17: 170–3.
- [24] Wang B, Morinobu A, Kanagawa S, Nakamura T, Kawano S, Koshiba M, Hashimoto H, Kumagai S. Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphism in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Kobe J Med Sci* 2007; 53(1): 15-23.
- [25] Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AS. *Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá 2007.
- [26] Su JL, Lai KP, Chen CA, Yang CY, Chen PS, Chang CC, Chou CH, Hu CL, Kuo ML, Hsieh CY, Wei LH. A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor (gp80) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65: 4827–35.

- [27] Srivani R, Nagarajan B. A prognostic insight on in vivo expression of interleukin-6 in uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 331–9.
- [28] Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001; 72(8): 1444-50.
- [29] Olivieri F, Bonafé M, Cavallone L, Giovagnetti S, Marchegiani F, Cardelli M, Mugianesi E, Giampieri C, Moresi R, Stecconi R, Lisa R, Franceschi C. The -174 C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. *Exp Gerontol* 2002; 37: 309–14.
- [30] Bonafé M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Mayegiani F, Cardelli M, Pieri C, Marra M, Antonicelli R, Lisa R, Rizzo MR, Paolisso G, Monti D, Franceschi C. A gender—dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2357-61.
- [31] Giacconi R, The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Experimental gerontology* 2004; 39(4): 621-8.
- [32] Grimm C, Watrowski R, Baumühlner K, Natter C, Tong D, Wolf A, Zeillinger R, Leodolter S, Reinthaller A, Hefler L. Genetic variations of interleukin-1 and -6 genes and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology* 2011; 121: 537–41.
- [33] Nogueira de Souza NC, Brenna SM, Campos F, Syrjanen KJ, Baracat EC, Silva ID. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1278–82.
- [34] The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-96.
- [35] Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 444–461.

- [36] Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350–8.
- [37] Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor β in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078–93.
- [38] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117–29.
- [39] Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer - a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 44–51.
- [40] Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol* 2004; 16: 107–17.
- [41] Wang Q, Zhang C, Walayat S, Chen HW, Wang Y. Association between cytokine gene polymorphisms and cervical cancer in a Chinese population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 158: 330–3.
- [42] Stanczuk GA, Tswana SA, Bergstrom S, Sibanda EN. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix *Eur J Immunogenet* 2002; 29: 417–21.
- [43] Guan X, Sturgis EM, Lei D, Liu Z, Dahlstrom KR, Wei Q, Li G. Association of TGF- β 1 Genetic Variants with HPV16-positive Oropharyngeal Cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1416-22.
- [44] Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB. Lack of association of transforming growth factor-beta 1 polymorphisms and haplotypes with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1303–5.
- [45] Stanczuk GA, Tswana SA, Bergstrom S, Sibanda EN. Polymorphism in codon 10 and 25 of the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Immunogenet* 2002; 29: 417–21.

- [46] Li Z, Habuchi T, Tsuchiya N, Mitsumori K, Wang L, Ohyama C, Sato K, Kamoto T, Ogawa O, Kato T. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor beta 1 gene polymorphism at codon 10. *Carcinogenesis* 2004; 25: 237–40.
- [47] Kang HG, Chae MH, Park JM, Kim EJ, Park JH, Kam S, Cha SI, Kim CH, Park RW, Park SH, Kim YL, Kim IS, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer. *Lung cancer* 2006; 52: 1–7.
- [48] Wei YS, Xu QQ, Wang CF, Pan Y, Liang F, Long XK. Genetic variation in transforming growth factor-beta 1 gene associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2007, 70: 464–9.
- [49] Gaur P, Mittal M, Mohanti BK, Das SN. Functional genetic variants of TGF-b1 and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk Asian Indians. *Oral Oncology* 2011; 47: 1117–21.

Tables

Table 1. Genotypic and allelic frequencies of T869C polymorphism of TGF- β 1 gene (rs1982073) in women with cervical intraepithelial lesion and health controls.

	Controls	Cases	p-Value	CIN I	CIN II	CIN III	p-Value
GENOTYPES							
TT	40	42		12	14	16	
TC	59	56		10	20	25	
CC	16	17	p=0.9252	2	7	7	p=0.6532
TT	40	42		12	14	16	
TC+CC	75	73	p=0.4453	12	27	32	p=0.3569
ALLELES							
T	139	137		34	48	57	
C	91	93	p=0.9242	14	34	39	p=0.3177

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of G915C polymorphism of TGF- β 1 gene (rs1800471) in women with cervical intraepithelial lesion and health controls.

	Controls	Cases	p-Value	CIN I	CIN II	CIN III	p-Value
GENOTYPES							
GG	104	108		22	38	46	
GC	11	7		2	3	2	
CC	0	0	p=1.0000	0	0	0	p=1.0000
GG	104	108		22	38	46	
GC+CC	11	7	p=0.2312	2	3	2	p=0.7496
ALLELES							
T	219	223		52	88	82	
C	11	7	p=0.4697	2	4	2	p=0.7810

Table 3. Haplotype frequencies estimation of T869C (rs1982073) and G915C (rs1800471) polymorphisms of TGF- β 1 gene.

T869C	G915C	Control Group	Patients Group	p-value
T	G	0.5969	0.615	p=1.000
C	G	0.3509	0.354	
C	C	0.0447	0.031	
T	C	0.0075	0	

Table 4. Genotypic and allelic frequencies of -174G/C polymorphism of IL-6 gene (rs1800795) in women with cervical intraepithelial lesion and health controls.

	Controls	Cases	p-Value	CIN I	CIN II	CIN III	p-Value
GENOTYPES							
GG	67	72		15	21	33	
GC	37	39		7	17	15	
CC	11	4	p=0.1690	1	2	1	p=0.6852
GG + GC	104	111		22	38	48	
CC	11	4	p=0.0532	1	1	1	p=0.8895
ALLELES							
G	171	183		37	59	81	
C	59	47	p=0.1116	9	21	17	p=0.3369

Table 5. Comparison of genotypic and allelic frequencies of the polymorphism of IL-6 gene (rs1800795) between population of Pernambuco, São Paulo, Austria and the populations studied by HapMap project.

	GENOTYPES				ALLELES		
	CC	GC	GG	p-Value	C	G	p-Value
POPULATIONS							
PER	11	37	67		59	171	
SPA	3	102	148	p=0.0008	108	398	p=0.0629
AUS	27	96	85	p=0.0114	150	266	p=0.0082
ASW	0	11	46	p=0.0011	111	103	p=<0.0001
CEU	36	49	28	p=<0.0001	121	105	p=<0.0001
CHD	0	1	108	p=<0.0001	1	217	p=<0.0001
GIH	1	24	76	p=0.0026	26	176	p=0.0011
MEX	0	20	38	p=0.0107	20	96	p=0.0990
MKK	0	15	141	p=<0.0001	15	297	p=<0.0001
TSI	15	44	43	p=0.0595	74	130	p=0.0220

PER: Pernambucanos, Brazil

SPA: São Paulo, Brazil

ASW: African ancestry in Southwest USA

CEU: Utah residents with Northern and Western European ancestry

CHB: Han Chinese in Beijing, China

CHD: Chinese in Metropolitan Denver, Colorado - EUA

GIH: Gujarati Indians in Houston, Texas - EUA

JPT: Japanese in Tokyo, Japan

LWK: Luhya em Webuye, Kenya

MEX: Mexican ancestry in Los Angeles, California - EUA

MKK: Maasai in Kinyawa, Kenya

TSI: Tuscan in Italy

YRI: Yoruban in Ibadan, Nigeria

Table 6. Allelic frequencies of T869C (rs1982073) and G915C (rs1800471) polymorphisms of TGF- β 1 gene in different ethnic groups.

Ethnic population	T869C		G915C		References
	Frequency	Frequency	Frequency	Frequency	
	of allele T	of allele C	of allele G	of allele C	
Caucasians	0.62	0.38	0.93	0.07	44
African	0.56	0.44	0.93	0.07	44
Americans					
South	0.72	0.28	0.86	0.14	45
African					
Japanese	0.46	0.54	-	-	46
Korean	0.49	0.51	-	-	47
Chinese	0.53	0.47	-	-	48
Asian	0.75	0.25	0.68	0.32	49
Indians					
Brazilian	0.6	0.4	0.95	0.05	(present study)