



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DOS POLIMORFISMOS G894T E ÍNTRON VNTR 4b/a
DO GENE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS)
NA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO E NA
LESÃO INTRAEPITELIAL CERVICAL**

Aluna: Joana D'arc Rozendo dos Santos

Orientadora: Prof^a. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife, 2016

JOANA D'ARC ROZENDO DOS SANTOS

**EFEITO DOS POLIMORFISMOS G894T E ÍNTRON VNTR 4b/a DO GENE
DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) NA INFECÇÃO
PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO E NA LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife, 2016

Catálogo na fonte

Elaine Barroso
CRB 1728

1

2 Santos, Joana D'arc Rozendo dos

3 Efeito dos polimorfismos G894T e íntron VNTR 4b/a do gene do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na infecção pelo Papilomavírus Humano e na lesão intraepitelial cervical. / Joana D'arc Rozendo dos Santos- Recife: O Autor, 2016.

79 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

4 Inclui referências e anexos

1. Colo uterino- câncer 2. Papilomavírus 3. Polimorfismo (genética)

I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (orient.) II. Título

5

6 616.99466

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-389

Universidade Federal de Pernambuco

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

JOANA D' ARC ROZENDO DOS SANTOS

**EFEITO DOS POLIMORFISMOS G894T E ÍNTRON VNTR 4b/a DO GENE
DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS) NA INFECÇÃO
PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO E NA LESÃO INTRAEPITELIAL
CERVICAL**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **JOANA D'ARC ROZENDO DOS SANTOS** como:

Aprovada

Recife, 26 de fevereiro de 2016.

Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Departamento de Bioquímica, UFPE

Orientadora – Membro interno

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Departamento de Genética, UFPE

Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Departamento de Bioquímica, UFPE

Membro Externo

“A mesma rocha que bloqueia o caminho poderá funcionar como um degrau.”

(Osho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus minha fonte de luz, paz e sabedoria.

Aos meus pais Kaly e Manoel pelo amor, total dedicação e presença em todos os momentos. Sempre prezando pelo meu bem-estar e desenvolvimento.

Ao meu irmão João Antônio pelo carinho e por me trazer responsabilidade de ser mais velha e servir como exemplo.

À minha orientadora Prof^a. Danyelly Bruneska por ser uma excelente guia em minha vida acadêmica, me acolher em sua equipe e me motivar a exercer minha vocação. Por ensinar, principalmente, com as próprias atitudes, o segredo do sucesso.

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho e compreensão. Em especial à minha avó Luzinete e minhas primas Rayana e Lorena.

Às minhas queridas amigas Ana Cláudia e Patrícia pelo apoio nos momentos mais críticos. Aos meus amigos Vanessa e Rômulo pela amizade que me dedicaram.

Aos amigos do Laboratório ProspecMol Sandra, Thaysa, Romério Amélia, Renato, Andriu, Fátima, Cecília, pelo estímulo, ajuda e descontração.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular do LIKA por disponibilizar a estrutura.

Aos que constituem o LIKA e o PPGCB Prof. José Luiz, Prof^a. Maria da Paz, Prof^a Rosângela Frade, Carolina, Roberto, Iasmin, Ilma, Conceição, Moisés, Sr. Otaviano, Vera, Edson e Adenilda pela atenção e auxílio sempre que solicitado.

Aos amigos que fiz durante a jornada de graduação Priscilla Marcelino, Isabela, Luiz Arthur, Alex, Maíra, Úrsula, Mariana Barros, Mariana Cavalcanti, Daílo, Jullyanne, Renata, Marcelle, Bernardo, Raíssa, Eduardo e Bárbara pelo companheirismo, troca de ideias, informações e sentimentos que foram muito importantes para o meu crescimento.

Às pacientes que concederam suas amostras biológicas.

A CAPES pelo suporte financeiro

RESUMO

O câncer de colo do útero, o quarto tipo mais comum entre as mulheres brasileiras, é precedido por lesões epiteliais, classificadas como neoplasia intraepitelial cervical (CIN) de grau I, II, ou III, normalmente associadas com infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV). Porém, os elementos envolvidos no prognóstico da infecção por HPV ainda estão pouco esclarecidos. O óxido nítrico (NO), um gás solúvel envolvido em processos de vasodilatação, neurotransmissão e imunidade, é produzido a partir da ação de 3 isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo a endotelial (eNOS) uma das moléculas envolvidas com o câncer. No entanto, investigações sobre o efeito de mutação na eNOS no câncer ainda geram resultados conflitantes, com poucos estudos relacionando essas diferenças genéticas com CIN ou câncer cervical. No presente estudo, os polimorfismos 894G>T e VNTR 4b4/a forma investigados por PCR em amostras de mulheres atendidas em USFs de Olinda – PE. Os dados foram correlacionados com os aspectos de citologia oncótica, infecção por HPV, assim como genótipos de HPV de alto risco. Amostras de DNA de sangue de 94 pacientes atendidas em unidades de atenção primária foram avaliadas, e os dados analisados em relação ao tipo de lesão cervical para determinar o efeito do polimorfismo da eNOS na susceptibilidade à infecção por HPV. A distribuição dos polimorfismos de eNOS 894G>T e VNTR 4b/a apresentou maior frequência para os genótipos G/G (64,9%) e 4b/4b (67%), respectivamente. Apenas genótipo eNOS 894 T/T poderia estar associado à lesão cervical ($p=0,0018$), enquanto o genótipo VNTR 4a/4a não foi encontrado nesta população. Não houve associação entre os polimorfismos de eNOS com a infecção pelo HPV, HPV de alto risco ou vaginose bacteriana. No entanto, o haplótipo G/T+4a/4b apresentou OR de 5,3 para vaginose bacteriana (95% CI 0.76-37.1), enquanto T/T+4b/4a mostrou OR de 5,0 para infecção por HPV (95% CI 0.11-220) e para 1,8 lesões cervicais (95% CI 0.04-79.5). A combinação dos alelos T+4a apresentaram valores de OR para infecção por HPV de 3,0 (95% CI 0.07-115) e lesões cervicais 1,29 (95% CI 0.03-53.6). Os resultados indicam polimorfismos na eNOS podem influenciar na resposta imunológica do organismo contra o HPV e no surgimento das lesões cervicais. Estudos adicionais serão necessários para confirmar o papel polimorfismos da eNOS na evolução das lesões cervicais para o câncer.

Palavras-chave: Polimorfismos de eNOS, infecção por HPV, lesão cervical.

ABSTRACT

The cervical cancer, the fourth most common type among Brazilian women is preceded by lesions in the epithelium cervical intraepithelial neoplasia (CIN), usually associated with genital human papillomavirus (HPV). However, the elements involved in HPV infection of prognosis are still poorly understood. Nitric oxide (NO) is a soluble gas processes involved in vasodilation, neurotransmission and immunity. NO is produced from 3 isoforms of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and endothelial (eNOS) of the molecules involved in cancer. However, investigations of the mutation effect on eNOS in cancer also generate conflicting results, with few studies linking these genetic differences with cervical cancer. In the present study, a panel involving molecules associated with eNOS and signaling pathways related to eNOS was designed, highlighting 5 stimulatory molecules production eNOS, 4 and 38 signaling pathways related molecules eNOS. DNA from blood samples of 94 patients with and without cervical intraepithelial lesion were analyzed for the presence of two polymorphisms in the eNOS gene, G894T and intron 4VNTR (4a/b). The distribution of eNOS 894G>T and VNTR 4b/a polymorphisms showed higher frequency of G/G (64.9%) and 4b/4b (67%) genotypes. No VNTR 4a/4a genotype was found in this population. Only eNOS 894 T/T genotype may be associated with cervical lesions ($p = 0.0018$). There was no association between polymorphisms of eNOS with HPV infection, high risk HPV or bacterial vaginosis. However, the haplotype G/T + 4a/4b showed an OR of 5.3 for bacterial vaginosis (95% CI 0.76-37.1), while T/T + 4b/4a showed an OR of 5.0 to HPV infection (95 % CI 0.11-220) and 1.8 cervical lesions (95% CI 0.04-79.5). The combination of T + 4a alleles presented OR values for HPV infection of 3.0 (95% CI 0.07-115) and cervical lesions 1.29 (95% CI 0.03-53.6). The genotype 894 T/T associated with the genotype VNTR 4b/4a can be related to HPV infection. And more studies are needed to confirm the role of eNOS polymorphism in cervical lesions.

Keywords: eNOS polymorphism, HPV infection, cervical lesions.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura	Legenda	Pág
Figura 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.	21
Figura 2	Consequências possíveis da infecção por HPV. A progressão é associada à integração do vírus e à aquisição de mutações adicionais.	22
Figura 3	Desenvolvimento da zona de transformação cervical.	23
Figura 4	Espectro da CIN, com epitélio escamoso normal para comparação: CIN I com atipia coilocitótica; CIN II com atipia progressiva em todas as camadas do epitélio; CIN III (carcinoma <i>in situ</i>) com atipia difusa e perda de maturação.	24
Figura 5	Características citológicas de CIN em exame de Papanicolau. Células escamosas superficiais podem corar em vermelho ou azul. A , Células epiteliais escamosas superficiais normais esfoliadas. B , CIN I—LSIL C e D , CINII e CIN III, respectivamente — HSIL.	25
Figura 6	Análise filogenética com base nas sequências L1 de mais de 170 tipos de HPV, bem como vírus de papiloma em animais individuais, utilizando o método de probabilidade máxima.	26
Figura 7	Expressão do HPV e suas proteínas após a infecção no epitélio escamoso. Células filhas de células-tronco epiteliais dividem-se ao longo da membrana basal e amadurecem verticalmente através do epitélio, sem mais divisão (lado direito). Após a introdução do HPV em células tronco da camada basal do epitélio, ocorre expressão de proteínas não virais. As proteínas virais são expressas sequencialmente com diferenciação como mostrado, e os viriões	28

maduros são produzidos apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. Células apresentadoras de antígeno intraepitelial (APCs) estão esgotadas no epitélio infectadas com o HPV.

Figura 8 **a.** A proteína E2 do HPV serve como um repressor transcricional para seus genes E6 e E7. **b.** Integração do DNA do HPV no genômado hospedeiro interrompe o gene E2, permitindo a produção de E6 e E7, proteínas que, respectivamente, inibem as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb. **29**

Figura 9 Representação gráfica dos lados “yin” e “yang” da inflamação aguda. O esquema descreve dois lados firmemente controlados e biologicamente opostos de autoencerramento da resposta inflamatória aguda. Estímulos induzem a ativação de células do sistema imunológico inato e/ou adaptativo pela expressão de fatores de morte celular em “yin” (apoptose, supressão do crescimento), processos para destruir elementos estranhos e tecido lesado; enquanto “yang”, simultaneamente, produz fatores de crescimento (cicatrização de feridas, promoção do crescimento) para terminar e resolver a inflamação. Os processos “yin” e “yang” estão intimamente facilitados pela ativação de uma resposta vascular, expressão de mediadores apoptóticos e cicatrização de feridas. **32**

Figura 10 Polimorfismos de eNOS analisados neste estudo. **37**

Figura 11 Biossíntese de NO e mecanismo de ação. NO pode ser produzido por três tipos de óxido nítrico síntase nNOS, eNOS e iNOS que catalisam a oxidação de L-arginina para L-citrulina. NO ativa a enzima guanilatociclase (GC) para aumentar a produção de cGMP, que tem efeitos de sinalização em cadeia. **38**

Figura 12 .Mecanismos funcionais dos polimorfismos de eNOS . **39**

LISTA DE TABELAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Tabela	Legenda	Pág
Tabela 1	Tipos de HPV de acordo com o risco oncogênico.	27

LISTA DE QUADROS

Quadro	Legenda	Pág
Quadro 1	Exemplos de alterações moleculares, celulares e teciduais observadas na inflamação crônica e com consequente promoção tumoral.	33

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Fig	Legenda	Pág
Fig 1	Endothelial growth factor (VEGF), bradykinin (BK), the shear stress and epidermal growth factor (EGF) promote the production of NO by sequential activation of signaling pathways in endothelial cells. Therefore, it appears that the increase in eNOS activity promotes tumor progression, since VEGF is activated and angiogenesis is induced; BK and shear stress induce the cell cycle and EGF signaling increases the synthesis of proteins for cell growth.	70

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Tabela	Legenda	Pág
Table 1	Socio-demographic and clinical profile of 94 patients enrolled in the study.	71
Table 2	eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles according to the cytopathology findings.	73
Table 3	eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles, according to the presence of HPV-DNA in cervical samples.	74
Table 4	eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles, according to the HPV genotyping.	75
Table 5	eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles, according to the presence of bacterial vaginosis .	76
Table 6	eNOS 894G>T and VNTR 4b/4a polymorphisms combination according to cervical infection and lesions.	77

LISTA DE ABREVIACÕES

BH4- Tetrahidrobiopterina 4

BK- Bradykinin

CC- Câncer Cervical

cGMP- Monofosfato Cíclico de Guanosina

CIN- Neoplasia Intraepitelial Cervical

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EGF - Epidermal growth factor

eNOS- Óxido Nítrico Sintase Endotelial

GC- Guanilato Ciclase

HPSP90- proteína de choque térmico 90

HPV- Papilomavírus Humano

HSIL- Lesão intraepitelial de alto grau

IFN- Interferon

IL- Interleucina

iNOS- Óxido nítrico sintase indutível

LSIL- Lesão intraepitelial de baixo grau

NK- Natural Killer

nNOS- Óxido nítrico sintase neuronal

NO- Óxido nítrico

NOS- Óxido nítrico sintase neuronal

PRR- Receptores de Reconhecimento de Padrões

RNA- Ácido Ribonucleico

RNS-Espécies reativas de nitrogênio

ROS-Espécies reativas de oxigênio

SI- Sistema Imune

SNP-Polimorfismo de nucleotídeo único

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento Beta

TH 1- T Helper do tipo 1

TNF- Fator de Necrose Tumoral

VEGF- Endothelial growth factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.2. Câncer Cervical	20
2.2. Histopatologia	21
2.3 Etiologia- HPV	24
2.4 Cofatores na infecção por HPV	29
2.5 Sistema Imune e infecção por HPV (SI)	29
2.5.1 <i>Inflamação permite o desenvolvimento do tumor</i>	29
2.5.2 <i>Inflamação e a carcinogênese</i>	30
2.5.3 <i>Resposta imune nas lesões intraepiteliais cervicais.....</i>	32
2.6 Óxido Nítrico e eNOS	35
2.7 Marcadores moleculares	39
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
4 OBJETIVOS	54
4.1 Geral	54
4.2 Específicos.....	54
5 ARTIGO: ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORPHISM ON CYTOLOGICAL ABNORMALITY DEVELOPMENT IN A BRAZILIAN POPULATION	55
6 CONCLUSÃO.....	75
ANEXO I	76
ANEXO II	77
ANEXO III.....	78

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2012 houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo (IARC, *International Agency for Research on Cancer*). Nos países em desenvolvimento, os três tipos de câncer mais frequentes em homens foram pulmão, próstata e intestino; e mama, intestino, pulmão e colo do útero nas mulheres (INCA, 2016).

O Câncer cervical é precedido por lesões bem definidas no epitélio conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Essas lesões estão associadas com infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV). A maioria das infecções genitais pelo HPV são clinicamente indetectáveis e não resultam em CIN ou câncer (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Clinicamente, os vírus têm sido subdivididos entre grupos de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 44) e de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33) (REAL; ALMEIDA; MARTINS, 2010).

Células do sistema imune utilizam óxido nítrico (NO) como arma citotóxica ou citostática na destruição de patógenos e células tumorais, sendo um mecanismo importante na imunidade não específica (SINGH *et al.*, 2011). Também participa da respiração e migração celular (KORDE CHOUDHARI *et al.*, 2013). O NO é um radical livre que exerce vários efeitos protetores para manter regulação cardiovascular e hemostasia, como relaxamento endotélio-dependente, ação anti-inflamatória e antitrombótica (MANGIAPANE, 2012).

O NO pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de algumas doenças virais, como também apresentou efeitos antivirais (AKAIKE e MAEDA, 2000). Portanto, NO tem um papel complexo na resposta imunológica do hospedeiro contra vírus. NO também tem sido considerado um agente citotóxico e promotor de crescimento tumoral. Os efeitos citotóxicos envolvem dano direto sobre o DNA e inibição de enzimas envolvidas na síntese de ácidos nucleicos. Por outro lado, o NO pode favorecer o crescimento e disseminação tumoral através da promoção da angiogênese (BRENNAN *et al.*, 1999).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três tipos diferentes de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), que se expressam de duas maneiras: a eNOS e a nNOS são expressas constitutivamente em níveis baixos e podem ser ativadas rapidamente pelo aumento do cálcio intracelular. A iNOS é induzida quando os macrófagos e outras células são ativados pelas citocinas ou outros agentes e seus

efeitos são por tempo prolongado (KUMAR *et al.*, 2005). Recentemente, demonstrou-se que o polimorfismos T-786C, G894T e íntron VNTR 4b/a estão associados com o desenvolvimento e características clínicas do câncer de próstata (SAFARINEJAD *et al.*, 2013).

Com exceção do câncer de pele, o câncer cervical é o que apresenta maior potencial de prevenção e cura, quando diagnosticado precocemente. Atualmente, teste citopatológico convencional, Papanicolau, é a principal estratégia de programas de rastreamento do câncer do colo do útero no mundo (INCA, 2014).

O rastreio com citologia tornou-se um componente bem estabelecido de cuidados preventivos padrão em países mais desenvolvidos (YABROFF *et al.*, 2009; SARAIYA *et al.*, 2010). Vários esforços se concentraram em melhorar a precisão e custo eficácia dos protocolos de rastreio baseado na citologia (SCHIFFMAN *et al.*, 2011). No entanto, as taxas de falso-negativos associados à citologia continuam a ser substanciais, principalmente pelo fato da detecção citológica ainda depender da identificação visual e interpretação subjetiva de alterações morfológicas induzidas por HPVs carcinogênicos (SIEBERS *et al.*, 2009).

A investigação de marcadores moleculares pode contribuir de forma significativa na prevenção. Por utilizar métodos sensíveis e específicos, podem diagnosticar a doença de maneira precisa e precoce.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2. CÂNCER CERVICAL

Com base no documento *World Cancer Report 2014* da *International Agency for Research on Cancer* (Iarc), da Organização Mundial da Saúde (OMS), é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2016).

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (figura 1) (INCA, 2016).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2016).

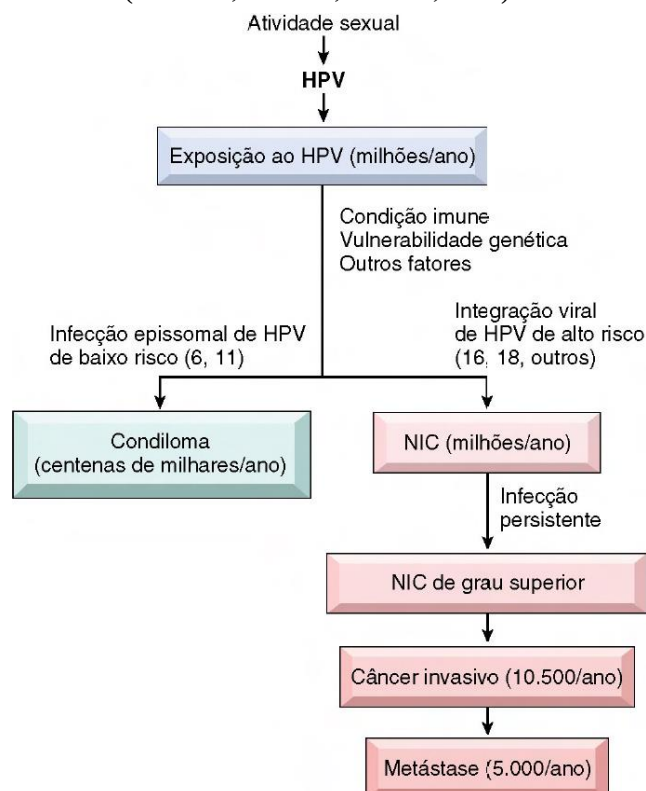
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	14.290	27,1%		Homens	Mama Feminina	11.190	20,5%
Estômago	2.940	5,6%			Colo do Útero	5.630	10,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.690	5,1%			Cólon e Reto	2.530	4,6%
Cólon e Reto	1.940	3,7%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.100	3,9%
Cavidade Oral	1.880	3,6%			Estômago	1.940	3,6%
Laringe	1.430	2,7%			Glândula Tireoide	1.810	3,3%
Esôfago	1.340	2,5%			Ovário	1.420	2,6%
Sistema Nervoso Central	1.260	2,4%			Corpo do Útero	1.320	2,4%
Leucemias	1.210	2,3%			Cavidade Oral	1.190	2,2%
Linfoma não Hodgkin	1.010	1,9%			Leucemias	1.070	2,0%

*Números arredondados para múltiplos de 10

Estima-se que 75% das mulheres sexualmente ativas adquirem infecção por HPV em algum momento, mas na maioria das vezes a infecção regride espontaneamente em 1 a 2 anos. A persistência desta infecção, fator central para a progressão das CIN, parece aumentar com a idade

(CASTLE *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ *et al.*, 2010), o que poderia atribuir a uma eventual CIN 1 ou CIN 2 maior chance de progressão para CIN 3 ou câncer invasivo (figura 2).

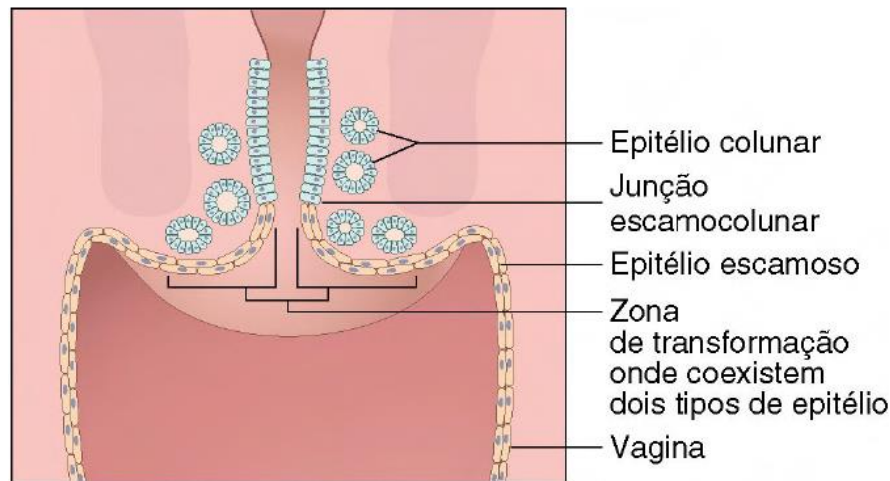
Figura 2. Consequências possíveis da infecção por HPV. A progressão é associada à integração do vírus e à aquisição de mutações adicionais (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).



2.2. HISTOPATOLOGIA

As lesões cervicais são, geralmente, provenientes de inflamações relativamente frequentes (cervicites). Durante o desenvolvimento, o epitélio colunar mucossecrator da endocérvice é unido à cobertura epitelial escamosa da ectocérvice na abertura do colo do útero. Com o início da puberdade, a junção escamo-colunar sofre eversão, tornando o epitélio colunar visível na ectocérvice. As células colunares expostas, no entanto, subsequentemente sofrem metaplasia escamosa, formando uma região chamada zona de transformação (Figura 3) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

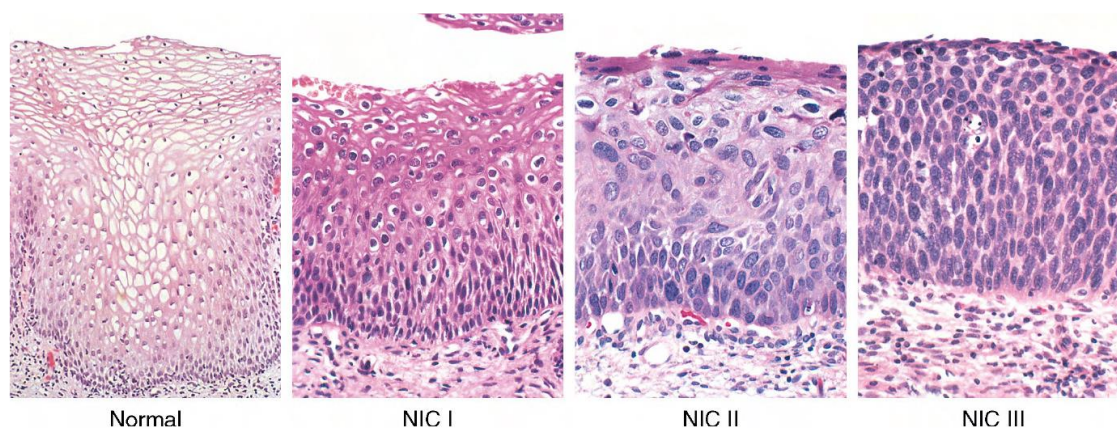
Figura 3. Desenvolvimento da zona de transformação cervical (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).



A carcinogênese relacionada com o HPV começa com alteração pré-cancerosa epitelial, CIN, que geralmente precede o desenvolvimento de um câncer evidente por muitos anos, por vezes décadas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Para lesões intraepiteliais escamosas, o Sistema Bethesda de 1988 introduziu uma terminologia de dois níveis, lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), para relatar o espectro de anomalias cervicais escamosas não-invasivas. Após a conferência Bethesda 2001, a terminologia LSIL/HSIL permaneceu (SOLOMON *et al.*, 2002). Em termos gerais, **LSIL** corresponde a uma combinação das categorias de CIN 1 e alterações relacionadas com HPV sem CIN, e **HSIL** representa CIN 2 e 3 (Figura 4) (HERRINGTON, 2015).

Para examinar o trato genital inferior e o colo do útero, é realizada a colposcopia, exame do por meio de um colposcópio com uma fonte de luz. A zona de junção escamocolumnar e transformação devem ser identificadas; isto determina se o exame foi satisfatório ou não. O ácido acético é então utilizado para avaliar o tamanho, a forma, a margem e localização de qualquer lesão neoplásica. Estes resultados podem ser descritos de acordo com a nomenclatura da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (BORNSTEIN *et al.*, 2012).

Figura 4. Espectro da CIN, com epitélio escamoso normal para comparação: CIN I com atipia coilocitótica; CIN II com atipia progressiva em todas as camadas do epitélio; CIN III (carcinoma *in situ*) com atipia difusa e perda de maturação (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).



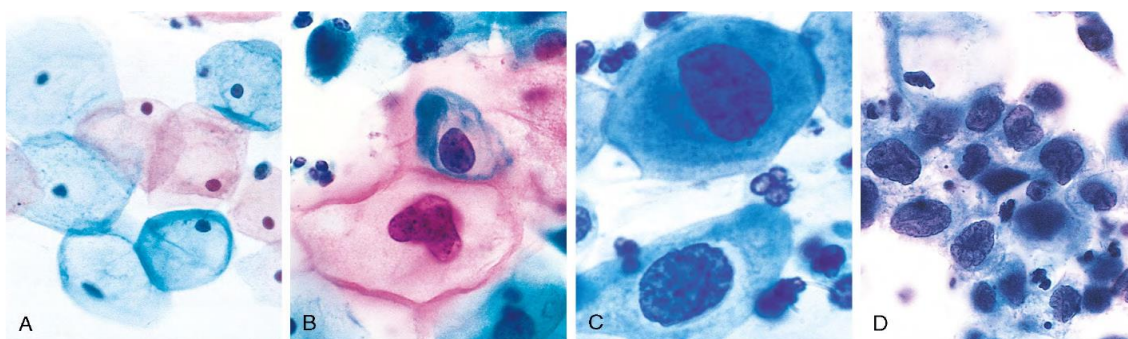
Quando alguma lesão é identificada, é indicado que sejam obtidas pelo menos duas amostras através de biópsia para melhorar a precisão da colposcopia. A biópsia deve ser realizada e espécimes retirados da área mais grave encontrada no exame colposcópico para confirmar ou descartar lesões malignas (GAGE et al, 2006; ZUCHNA ET AL, 2010)

Citologia foi introduzida no início de 1950 como um método de rastreamento primário, parte dos exames preventivos anuais. Mesmo que nunca tenha sido objeto de uma avaliação de eficácia em ensaios clínicos randomizados, as taxas de incidência de câncer cervical diminuíram na América do Norte, Europa e Austrália, o que forneceu uma prova amplamente aceita sobre a eficácia da citologia como uma maneira de triagem (SOLOMON *et al.*, 2007). O rastreamento com citologia tornou-se um componente bem estabelecido de cuidados preventivos padrão em países mais desenvolvidos (YABROFF *et al.*, 2009; SARAIYA *et al.*, 2010).

De fato, mais da metade dos casos incidentes de câncer cervical nos EUA continuam a ocorrer em mulheres que nunca ou raramente foram rastreadas (TANGKA *et al.*, 2006). Embora a sensibilidade clínica de um único esfregaço de Papanicolau seja modesta (60-70%) (NANDA *et al.*, 200; CONG *et al.*, 2007), o sucesso de rastreamento baseado na citologia é obtido por meio de testes de Papanicolau frequentemente repetidos, o que é bastante dispendioso (MYERS *et al.*, 2000; MACDONALD *et al.*, 2008). Vários esforços se concentraram em melhorar a precisão e custo eficácia dos protocolos de rastreamento baseado na citologia (SCHIFFMAN *et al.*, 2011).

A introdução do líquido baseado em citologia diminuiu a proporção de lâminas inadequadas e permitiu o teste de reflexo para outros marcadores moleculares (SIEBERS *et al.*, 2009; KULASINGAM *et al.*, 2002). No entanto, as taxas de falso-negativos associados à citologia continuam a ser substanciais, principalmente pelo fato da detecção citológica ainda depender da identificação visual e interpretação subjetiva de alterações morfológicas induzidas por HPV's carcinogênicos (Figura 5) (SIEBERS *et al.*, 2009).

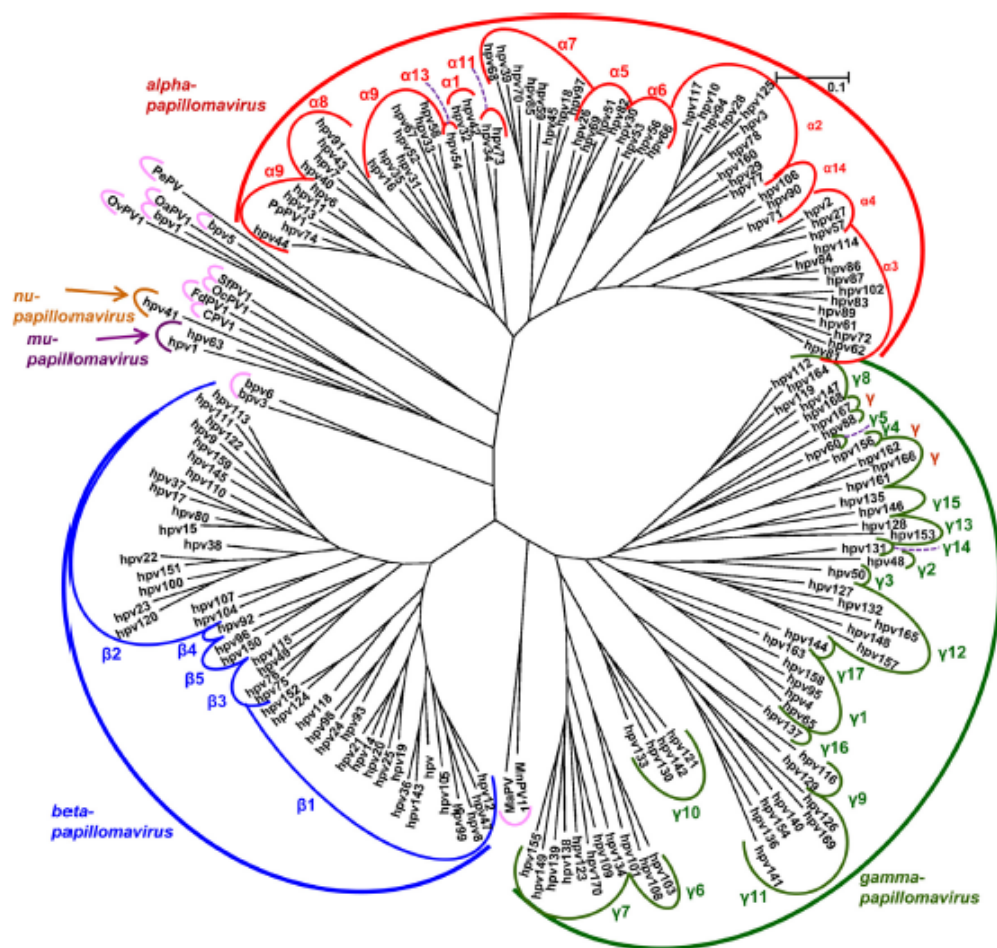
Figura 5. Características citológicas da CIN em exame de Papanicolau. Células escamosas superficiais podem se corar em vermelho ou azul. **A**, Células epiteliais escamosas superficiais normais esfoliadas. **B**, CIN I— LSIL. **C e D**, CIN-II e CIN-III, respectivamente — HSIL (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).



2.3 ETIOLOGIA- HPV

Filogeneticamente, os HPV que infectam humanos estão classificados dentro dos gêneros alfa-, beta-, gama-, mu- e nu-papilomavírus (Figura 6). São divididos em subgrupos que infectam a mucosa e os vírus individuais são designados de alto e baixo risco oncogênico (tabela 1), de acordo com a propensão das células infectadas à progressão maligna (DE VILLIERS, 2013). Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados; cerca de 40 destes infectam o trato genital feminino (GARCÍA-ESPINOSA *et al.*, 2012).

Figura 6. Análise filogenética com base nas sequências L1 de mais de 170 tipos de HPV, bem como vírus de papiloma em animais individuais, utilizando o método de probabilidade máxima (DEVILLIERS, 2013).



O gênero de maior importância clínica é o alfa-papilomavírus, no qual se destacam as espécies 9, 7 e 10, que incluem respectivamente os tipos oncogênicos 16 (espécie 9), 18 (espécie 7), e os tipos não oncogênicos 6 e 11 (espécie 10) (DE VILLIERS, 2013).

O pico de frequência da infecção por HPV ocorre na adolescência e início da idade adulta. A frequência das infecções por HPV incidentes declina progressivamente com a idade. Infecção por HPV persiste em 5%-15% das mulheres infectadas, enquanto que 85%-90% das infecções tornam-se indetectáveis no prazo de dois anos. Aquelas com infecção persistente por HPV de alto risco (HPV 16 e 18) representam 70%-75% dos casos de câncer do colo do útero em todo o mundo (IARC, 2015; MOSCICKI *et al.*, 2012).

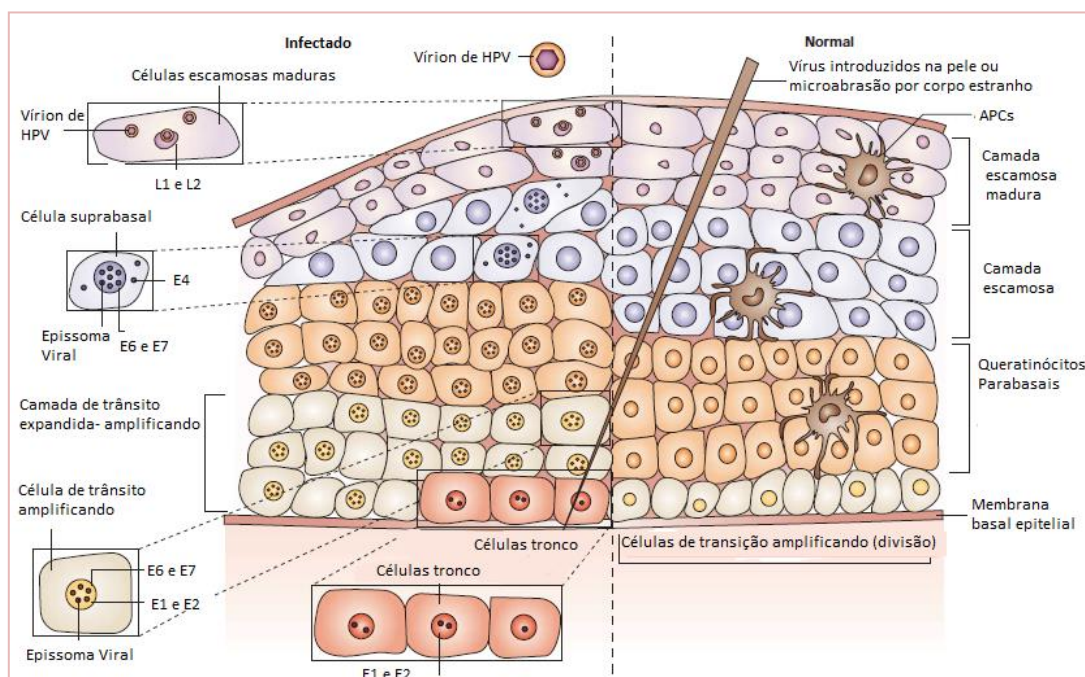
Tabela 1. Tipos de HPV de acordo com o risco oncogênico (REAL; ALMEIDA; MARTINS, 2010).

Risco oncogênico	HPV
Baixo	-6, -11, -13, -40, -42, -43, -44, -54, -55, -61, -70, -72, -81, -89.
Indeterminado	-30, -32, -34, -64, -62, -67, -69, -71, -74, -83, -84, -85, -86, -87, -90, -91, -97, -102, -106.
Provável Alto Risco	-26, -53, -66, -68, -73, e -82.
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68.

A infecção inicial por HPV requer acesso de partículas virais às células da camada proliferativa basal através de uma microfissura no epitélio cervical. Após a infecção, acredita-se que o vírus mantenha seu genoma com um baixo número de cópias sob a forma episomal nas células da camada proliferativa basal, principalmente em células de reserva presentes em áreas de metaplasia (Figura 7) (DOORBAR *et al.*, 2005).

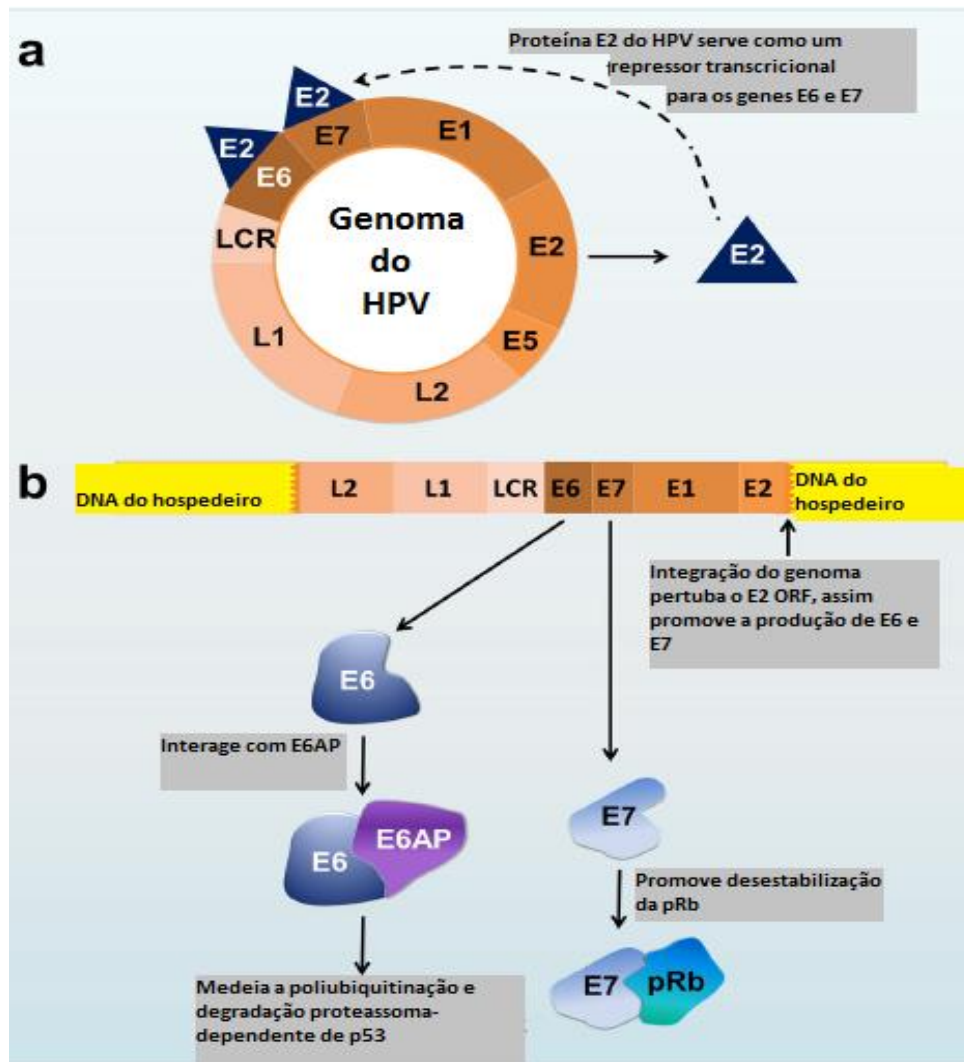
O HPV é um pequeno vírus de DNA sem envelope, de 55 nm de diâmetro (MU; CASTELLSAGU; GONZ, 2006; ROS; SCHMITT, 2008). O genoma de HPV possui cerca de 8 kb em tamanho, onde contém três regiões funcionais, região precoce (~4 kb), região tardia (~3 kb) e região longa de controle (LCR) (~1kb) (NGUYEN; PETER; RADY, 2014). A região precoce, como o nome indica, compreende genes expressos precocemente no ciclo de vida do HPV. Existem seis genes localizados na região precoce (E1, E2, E4, E5, E6, e E7), expressos logo após a entrada de HPV na célula hospedeira, o que resulta na replicação do DNA viral como um episoma. A região tardia, por outro lado, contém dois genes (L1 e L2), que codificam proteínas necessárias para as funções virais tardias, tais como a formação da capsídeo viral antes da liberação de vírions de HPV a partir da superfície de células infectadas. A LCR, que se encontra entre as regiões precoces e tardias, é uma região não codificante que contém elementos que desempenham papéis importantes na regulação replicação e transcrição de genoma de HPV (MISTRY; SIMONSSON; EVANDER, 2007).

Figura 7. Expressão do HPV e suas proteínas após a infecção no epitélio escamoso. Células filhas de células-tronco epiteliais dividem-se ao longo da membrana basal e amadurecem verticalmente através do epitélio, sem mais divisão (lado direito). Após a introdução do HPV em células tronco da camada basal do epitélio, ocorre expressão de proteínas não virais. As proteínas virais são expressas sequencialmente com diferenciação como mostrado, e os viriões maduros são produzidos apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. Células apresentadoras de antígeno (APCs) estão esgotadas no epitélio infectado com o HPV (adaptado de FRAZER, 2004).



Sob condições normais, a proteína E2 de HPV serve como um repressor da transcrição de genes E6 e E7 em queratinócitos humanos infectados (MCBRIDE, 2013) (Figura 8a). A integração do genoma viral no genoma do hospedeiro representa um importante acontecimento que leva a carcinogênese cervical, por provocar perturbações no gene E2 e suprimir sua produção (Figura 8b). Isto leva a transcrição desregulada dos genes E6 e E7, produzindo suas respectivas oncoproteínas, E6 e E7, por meio das quais o vírus principalmente exerce o seu potencial oncogênico (MULLER; DEMERET, 2012). A E6 se combina com a E6AP (proteína associada à E6) que provoca constante poli-ubiquitinação da p53, proteína supressora de tumor mais importante em seres humanos, marcando-a para destruição (BEAUDENON et al, 2008) (Figura 3b). Por outro lado, a oncoproteína E7 promove a degradação da proteína do retinoblastoma (pRb) (WANG et al, 2001). A perda da função de p53 e pRb interrompe várias vias celulares importantes, que em última análise leva a oncogênese, fazendo com que células percam a sensibilidade para os pontos de verificação do ciclo celular, bem como desregulação da proliferação celular e da apoptose (TAN; ANKATHIL, 2015).

Figura 8. a. A proteína E2 do HPV serve como um repressor transcricional para seus genes E6 e E7. **b.** Integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro interrompe o gene E2, permitindo a produção de E6 e E7, proteínas que, respectivamente, inibem as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb (adaptado de TAN; ANKATHIL, 2015).



2.4 COFATORES NA INFECÇÃO POR HPV

Apesar do importante papel do HPV na carcinogênese cervical, por si só não é suficiente para a transformação maligna de células cervicais. A infecção por HPV geralmente regride quando vários outros fatores ambientais e/ou de estilo de vida não estão presentes (HAVERKOS *et al.*, 2003). Vários fatores comportamentais que incentivem a transmissão viral e persistência foram identificados como relevantes para o risco de câncer cervical. Sendo principal modo de transmissão do HPV é através de relações sexuais, estes fatores comportamentais estão principalmente associados com práticas sexuais. Estes fatores incluem multiplicidade de parceiros sexuais (tanto da mulher quanto do parceiro) (CASTELLSAGUÉ; BOSCH, 2003), não uso de contraceptivo de barreira (UYEN *et al.*, 2014), falta de higiene genital (tanto da mulher quanto do parceiro) (LEE *et al.*, 2014; ALBERO *et al.*, 2012) e início da atividade sexual em idade precoce (PLUMMER *et al.*, 2012).

Um dos mais importantes cofatores identificados é o fumo, como também observado em outras formas de câncer (HAVERKOS *et al.*, 2003; APPLEBY, *et al.* 2006). Tem sido relatado que o fumo provoca um dano oxidativo ao DNA mais grave em células infectadas com HPV, que contribuem para a progressão das células a malignidade (MOKTAR *et al.*, 2011). Além de que, multiparidade e a utilização de contraceptivos orais também têm sido associados com o desenvolvimento do câncer cervical (CIBULA *et al.*, 2010; PARAMITA *et al.*, 2010), presumivelmente modulando a resposta imune ao HPV através de mecanismos hormonais (PARAMITA *et al.*, 2010; CHUNG *et al.*, 2010).

Além disso, fatores que podem reduzir a eficiência do sistema imune na eliminação do HPV, tais como alta carga viral e imunocomprometimento ou imunossupressão devido à coinfeção com outros patógenos, também têm sido implicado no câncer cervical (MOBERG *et al.*, 2005; HEARD *et al.*, 2000).

Sistema Imune

2.5 SISTEMA IMUNE E INFECÇÃO POR HPV (SI)

2.5.1 INFLAMAÇÃO PERMITE O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR

A inflamação é mediada por células do sistema imune (SI) como uma defesa imediata em

resposta a infecção ou lesão por estímulos nocivos. Células imunes inatas, tais como neutrófilos, mastócitos e macrófagos possuem receptores que sinalizam a ativação e a produção de uma matriz de proteínas e moléculas de defesa biologicamente ativas em resposta a substâncias estranhas, bem como a auto-moléculas danificadas ou alteradas (KHATAMI, 2014).

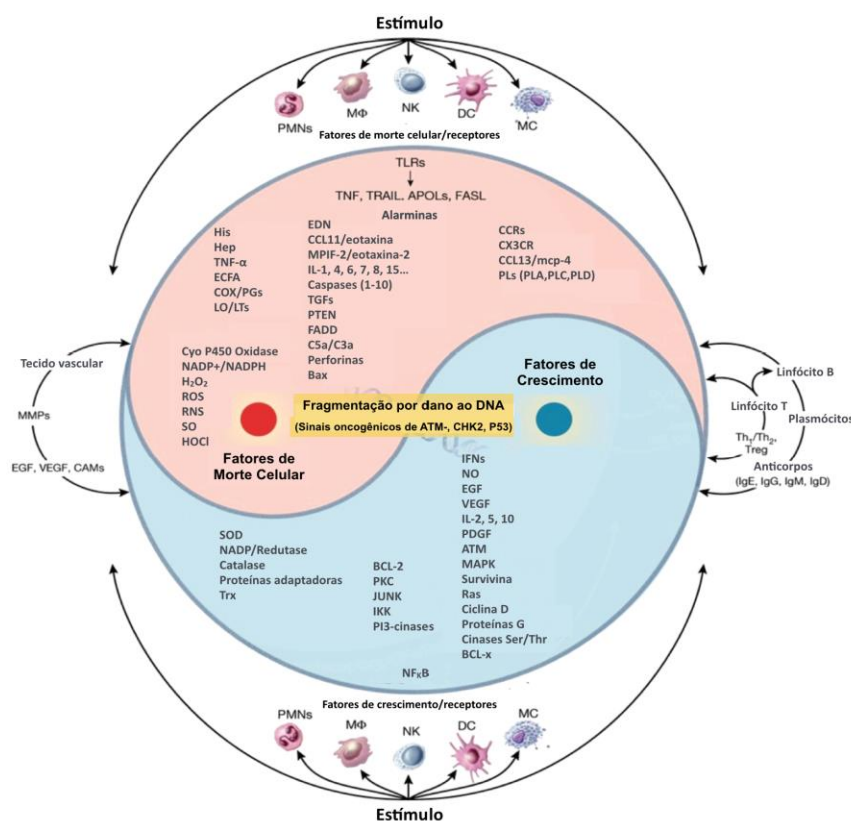
Há pelo menos três fases distintas na resposta inflamatória. Durante a fase aguda, há uma resposta inicial à uma substância irritante ou organismo infeccioso que mimetiza a resposta de cura de uma ferida ou infecção. Esta fase, geralmente é seguida por uma resposta intermediária que, em um estado saudável, serve para regular ou diminuir a resposta aguda para resolver a inflamação. Finalmente, há uma fase de resposta crônica que, se não resolvida, pode ter propriedades patológicas potentes. Como consequência da persistência, um estado pró-inflamatório sustenta a liberação de citocinas e quimiocinas com a capacidade de causar alterações progressivas na composição celular e molecular do microambiente. Isto leva a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) pró-mutagênicas, alterações na vasculatura (aumento da permeabilidade vascular, neovascularização e angiogênese), distúrbios na função mitocondrial e interrupção da sinalização celular normal, tais como o recrutamento de macrófagos com função supressora de tumor para desativar a imunidade mediada pelas células T. É o estado cronicamente inflamado ou em que existiram falhas na resposta à cicatrização de feridas ou resposta localizada, que tem sido identificado como uma característica comum no desenvolvimento de tumores e metástase (KHATAMI, 2008).

2.5.2 INFLAMAÇÃO E A CARCINOGENESE

A inflamação aguda possui dois lados efetores equilibrados e biologicamente opostos representados num modelo de relação “Yin” (pró-apoptótica ou tumoricida) e “Yang” (cicatrização de feridas ou pró-tumorigênica), em que as células imunes participam com as células não-imunes no ambiente local (por exemplo, epitelial, vasculatura e neuronal) (Figura 9) (KHATAMI, 2008). Respostas imunes adaptativas locais ou sistêmicas (imunidade mediada por células e humoral) são mobilizadas pela sinalização seletiva entre as células efectoras imunes inatas ativadas (por exemplo, macrófagos e mastócitos) e suas contrapartes no sistema imune adaptativo (por exemplo, linfócitos T e B). Na inflamação aguda, células imunes possuem propriedades partilhadas e especializadas que funcionam no reconhecimento e eliminação de elementos estranhos intrínsecos ou extrínsecos que prejudicam ou danificam o tecido do

hospedeiro (“Yin”). Na resposta de fase intermediária ou resolução (“Yang”), as células do sistema imunológico funcionam para resolver a inflamação e reparar o tecido danificado (THOMPSON *et al.*, 2015).

Figura 9. Representação gráfica dos lados “yin” e “yang” da inflamação aguda. O esquema descreve dois lados firmemente controlados e biologicamente opostos de autoencerramento da resposta inflamatória aguda. Estímulos induzem a ativação de células do sistema imunológico inato e/ou adaptativo pela expressão de fatores de morte celular “yin” (apoptose, supressão do crescimento), processos para destruir elementos estranhos e tecidos lesado; enquanto “yang”, simultaneamente, produz fatores de crescimento (cicatrização de feridas, promoção do crescimento) para terminar e resolver a inflamação. Os processos “yin” e “yang” estão intimamente facilitados pela ativação de uma resposta vascular, expressão de mediadores apoptóticos e cicatrização de feridas (Adaptado de KHATAMI, 2008).



Ao longo das últimas duas décadas, a compreensão da inflamação na tumorigênese levou à identificação de um número de moléculas que são fortemente ligadas ao desenvolvimento de cânceres humanos (CANDIDO; HAGEMANN, 2013; COLOTTA *et al.*, 2009; COSTA; SCHOLER-DAHIREL; MECHTA-GRIGORIOU, 2013).

Uma quantidade significativa de mecanismos celulares e moleculares tem sido descritos como envolvidos na iniciação, promoção e progressão do tumor induzido por inflamação (Quadro 1). O conjunto diversificado de moléculas efetoras derivadas de células do SI é essencial para

estas mudanças induzidas por inflamação no nível celular e tecidual. Entre as moléculas caracterizadas têm-se as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS).

Quadro 1: Exemplos de alterações moleculares, celulares e teciduais observadas na inflamação crônica e com consequente promoção tumoral (Adaptado de THOMPSON *et al.*, 2015).

- ❖ Instabilidade genômica, remodelação cromossômica, mudanças epigenéticas, alteração no gene e expressão de microRNA;
- ❖ Modificação pós-translacional, alteração da atividade e localização de proteínas;
- ❖ Metabolismo celular alterado;
- ❖ Indução do crescimento celular e sinais anti-apoptóticos → crescimento celular descontrolado e acúmulo de células com genomas danificados;
- ❖ Vasodilatação, extravasamento vascular e infiltração de leucócitos → integridade dos tecidos rompida e microambiente alterado;
- ❖ Necrose tecidual → neovascularização e hipóxia;
- ❖ A indução de metaloproteinases da matriz → invasividade e propagação.

Em níveis fisiológicos, tanto ROS quanto RNS são moléculas de sinalização celular importantes (ROBERTS *et al.*, 2010). No entanto, em níveis elevados ou com a produção aberrante, ROS e RNS são capazes de causar dano celular considerável, resultando em lesões celulares, danos no DNA e provocando uma resposta inflamatória (KARANTZA, 2012; NAIK; DIXIT, 2011).

2.5.3 RESPOSTA IMUNE NAS LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

Vários componentes da resposta imune inata e adquirida são mobilizados para o reconhecimento das infecções por HPV e para eliminar as células infectadas pelo vírus. A primeira linha de defesa consiste na resposta imune inata que ocorre na epiderme e no epitélio das mucosas (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002), que seria, em linhas muito gerais, a resistência não-específica à infecção que ocorre quando os patógenos se encontram com o sistema imune pela primeira vez. Muitas infecções são detectadas pelo sistema imune inato e controladas rapidamente, sendo este importante, inclusive, na indução da resposta imune adquirida por meio da expressão de citocinas e moléculas de adesão. Essa resistência inicial é realizada por células

que não possuem a capacidade de reconhecer especificamente o antígeno, como o fazem os linfócitos, mas que também são de extrema eficiência e importância no desencadeamento da resposta imune, como, por exemplo, macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, leucócitos, etc. Esses tipos celulares possuem receptores denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são capazes de reconhecer diferentes microrganismos.

A imunidade inata ao HPV é mediada por vários mecanismos, incluindo indução de interferon (IFN) e ativação de macrófagos e células natural killer (NK). Contudo, algumas infecções por HPV não são rapidamente eliminadas pela imunidade da mucosa. De fato, a expressão crônica de HPV em baixos níveis de cópias viróticas pode induzir tolerância do epitélio infectado ao vírus em questão (DOAN *et al.*, 1999).

Existem vários mecanismos de evasão, nos quais o vírus não tem fase de disseminação sanguínea; ou o vírus não causa lise dos queratinócitos e, portanto, não induz resposta inflamatória; ou ocorre a produção e liberação do vírus nas células escamosas diferenciadas, que são distantes das citocinas e células imunocompetentes na submucosa (FERNANDO; MURTA, 2008).

A resposta inflamatória possui papel central na imunidade inata, sendo estimulada por citocinas pró-inflamatórias como (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (BYRNE; DALGLEISH, 2001). Uma característica da infecção por esse vírus é a ausência de resposta inflamatória. A proteína E6 do HPV 16 inibe a expressão de IL-18, uma citocina pró-inflamatória, liga-se competitivamente ao receptor da IL-18 (LEE *et al.*, 2016). Liga-se também receptor do TNF- α e protege as células da apoptose (PAPERS *et al.*, 2002), o que não é interessante se forem células aneuplóides imortalizadas (FERNANDO; MURTA, 2008).

Apesar da infecção por HPV não induzir prontamente uma resposta imune aguda, a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias específicas como IL-1, TNF- α , IL-12, IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) estão aumentadas nas lesões intraepiteliais cervicais de alto grau e no câncer cervical invasivo (TJIONG *et al.*, 2001).

O microambiente influencia na produção de mediadores e, conseqüentemente, na evolução do tumor. Esse microambiente poderia fornecer desde interações com outros tipos celulares, a partir de proteínas de membrana e moléculas de adesão ou até mesmo citocinas que poderiam ser sintetizadas por células da resposta imune com o intuito de destruir aquele tumor (FERNANDO; MURTA, 2008).

Estudos descrevem que os macrófagos estão aumentados em infecções por HPV ou CIN e no carcinoma cervical (DAVIDSON; GOLDBER; KOPOLOVIC, 1997) e que essas células estão presentes em ambos (epitélio e estroma), sendo capazes de matar células transformadas por HPV-16. Portanto, papilomas que apresentam regressão têm significativo infiltrado de macrófagos que coram positivamente para TNF- α e isto se correlaciona com apoptose das células epiteliais infectadas (HAGARI *et al.*, 1995).

A proteína quimiotática para monócito (MCP-1), está claramente envolvida na sobrevivência intracelular da infecção por HPV. Contudo, a expressão de MCP-1 está diminuída em HSIL, comparativamente ao epitélio cervical normal (EID; FRANK; UNIVERSITA, 1999), sugerindo, portanto, que MCP-1 e macrófagos têm importante papel no controle do desenvolvimento maligno (FERNANDO; MURTA, 2008).

As células NK são uma subpopulação de linfócitos que reconhecem e destroem células danificadas e infectadas, de forma não-específica. Agem pela liberação de grânulos citotóxicos na superfície das células-alvo e as destroem por induzir apoptose; liberam também TNF- α e IFN- γ , aumentando a inflamação e a resposta imune. Essa linhagem de células é encontrada no estroma de SIL (MALEJCZYK *et al.*, 1989).

Os mediadores inflamatórios tais como TNF- α e IL-1 estimulam vários processos importantes, incluindo maturação de células dendríticas para a apresentação de antígeno e aumento da expressão de proteína complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e II para o reconhecimento e apresentação de antígeno aos linfócitos T. Os receptores da resposta imune (PRRs) têm por função reconhecer fungos, bactérias e vírus e sua ativação induz a liberação de citocinas do padrão T Helper do tipo 1(Th1) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Regressão da infecção por HPV está associada à resposta imune mediada por citocinas do tipo Th1, que é caracterizada por um massivo infiltrado de células mononucleares, aumento das moléculas de adesão e apoptose de queratinócitos infectados. Porém, lesões por HPV persistentes não exibem inflamação e podem desenvolver tolerância (TINDLE, 2002). O desenvolvimento de SIL tem sido associado ao padrão Th2 (T Helper do tipo 2) de secreção de citocinas e a proporção IL-12/IL-10 se encontra reduzida. Além disso, as citocinas imunossupressoras, tais como TGF- β e IL-10, estão aumentadas (TJONG *et al.*, 2001).

Os interferons (IFNs) são uma família de citocinas, onde o tipo I incluem o IFN- α e β que são produzidos pelas células epiteliais e contribuem para a primeira linha de defesa antiviral,

inibindo a proliferação e induzindo apoptose das células infectadas por vírus (DEMARCO *et al.*, 1999). O IFN- γ é produzido por células T ativadas e células NK. Todos eles inibem a expressão de RNAm das proteínas E6 e E7 em células HPV imortalizadas. Em contrapartida, as proteínas E6 e E7 do HPV16 e 18 inibem especificamente a expressão e sinalização do IFN (KOROMILAS; LI; MATLASHEWSKI, 2001), permitindo que o vírus escape da resposta antiviral (FERNANDO; MURTA, 2008).

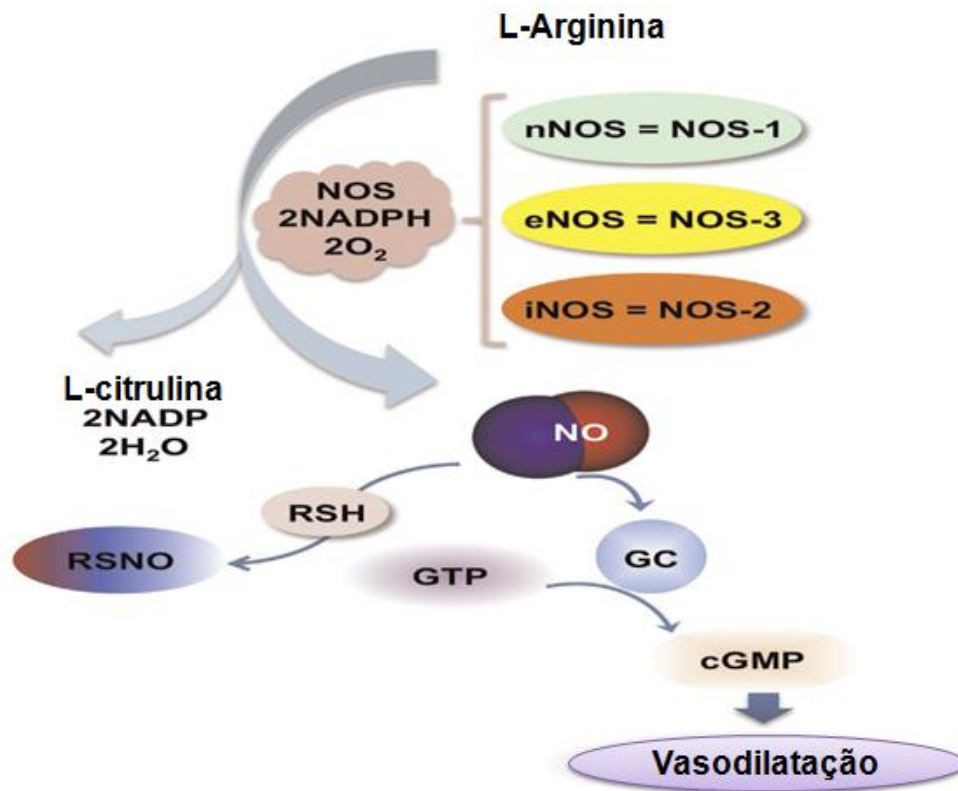
2.6 ÓXIDO NÍTRICO E ENOS

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que exerce vários efeitos protetores para manter regulação cardiovascular e hemostasia, como relaxamento endotélio-dependente, ação anti-inflamatória e anti-trombótica (MANGIAPANE, 2012). Também participa da respiração, migração celular, resposta imune e apoptose (KORDE CHOUDHARI *et al.*, 2013).

NO desempenha um efeito muito importante regulando o sistema nervoso central e o periférico, o sistema cardiovascular e no sistema imunológico. NO é produzido em vários tecidos a partir da conversão de L-arginina a L-citrulina e NO por diferentes formas da óxido nítrico sintase (Figura 10). Há três isoenzimas de NOS nomeadas como óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), indutível (iNOS) e a endotelial (eNOS). eNOS e neuronal nNOS são constitutivamente expressas e são referidas como Ca^{2+} dependentes, apesar de eNOS poder ser ativada independente de cálcio (LIEW, 1995; SAFARINEJAD *et al.*, 2013).

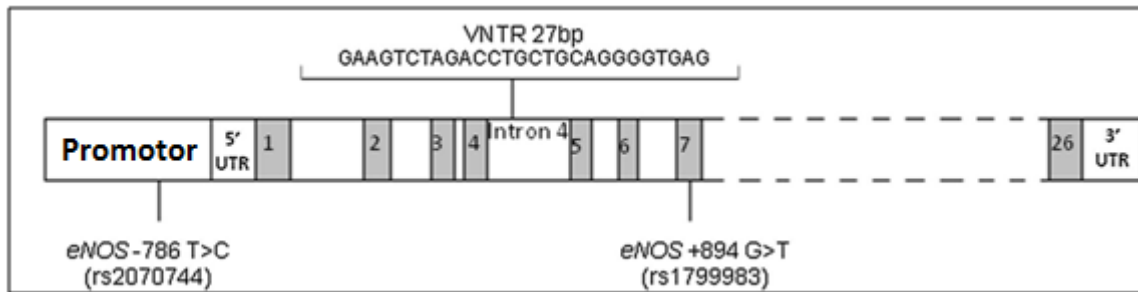
Uma série de fatores regulam a atividade de eNOS, incluindo dimerização mediada por calmodulina, proteína de choque térmico 90 (HSP90), tetrahydrobiopterina (BH4) e caveolina (DESJARDINS *et al.*, 2012; FLEMING 2010). Quinases e fosfatases também desempenham papéis fundamentais na regulação da atividade da eNOS (MOUNT *et al.*, 2007).

Figura 10. .Biossíntese de NO e mecanismo de ação. NO pode ser produzido por três tipos de óxido nítrico síntases NOS, eNOS e iNOS que catalisam a oxidação de L-arginina para L-citrulina. NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC) para aumentar a produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que tem efeitos de sinalização em cadeia (adaptado de VANNINI; KASHFI; NATH, 2015).



Estudos citogenéticos e moleculares mostram que o braço 7q do cromossomo humano contém genes que podem desempenhar um papel importante na progressão do câncer (KARASHIMA *et al.*, 2000; NIHEI *et al.*, 1999). O gene da eNOS humana está localizado no cromossomo 7q35-36 e contém 25 íntrons 26 éxons (MARSDEN *et al.*, 1993). Entre vários polimorfismos no gene da eNOS, três se destacam. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) T-786C (rs2070744) e G894T (rs1799983), e um número variável de repetições em tandem (VNTR) no íntron 4 têm sido amplamente estudados (Figura 11) (LACCHINI *et al.*, 2010).

Figura 11. Polimorfismos de eNOS analisados neste estudo (adaptado de ULIVI *et al.*, 2015).

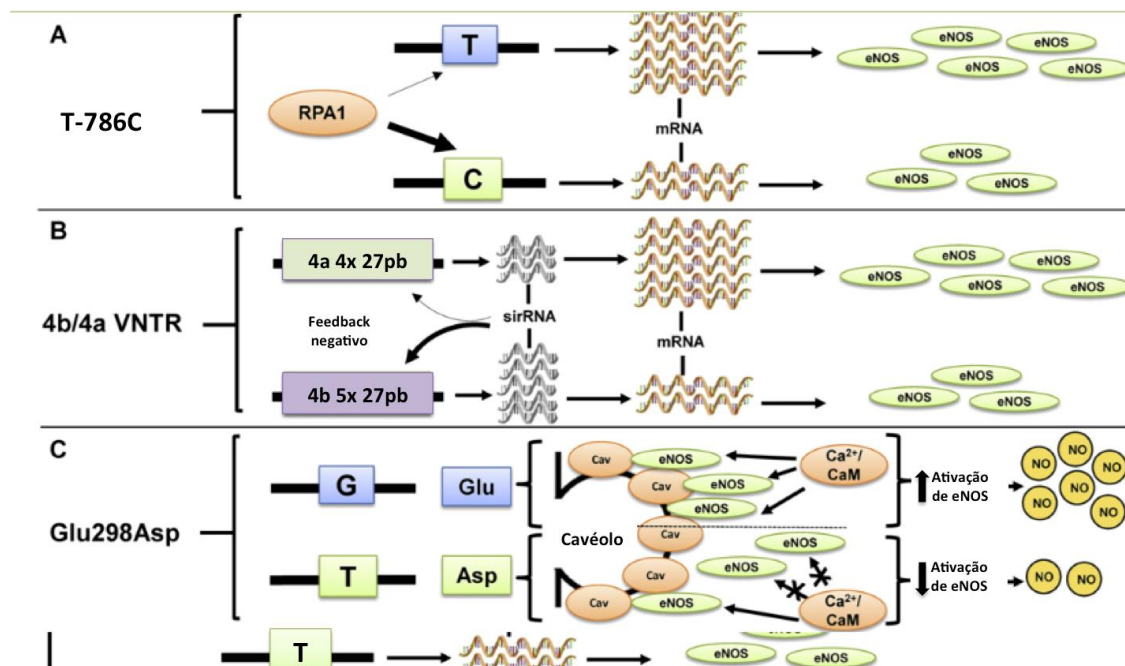


O SNP T-786C afeta a transcrição da eNOS. A substituição de timina por citosina na posição 786 da região promotora de eNOS reduz drasticamente a atividade transcricional do gene eNOS (NAKAYAMA *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002). Este efeito é, provavelmente, relacionado com uma proteína repressora do gene chamada proteína de replicação A1 (RPA1), que se liga com mais afinidade ao promotor de eNOS quando o alelo C está presente (MIYAMOTO *et al.*, 2000) (Figura 12A).

O SNP G894T está localizado no éxon 7 e corresponde a uma mudança de guanina por timina na posição 894 do gene eNOS, resultando em uma substituição de glutamina por aspartato na posição 298 da proteína, e, portanto, este SNP também é conhecido como Glu298Asp (MARSDEN *et al.*, 1993). O alelo variante Asp do polimorfismo Glu298Asp reduz a ligação de eNOS a caveolina-1 e resulta em uma diminuição da disponibilidade eNOS na fração caveolar das células endoteliais (JOSHI *et al.*, 2007) (Figura 12C).

Um VNTR caracterizado por repetições de 27 bp no íntron 4 do gene da eNOS, regula sua pós-transcrição por afetar a formação de pequeno RNA de interferência (siRNA) (ZHANG *et al.*, 2008a, b). Este polimorfismo é conhecido como VNTR. Os alelos mais comuns são o selvagem que têm cinco (variante 4B) ou o alelo mutante quatro cópias (variante 4A) do fragmento de 27 pb (COOKE *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* indicam que as células endoteliais contendo cinco cópias mostram maiores quantidades de siRNA, conduzindo deste modo a níveis mais baixos de RNAm de eNOS em comparação com as células contendo quatro cópias (ZHANG *et al.*, 2008a, b) (Figura 12B).

Figura 12. Mecanismos funcionais dos polimorfismos de eNOS (Adaptado de OLIVEIRA-PAULA *et al.*, 2016).



Ultimamente, polimorfismos da eNOS têm sido averiguados sobre sua relação com o câncer. T-786C e G894T foram relatados associados com o desenvolvimento de câncer **colorretal** (JANG *et al.*, 2013). A presença do VNTR 4b/b, que presumidamente têm uma menor expressão de eNOS, apresentou-se como gerando uma melhor resposta à terapêutica do câncer colorretal metastático (ULIVI *et al.*, 2015). Foi sugerido que o genótipo C/C e o alelo C de T-786C seriam potenciais fatores de risco em pacientes com câncer gástrico (KRISHNAVENI *et al.*, 2015).

VERIM *et al.* (2013) relataram que os genótipos heterozigotos e o haplótipo T/T de G894T estavam significativamente associados com câncer de bexiga. AMASYALI *et al.* (2012) descreveram que o alelo A do polimorfismo íntron 4 VNTR como fator de risco potencial para câncer de bexiga.

Em um estudo de meta-análise e caso-controle, apontou-se que os polimorfismos eNOS - 786T> C e 894G>T estariam associados com o aumento do risco de câncer de mama (GAO *et*

al., 2015). Enquanto que outra meta-análise constatou que G894T e VNTR 4b/a não estão relacionados com o aumento ou diminuição do risco de câncer em geral (HAQUE *et al.*, 2015).

Desta forma, diz-se que o NO possui um papel conflitante no câncer. Por um lado, em uma concentração relativamente baixa observou-se crescimento do tumor e proliferação celular. Por outro lado, alta concentração de NO, gerada por macrófagos ativados pode mediar a apoptose de células de câncer e inibir o crescimento. A regulação do crescimento do tumor por NO representa uma nova dimensão na biologia do câncer. Mais estudos são necessários para avaliar a função exata do NO. Assim, enquanto muito já se sabe sobre o seu papel biológico, ainda mais tem a ser descoberto (KORDE CHOUDHARI *et al.*, 2013).

2.7 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares podem ter potencial uso na triagem primária. Para qualquer biomarcador ser útil, o resultado do teste tem de influenciar a gestão clínica. Opções de gerenciamento incluem referência direta para o tratamento, encaminhamento para colposcopia para confirmar pré-câncer histologicamente, aumento da vigilância através do rastreio mais intensivo ou liberação para exames de rotina. As opções de gestão devem ser escolhidas com base no risco de um indivíduo de pré-câncer e câncer, indicado por resultados de testes e triagem de outros indicadores de risco, tais como a idade (KATKI *et al.*, 2009; CASTLE *et al.*, 2011).

A identificação de genes relacionados a doenças vem sendo realizada através de modelos de análise genéticos descritos já no início da década de 1950, mas que tiveram crescimento exponencial de seus usos e aplicações com o advento do Projeto Genoma Humano. Os SNPs são variações num único par de bases. O número de SNPs conhecidos no genoma humana ultrapassa os 10 milhões, e embora a sua informação seja limitada, a facilidade de genotipagem e o seu elevado número e frequência (de 1000 em 1000pb) no genoma humano fazem com que estes marcadores sejam muito vulgarmente usados nos estudos de epidemiologia genética (BURTON *et al.*, 2005; MORTON *et al.*, 2003).

O câncer cervical é em grande parte uma doença evitável se for realizada a detecção precoce. A identificação de biomarcadores preditivos que poderiam determinar a suscetibilidade individual ao câncer cervical, gerando um importante impacto clínico. A apoptose representa um mecanismo fundamental para a supressão do tumor e um processo devidamente regulado de

apoptose garante eliminação eficiente de tecidos tumorais. Além disso, em um câncer mediado por vírus, como o carcinoma do colo do útero, a apoptose equilibrada no hospedeiro é necessária para evitar a morte celular induzida por ativação desnecessária entre linfócitos T, que, por sua vez, permite uma resposta imune mais forte contra o patógeno viral. Polimorfismos nos genes do hospedeiro relacionados com a apoptose, podem influenciar a eficiência apoptótica por perturbar o equilíbrio entre sinais pró e anti-apoptose ou alterando a funcionalidade dos produtos protéicos, o que poderia, por conseguinte, afetar a suscetibilidade do hospedeiro ao câncer cervical. Portanto, estudos de epidemiologia genética com enfoque no papel dos polimorfismos em genes relacionados com a apoptose representam uma área promissora e crucial de investigação para identificar biomarcadores preditivos para o câncer cervical (TAN; ANKATHIL, 2015).

Novos biomarcadores serão cruciais para decidir quem entre as mulheres HPV-positivas precisam ser encaminhadas para uma avaliação mais aprofundada ou tratamento. Isto será importante para reservar um tratamento para aquelas mulheres que estão em risco de desenvolver câncer, assim, tratar de forma menos genérica lesões de alto grau (SAHASRABUDDHE; LUHN; WENTZENSEN, 2011).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, T. & MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, v. 101, p. 300-308, 2000.

ALBERO, G., CASTELLSAGUÉ, X., GIULIANO, A.R., BOSCH, F.X. Male circumcision and genital human papillomavirus: a systematic review and meta-analysis. **Sex Transm Dis.**, v. 39, p. 104–113, 2012.

AMASYALI, A. S. *et al.* Nitric Oxide Synthase (eNOS4a/b) Gene Polymorphism is Associated with Tumor Recurrence and Progression in Superficial Bladder Cancer Cases. **The Journal of urology**, v. 188, p. 2398–403, 2012.

ANDRADE, A.C., LUZ, P.M., VELASQUE, L., VELOSO, V.G., MOREIRA, R.I., RUSSOMANO, F., CHICARINO-COELHO, J., PIRES, E., LEVI, J.E., GRINSZTEJN, B., FRIEDMAN, R.K. Factors Associated with Colposcopy-Histopathology Confirmed Cervical Intraepithelial Neoplasia among HIV-Infected Women from Rio De Janeiro, Brazil. **PLoS One** 6, v. 32, p. 2484–92, 2011.

BOLLEN, L.J., CHUACHOOWONG, R., KILMARX, P.H., MOCK, P.A., CULNANE, M., *et al.* Human papillomavirus (HPV) detection among human immunodeficiency virusinfected pregnant Thai women: implications for future HPV immunization. **Sex. Transm. Dis.**,v.33, p. 259–264, 2006.

BORNSTEIN, J. *et al.*Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. **Obstet.Gynecol.**,v. 120, p. 166–172, 2012.

BRENNAN, P.A.; DOWNIE, I.P.; LANGDON, J.D.; ZAKI, G.A. Emerging role of nitric oxide in cancer. **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 37, p. 370-373,1999.

BURTON, P.R., TOBIN, M.D., HOPPER, J.L. Key concepts in genetic epidemiology. **Lancet**, v. 366, p.941-51, 2005.

BYRNE, K. J. O.; DALGLEISH, A. G. Chronic immune activation and inflammation as associated with the subsequent cancer associated chronic. **Br. J.Cancer**,v. 85, n. May, p. 473–483, 2001.

CANDIDO, J.; HAGEMANN, T. Cancer-Related Inflammation. *J.Clin.Immunol.*,v. 33, p. 79-84, 2013.

CARVALHO, M.O.O., CARESTIATO, F.N., PERDIGÃO, P.H., XAVIER, M.P., SILVA, K., BOTELHO, M.O. *et al.* Human Papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective study. **Brazilian Journal on Infectious Diseases**, v.9, p. 398- 404, 2005.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X. The male role in cervical cancer. **Salud Pública de México**, v. 45, p. 345–353, 2003.

CASTLE, P. E. *et al.* A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 1808–1816, 2005.

CASTLE, P.E., Sideri, M., Jeronimo, J., Solomon, D., Schiffman, M. Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. **Am. J.Obstet.Gynecol.**, v. 197, p.356–356, 2007.

CHUNG, S.H., FRANCESCHI, S., LAMBERT, P.F.. Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer? **Trends Endocrinol.Metab.**,v. 21, p. 504–11, 2010.

CIBULA, D. *et al.* Hormonal contraception and risk of cancer. **Human Reproduction Update.**,v. 16, p. 631–650, 2010.

COLOTTA, F. *et al.* Cancer-related inflammation , the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**,v. 30, p. 1073–1081, 2009.

CONG, X., COX, D.D., CANTOR, S.B. Bayesian meta-analysis of Papanicolaou smear accuracy. **Gynecol.Oncol.**, v.107 p. 133–137, 2007.

COOKE, G.E., DOSHI, A., BINKLEY, P.F. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. **Pharmacogenomics**, v. 8, p.1723–1734, 2007.

COSTA, A.; SCHOLER-DAHIREL, A.; MECHTA-GRIGORIOU, F. The Role of Reactive Oxygen Species and Metabolism on Cancer cells and their Microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v.25, p. 23-32, 2014.

DAVIDSON, B.; GOLDBER, I.; KOPOLOVIC, J. Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplastic and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Pathol.Res.Pract.**, v. 58, p. 491-500, 1997.

DE VILLIERS, E.-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, p. 2–10, 2013.

DESJARDINS, F., DELISLE, C., AND GRATTON, J.-P. Modulation of the cochaperoneAHA1 regulates heat-shock protein 90 and endothelial NO synthase activation by vascular endothelial growth factor. **Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.**, v. 32, 2484–92, 2012.

DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Artigo de Revisão Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular : Ativação Celular , Reatividade Vascular e Variante Genética. **ArquivosBrasileiros de Cardiologia**, v. 44, p. 68–75, 2011.

DOAN, T. *et al.* Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Expressed in Peripheral Epithelium Tolerizes E7-Directed Cytotoxic T-Lymphocyte Precursors Restricted through Human (and Mouse) Major Histocompatibility Complex Class I Alleles. **J.Virol.**,v. 73, p. 6166–6170, 1999.

DOORBAR, J. The papillomaviruslifecyle.**Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7-15 2005.

EID, H. N. E.; FRANK, R. O.; UNIVERSITA, F. S. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (mcp-1) gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *InternationalJournalofCancer*, v. 11, p. 6–11, 1999.

FERNANDO, E.; MURTA, C. Resposta imune nas lesões intra-epiteliais do colo uterino. **Femina**, v. 36, p. 9–13, 2008.

FLEMING, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS.**P.flugersArchiv, European Journal of Physiology**, v. 459, p. 793–806, 2010.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature Publishing Group**, v.4, p. 46–54, 2004.

GAGE, J.C., HANSON, V.W., ABBEY, K., DIPPERY, S., GARDNER, S., KUBOTA, J., *et al.* Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy. **Obstet.Gyneco.**, v. 2, p. 264–272.

GAO, X. *etal.*eNOS Genetic Polymorphisms and Cancer Risk.**Medicine**, v. 94, p. 972, 2015.

GARCÍA-ESPINOSA. B., NIETO-BONA. M.P., RUEDA. S., SILVA-SÁNCHEZ LF, Piernas- Guinea. **Diagnostic Pathology**, v. 4, p. 1-8, 2009.

HAGARI, Y.; BUDGEON, L.R.; PICKEL, M.D.; KREIDER, J.W. Association of tumor necrosis factor-alpha gene expression and apoptotic cell death with regression of Shopepapillomas. **J. Invest.Dermatol.**, v. 104,p. 526-29, 1995.

HAQUE, S. *et al.* G894T and 4a_b polymorphisms of NOS3 gene are not associated with cancer risk meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 2929–2937, 2015.

HARADA, K., SUPRIATNO, KAWAGUCHI, S., TOMITARO, O., YOSHIDA, H., SATO, M. Overexpression of iNOS gene suppresses the tumorigenicity and metastasis of oral cancer cells. **In Vivo**, v. 18, p. 449–455, 2004.

HAVERKOS, H. W. *et al.* Cigarette smoking and cervical cancer : Part I: a meta-analysis.**Biomed.Pharmacother.**,v. 57, p. 67–77, 2003.

HEARD, I., TASSIE, J.M., SCHMITZ, V., MANDELBROT, L., KAZATCHKINE, M.D., ORTH, G. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load. **Obstet. Gynecol.**, p. 96, v. 403–409, 2000.

HERRINGTON, C. S. The terminology of pre-invasive cervical lesions in the UK cervical screening programme.**Cytopathology**, v. 26, p. 346–350, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. BRASIL. Estimativa|2016. Incidência de Câncer no Brasil.Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC Monographs during 2015 – 2019. n. April 2014, 2015.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, p. 197–216, 2002.

JANG, M. J. *et al.* Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population. **Gene**, v. 512, p. 275–281, 2013.

JOSHI, M.S., MINEO, C., SHAUL, P.W., BAUER, J.A. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **FASEB J.** v. 21, p.2655–2663, 2007.^[1]_{SEP}

KARANTZA, V. The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. **Front.Oncol.** v. 2, p. 1–13, 2012.

KARASHIMA, T., TAGUSHI, T., YOSHIKAWA, C., *et al.* Numerical chromosomal changes in metastatic prostate cancer following anti-androgen therapy: Fluorescence in situ hybridization analysis of five Japanese cases. **Cancer Genet.Cytogenet.**, v. 20, p.148 –154, 2000.

KATKI HA, WACHOLDER. S, SOLOMON. D, CASTLE. PE., SCHIFFMAN M. Risk estimation for the next generation of prevention programmes for cervical cancer. **Lancet Oncol.**, v.10, p. 1022–1023, 2009.

KHATAMI, M. “Yin and Yang” in inflammation: duality in innate immune cell function and tumorigenesis. **Expert Opin.Biol.Ther.**, v. 8 p. 1461-72,2008.

KHATAMI, M. Chronic Inflammation: Synergistic Interactions of Recruiting Macrophages (TAMs) and Eosinophils (Eos) with Host Mast Cells (MCs) and Tumorigenesis in CALTs. M-CSF, Suitable Biomarker for Cancer Diagnosis! **Cancers (Basel)**, v. 6, p. 297–322, 2014.

KJAER, S. K. *et al.* A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial **Neoplasia in Women**, v. 372, p. 711–723, 2015.

KOBAYASHI, A.; GREENBLATT, R.M.; ANASTOS, K.; MINKOFF, H.; MASSAD, L.S.; YOUNG, M.; LEVINE, A.M.; DARRAGH, T.M.; WEINBERG, V.; SMITHMcCUNE, K.K. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Res.**, v. 64, p. 6766-6774, 2004.

KORDE CHOUDHARI, S. *et al.* Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, p. 118, 2013.

KOROMILAS, A. E.; LI, S.; MATLASHEWSKI, G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine& Growth Factor Reviews**, v. 12, p. 157–170, 2001.

KULASINGAM , S.L., HUGHES, J.P., KIVIAT NB, *et al.* Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. **JAMA**, v. 288, p.1749–1757,2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO N. (Ed.). Robins&Cotran Patologia: bases patológicas das doenças.Rio de Janeiro,**Elsevier**7 ed., p. 685-688, 2013.

LACCHINI, R., SILVA, P.S., TANUS-SANTOS, J.E.A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. **BasicClin. Pharmacol. Toxicol.** v. 106, p.357–361, 2010.

LEE, H., LEE, D.H., SONG, Y.M., LEE, K., SUNG, J., KO, G. Risk factors associated with human papillomavirus infection status in a Korean cohort. **Epidemiol. Infect.**, v.142, p.1579–89, 2014.

LEE, S. *et al.* Both E6 and E7 Oncoproteins of Human Papillomavirus 16 Inhibit IL-18-Induced IFN- γ Production in Human Peripheral Blood Mononuclear and NK Cells. **The Journal of Immunology**,v.167, p. 497-504,2016.

LIEW, F.Y. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 396-399, 1995.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Reducing HPV-Associated Cancer Globally. **Cancer Prev.Res**,v. 5, p. 18–24, 2012.

MAC DONALD, C.F. Assessing secondary prevention methods for cervical cancer: costs and benefits in managed care. **Am.J.Manag.Care.**,v. 14, p.185–192, 2008.

MALEJCZYK, J.; MAJEWSKI, S.; JABLONSKA, S.; ROGOZINSKI, T.T.; ORTH, G. Abrogated NK-cell lysis of human papillomavirus (HPV)-16-bearing keratinocytes in patients with pre-cancerous and cancerous HPV-induced anogenital lesions. **Int. J. Cancer**, v. 43, p. 209-14, 1989.

MALUF, P.J., MICHELIN, M.A., ETCHERBEHERE, R.M., ADAD, S.J., MURTA, E.F.C. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 278, p. 525-530, 2008.

MANGIAPANE, H. Cardiovascular disease and diabetes. **Adv.Exp. Med. Biol.**, v.771, p. 219–228, 2012.

MARRONI, A.S., METZGER, I.F., SOUZA-COSTA, D.C., *et al.* Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genetic polymorphisms. **Nitric Oxide**, v.12 p.177– 82, 2005.

MARSDEN, P.A., HENG, H.H., SCHERER, S.W., *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **J.Biol.Chem.**, v. 268, p.17478–17488, 1993.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, p. 1–23, 2013.

MIYAMOTO, Y., SAITO, Y., NAKAYAMA, M., SHIMASAKI, Y., YOSHIMURA, T., YOSHIMURA, M., HARADA, M., KAJIYAMA, N., KISHIMOTO, I., KUWAHARA, K., HINO, J., OGAWA, E., HAMANAKA, I., KAMITANI, S., TAKAHASHI, N., KAWAKAMI, R., KANGAWA, K., YASUE, H., NAKAO, K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T–NC mutation associated with coronary spastic angina. **Hum. Mol. Genet.** v. 9, p.2629–263, 2010.

MISTRY, N.; SIMONSSON, M.; EVANDER, M. Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal

origin. **Virol. J.**, v. 4, p. 4–7, 2007.

MOBERG, M., GUSTAVSSON, I., WILANDER, E., GYLLENSTEN, U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 92, p.891–894, 2005.

MOKTAR. A., SINGH. R., VADHANAM. M.V., RAVOORI, S., LILLARD, J.W., GAIROLA, C.G., *et al.* Cigarette smoke condensate-induced oxidative DNA damage and its removal in human cervical cancer cells. **Int.J.Oncol.**, v.39, p. 941–947, 2011.

MORALES, M.C., CARRO-CAMPOS, P. *etal.* Genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, EquatorialGuinea. **Diagnostic.Pathology**, v.4, p.1-8, 2009.

MORTON, NE. Genetic epidemiology, genetic maps and positional cloning. **Philos. Trans. R.Soc.Lond. B.Biol.Sci.**, v. 358, p. 1701-1708, 2003.

MOSCICKI, A. *et al.* Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. **Vaccine**, v. 30, p. 24–33, 2012.

MULLER, M.; DEMERET, C. The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions : A Complex Hijacking of the Cellular Network. **Open.Virol. J.**, v.6 p. 173–189, 2012.

MUÑOZ, N., CASTELLSAGUÉ, X., GONZÁLEZ, A.B. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 3, p. 1–10.

MYERS, E.R., MCCRORY, D.C., SUBRAMANIAN, S., *et al.* Setting the target for a better cervical screening test: characteristics of a cost-effective test for cervical neoplasia screening. **Obstet.Gynecol.**, v.96, p.645–652, 2000.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **J.Exp.Med.**, v. 208 p. 417–420, 2011.

NAKAYAMA, M., YASUE, H., YOSHIMURA, M., SHIMASAKI, Y., KUGIYAMA, K., OGAWA, H., MOTOYAMA, T., SAITO, Y., OGAWA, Y., MIYAMOTO, Y., NAKAO, K. T-786– N C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is

associated with coronary spasm. **Circulation**, v. 99, p.2864–2870, 1999.

NANDA, K., MCCRORY, D.C., MYERS, E.R., *et al.* Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Ann. Intern. Med.**, v.132, p.810–819, 2000.

NGUYEN, H. P.; PETER, K. R.; RADY, L. The Biology of Human Papillomaviruses. **Curr. Probl. Dermatol.**, v. 45, p. 19–32, 2014.

NIHEI, N., OHTA, S., KURAMOCHI, H., *et al.* Metastasis suppressor gene(s) for rat prostate cancer on the long arm of human chromosome 7. **Genes Chromosome Cancer**, v. 24, p 1– 8, 1999.

NIMAKO, M.; FIANDER, A. N.; WILKINSON, G. W. *et al.* Human papillomavirus: specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4855-61, 1997.

OLIVEIRA-PAULA, G.H. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. **Gene**, v. 575, p. 584-599, 2016.

PAPERS, J. B. C. *et al.* The Human Papillomavirus 16 E6 Protein Binds to Tumor Necrosis Factor (TNF) R1 and Protects Cells from TNF-induced Apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 21730–21739, 2002.

PARAMITA, S., SOEWARTO, S., WIDODO, M.A., SUMITRO, S.B. High parity and hormonal contraception use as risk factors for cervical cancer in East Kalimantan. **Med. J. Indones.**, v. 19, p. 268–72, 2010.

PLUMMER, M. *et al.* Time since first sexual intercourse and the risk. **Int. J. Cancer.**, v. 2644, p. 2638–2644, 2012.

POLAT, F. *et al.* T-786C , G894T , and Intron 4 VNTR (4a / b) Polymorphisms of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Bladder Cancer Cases. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 16, p. 2199–2202, 2015.

REAL, O.; ALMEIDA, P. DE; MARTINS, T. C. Characterization of Common and Rare Human Papillomaviruses in Portuguese Women by the Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing. **J.Med.Virol.**, v. 1032, p. 1024–1032, 2010.

RIBEIRO, J. *et al.* International Journal of Gynecology and Obstetrics Characterization of human papillomavirus genotypes and HPV-16 physical status in cervical neoplasias of women from northern. **Portugal International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 125, p. 107–110, 2014.

ROBERTS, R. A. *et al.* Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, v. 276, p. 85–94, 2010.

RODRÍGUEZ, A. C. *et al.* Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, p. 315–324, 2010.

ROS, C. T. DA; SCHMITT, S. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. **Asian J. Androl.**, v. 10, p. 110–114, 2008.

SAFARINEJAD, M. R. *et al.* Effects of the T-786C, G894T, and Intron VNTR 4b/a polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. **Urologic oncology**, v. 31, p. 1132–40, 2013.

SAHASRABUDDHE, V.; LUHN, P.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. **Future microbiology**, v. 6, p. 1–25, 2011.

SARAIYA, M., BERKOWITZ, Z., YABROFF, K.R., WIDEROFF, L., KOBRIN, S., BENARD, V. Cervical cancer screening with both human papillomavirus and Papanicolaou testing vs Papanicolaou testing alone: what screening intervals are physicians recommending? **Arch. Intern. Med.**, v. 170, p. 977–985, 2010.

SCHEURER, M.E., TORTOLERO-LUNA, G., ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 15, p. 727-46, 2005.

SCHIFFMAN, M., WENTZENSEN, N., WACHOLDER, S., KINNEY, W., GAGE, J.C., CASTLE, P.E. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **J.Natl.CancerInst.**, v. 103, p. 368–383, 2011.

SHANG, Z.J., LI, J.R., LI, Z.B: Effects of exogenous nitric oxide on oral squamous cell carcinoma: an in vitro study. **J. Oral Maxillofac.Surg.**, v. 60, p. 905–910, 2002.

SIEBERS, A.G., KLINKHAMER, P.J., GREFFE, J.M., *et al.* Comparison of liquid-based cytology with conventional cytology for detection of cervical cancer precursors: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 302, p.1757–1764, 2009.

SINGH, S., GRUPTA, AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. **Cancer Chemother.Pharmacol.**, v. 6, p. 1211-1224, 2011.

SOLOMON, D. *et al.* The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **JAMA**, v. 287, p. 2114-2119 2002.

SOLOMON, D., BREEN, N., MCNEEL, T. Cervical cancer screening rates in the United States and the potential impact of implementation of screening guidelines. **CA Cancer J.Clin.**, v. 57, p.105–111, 2007.

SZOSTEK.S., KLIMEK, M., ZAWILINSKA. B., KOSZ-VNENCHAK, M. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. **ActaBiochimicaPolonica**, v. 55, p. 687-692, 2008.

TAIMEH, Z. *et al.* Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, p. 519–530, 2013.

TAN, S. C.; ANKATHIL, R. Genetic susceptibility to cervical cancer : role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. **Tumor Biology**, v. 9, p. 6633–6644, 2015.

TANGKA, F.K., O'HARA, B., GARDNER, J.G., *et al.* Meeting the cervical cancer screening needs of underserved women: the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program, 2004–2006. **Cancer Causes Control**, v.21, p.1081–1090, 2010

TANUS-SANTOS, J.E., DESAI, M., DEAK, L.R., *et al.* Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. **Pharmacogenetics**, v.12, p. 407–413, 2002

THOMPSON, P. A. *et al.* Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 36, p.232–253, 2015.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **NATURE REVIEWS|CANCER**, v. 2, p. 1–7, 2002.

TJIONG, M.Y.; VANDER, V.N.; TER SCHEGGET, J.S.; BURGER, M.P.; TEN KATE, F.W.; OUT, T.A. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplásica. **Cytokine**, v. 14, p. 357-60, 2001.

ULIVI, P. *etal.* eNOS polymorphisms as predictors of efficacy of bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer: data from a randomized clinical trial. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, p. 258, 2015.

LAM, JANNI UYEN HOA. *et al.* Condom Use in Prevention of Human Papillomavirus Infections and Cervical Neoplasia. **Journal of Medical Screening**, v. 21.1, p. 38–50 (2014).

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 334–343, 2015.

VERIM, L., TOPTAS, B., OZKAN, N.E., *et al.* Possible relation between the NOS3 gene GLU298ASP polymorphism and bladder cancer in Turkey. **Asian Pac. J Cancer Prev.**, v.14, p. 665-668, 2013.

WANG, J., DUDLEY, D., WANG, X.L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1–4, 2002. [1]_{SEP}

WANG, S.S., HILDESHEIM, H. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **J. Natl. Cancer Inst.Monog.**,v. 31, p.35-40, 2003.

WENTZENSEN, N. *et al.* Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. **Journal of Clinical Virology**, v.76, p. 49–55, 2015.

WU, X., WANG, Z.F., XU, Y., *et al.* Association between three eNOS polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. **Asian Pac. J Cancer Prev.**, v. 15, p. 5317-5324, 2014.

XING, S.-S. *et al.*Salidroside improves endothelial function and alleviates atherosclerosis by activating a mitochondria-related AMPK/PI3K/Akt/eNOS pathway.**Vascular Pharmacology**, v. 72, p. 141-152, 2015.

YABROFF KR, SARAIYA, M., MEISSNER, H.I., *et al.* Specialty differences in primary care physician reports of papanicolaou test screening practices: a national survey, 2006 to 2007. **Ann. Intern.Med.**, v. 151, p.602–611, 2009.

ZHANG, M.X., ZHANG, C., SHEN, Y.H., WANG, J., LI, X.N., CHEN, L., ZHANG, Y., COSELLI, J.S., WANG, X.L. Effect of 27 nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. **Mol. Biol. Cell.**,v. 19, p. 3997–4005, 2008a.

ZHANG, M.X., ZHANG, C., SHEN, Y.H., WANG, J., LI, X.N., ZHANG, Y., COSELLI, J., WANG, X.L. Biogenesis of short intronic repeat 27-nucleotide small RNA from endothelial nitric- oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.*, v. 283, p. 14685–14693, 2008b.

ZHANG, F. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor- β receptor in hepatic stellate cells. **Journal of Cell Science**, v. 127, p. 305–314, 2014.

ZUCHNA, C., HAGER, M., TRINGLER, B., GEORGOULOPOULOS, A., CIRESA-KOENIG, A., VOLGGER, B., *et al.* Diagnostic accuracy of guided cervical biopsies: a prospective multicenter study comparing the histopathology of simultaneous biopsy and cone specimen. **Am. J. Obstet.Gynecol.**, v. 203, p. 321, 2010.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a frequência dos polimorfismos 894G>T e VNTR 4b/a do gene Oxido Nítrico Sintase Endotelial em amostras de pacientes do banco de dados do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)- Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com e sem lesões cervicais, infecção por HPV e respectivos subtipos, vaginose bacteriana.

4.2 ESPECÍFICOS

- Desenhar um painel que envolva moléculas associadas ao câncer cervical e vias de sinalização relacionadas com eNOS.
- Identificar presença dos polimorfismos 894G>T e VNTR 4b/a do gene eNOS nas pacientes;
- Correlacionar os dados de polimorfismos da eNOS com os outros aspectos laboratoriais e clínicos das pacientes.

5 ARTIGO: ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORPHISM ON CYTOLOGICAL ABNORMALITY DEVELOPMENT IN A BRAZILIAN POPULATION

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Nitric Oxide

Fator de impacto: 3.521

Joana D'arc Rozendo dos Santos^{1,*}, Adrya Lúcia Peres¹; Nicodemos Pontes Telles²; Rosângela Ferreira Frade de Araújo^{1,3}; Thaysa Waleria de Aragão Santos¹; José Luiz de Lima Filho^{1,3}; Danyelly Bruneska Gondim Martins^{1,3}.

1. Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.
2. Departamento de Patologia, UFPE – Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondence: Joana D'arc Rozendo dos Santos

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 –Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Recife, Brasil. Phone: + 55 81 2126 8484.

e-mail: jsantos@prospecmol.org

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common type among Brazilian women, being preceded by lesions in the epithelium cervical intraepithelial neoplasia (CIN), usually associated with genital human papillomavirus (HPV). However, the elements involved in HPV infection of prognosis are still poorly understood. Nitric oxide (NO) is a soluble gas processes involved in vasodilation, neurotransmission and immunity. NO is produced from 3 isoforms of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and endothelial (eNOS) of the molecules involved in cancer. However, investigations of the mutation effect on eNOS in cancer also generate conflicting results, with few studies linking these genetic differences with cervical cancer. In the present study, a panel involving molecules associated with eNOS and signaling pathways related to eNOS was designed, highlighting 5 stimulatory molecules production

eNOS, 4 and 38 signaling pathways related molecules eNOS. DNA from blood samples of 94 patients with and without cervical intraepithelial lesions were analyzed for the presence of two polymorphisms in the eNOS gene, G894T and intron 4VNTR (4a/b). The distribution of eNOS 894G>T and VNTR 4b/a polymorphisms showed higher frequency of G/G (64.9%) and 4b/4b (67%) genotypes. No VNTR 4a/4a genotype was found in this population. Only eNOS 894 T/T genotype may be associated with cervical lesions ($p = 0.0018$). There was no association between polymorphisms of eNOS with HPV infection, high risk HPV or bacterial vaginosis. However, the haplotype G/T + 4a/4b showed an OR of 5.3 for bacterial vaginosis (95% CI 0.76-37.1), while T/T + 4b/4a showed an OR of 5.0 to HPV infection (95 % CI 0.11-220) and 1.8 cervical lesions (95% CI 0.04-79.5). The combination of T + 4a alleles presented OR values for HPV infection of 3.0 (95% CI

Keywords: eNOS polymorphism, HPV infection, cervical lesions.

1. Introduction

Worldwide, cervical cancer is the third most common cancer in women, accounting for 527,624 cases in 2012 and 560,505 new cases are estimated to occur in 2015 [1]. In Brazil, it is also the third most frequent cancer among women nationally, but increases to the second most frequent in the northeast region. Cervical cancer is caused by specific human papillomavirus (HPV) infections, which emerged as one of the most important identified risk factors for widespread human cancers [2].

Human papillomavirus (HPV) is the most clinically common sexually transmitted infection due to its carcinogenic power and the high number of lesions that it causes at different sites of the human body. Genital tract organs are the most common sites where the virus can be found [3]. The balance between active immune responses against human papillomavirus (HPV) and HPV-induced immune escape regulates viral clearance and carcinogenesis [4]. The HPV replicative cycle is tied to the keratinocyte differentiation programme. They do not lyse keratinocytes, so there is no opportunity for APCs to engulf virions and present virion-derived antigens to the immune system. So several factors minimize or prevent exposure of virus to the immune system. Furthermore, there is no blood-borne phase of infection, so the immune system outside the epithelium has little opportunity to detect the virus [5]. In this view, it is important to understand how the innate immune system can inhibit the HPV infection and cervical lesion

progression.

Nitric oxide (NO) is a multifunctional gaseous molecule and a highly reactive free radical. A family of haemoproteins, called NO synthases (NOS) catalyses the oxidation of L-arginine to nitric oxide (NO) and L-citrulline, consuming NADPH and oxygen. The three isoforms of NOS are eNOS, nNOS and iNOS. Both nNOS and eNOS are constitutively expressed. The constitutive endothelial NO synthase (eNOS) is expressed in the endothelium. Various studies have shown that NO can both promote and inhibit tumor progression and metastasis. The effects of NO in tumors seem to depend on the activity and localization of NOS isoforms, concentration and duration of NO exposure, and cellular sensitivity to NO [6].

There are five important stimuli for the production of eNOS: Vascular endothelial growth factor (VEGF), bradykinin (BK), shear stress, and epidermal growth factor (EGF). All these stimuli promote the production of NO by sequential activation of a signaling pathway in endothelial cells. Therefore, it seems that the increase in eNOS activity promotes tumor progression, since VEGF induces angiogenesis; BK and shear stress inducing cell cycle and EGFR signaling increases the synthesis of proteins for cell growth (Figure 1) [7–12].

Three major polymorphisms of eNOS have been researched for association with cancer risk: T-786C, 894G>T and VNTR 4b/a. The SNP G894T is located in exon 7 and corresponds to a change of guanine for thymine at position 894 of the eNOS gene, resulting in an aspartate glutamine substitution at position 298 of the protein, and therefore, this SNP is also known as Glu298Asp [13]. The variant allele polymorphism Asp Glu298Asp results in a decreased eNOS availability and consequently produce less nitric oxide[14]. A VNTR repeats wherein the 27 bp intron 4 of the eNOS gene, regulates its post-transcription by affecting the formation of small interfering RNA (siRNA) [15]. This polymorphism is known as VNTR. The most common alleles are those with five (4b) or four copies (variant 4a) fragment of 27 bp [16]. Profiles containing five copies show larger amounts of siRNA, thus leading to lower levels of eNOS mRNA compared to cells containing four copies which results in a lower production of eNOS in the wild allele [17].

eNOS polymorphisms have been associated to breast cancer [18–22]; endometrial carcinoma [23] and vulvar cancer [24]. However, there are few reports about the influence of eNOS polymorphism in Human papillomavirus infection or cervical cancer development. The aim of this study was to analyze the relation between

eNOS 894G>T and VNTR 4b/a polymorphism, cervical cancer precursor lesions, HPV infection, and bacterial vaginosis.

2. Material and methods

2.1 Patient samples

Women studied were under surveillance in Family Unit Public Health (Olinda– PE, Brazil), and stored in the database of Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)- Federal University of Pernambuco (UFPE). This study was performed with ninety-four women aged from sixteen to sixty-three years old, of which ten with cervical lesions, forty-one positive for HPV infection where twenty- two infected with high-risk and seventeen with low-risk, seventeen positive for bacterial vaginosis, and the majoritary low sociodemographic profile.

Cervical samples were harvested during the routine gynecological inspection, from the ectocervix and endocervix by using a spatula and cytobrush (Kolplast, Brazil), respectively. Collected cells were applied onto a glass slide, identified and stored in absolute ethanol (Vetec, Brazil; Sigma-Aldrich Corporation) until sample preparation for cytopathology test. The residual cells in cytobrush were stored in PBS buffer pH7.0 (Life Technologies, USA) and used for HPV identification and HPV genotyping. The exclusion criteria were: HIV infection, pregnancy and post-partum, history of transplant, history of partial or complete uterus removal, and immune compromised patients. Samples of peripheral blood were collected for eNOS analysis. This work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964) and the experiments were performed after the human subjects have signed an understanding and consent declaration. The Health Science Center Committee of the Federal University of Pernambuco previously approved this research under the code CEP/CCS/UFPE 275/08.

2.2 Cytopathological analysis

Cervix material for cytopathological study as soon as collected was maintained and transported in absolute ethanol. All samples were processed by the conventional cytology methodology [25]. The results were categorized using the Bethesda System Nomenclature (2001): negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM), Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US), low grade squamous intra epithelial lesion (LSIL) and high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Unsatisfactory samples for cytological evaluation were excluded

such as: lack of patient identification; broken blade; well-preserved squamous epithelial cells covering less than 10% of the blade and presence of blood; inflammatory exudates; thick areas; poor fixation; artifacts, contamination and all others parameters that could hampering the interpretation of the sample in more than 75%. The presence of small coccobacilli coating the surface of squamous cells (featuring “*clue cells*”), besides the absence of lactobacillus, featuring a misuse of flora was suggestive of bacterial vaginosis [26].

2.3 HPV analysis

2.3.1 HPV molecular identification

Cervical brush samples were transported and maintained in PBS buffer at 4°C up to processing step. Wizard Genomic Kit (Promega, USA) was used for total DNA extraction following the manufacturer's instructions. DNA eluted was stored at -20°C until HPV molecular analysis. HPV identification was performed by PCR using consensus primers GP5+/6+ (Manos *et al.* 1989) and MY09/11 (Franco and Cuzick 2008). The final volume of reaction was 25 µL containing 2 µL of extracted DNA, 12.5 µL GoTaq Green Master Mix (Promega, USA) and 1 µL of each primer (10 pmol/µL). Amplification conditions: 94°C for 3 minutes; 34 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute; final extension at 72°C for 10 min. The consensus primers for L1 region GP5+/6+ amplify 150pb with annealing temperature at 45°C. MY09/11 was used to amplify 450bp of the same gene at 55°C annealing temperature. pBR322 containing HPV16 sequence was used as positive control. β-actin gene was used as reporter to ensure the quality of DNA extraction, amplifying a region of 268pb (Fw: 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3' and Rv: 5'-GGT GAT GAC CTG GCC GTC-3'). Amplification was prepared to the final volume of 25 µL and PCR conditions were: initial denaturation for 10 min at 94°C, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 62°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The final extension step was performed at 72°C for 7 min. Ultrapure water was used as negative control. Samples were assumed as positive after at least two amplifications for MY09/11 or GP5+/6+ among four tests, being two for each primer set. Amplicons were analyzed on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (10mg/ml).

2.3.2 HPV genotyping

The PapilloCheck® Test Kit was used according to manufacturer's instructions (Greiner Bio-One GmbH, Germany). PapilloCheck® Test Kit detects and differentiates 24 types of human papillomavirus, including 18 high-

risk/probable high-risk HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) and 6 low-risk HPV (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44/55) by DNA chip technology. The test cannot distinguish between HPV-55 and HPV-44 due to cross-reaction, and the manufacturer instructions do not differentiate the high-risk HPV of the probable high-risk HPV. Slide scanning and data analysis were performed in Greiner Bio-One CheckScanner™ and CheckReport™ Software, respectively. Only samples positive for HPV-DNA or cytological abnormalities were included in the genotyping kit.

2.4 eNOS polymorphism

Genomic DNA was extracted from EDTA anti-coagulated peripheral venous blood for eNOS polymorphism. Wizard Genomic Kit (Promega, USA) was used for total DNA extraction following the manufacturer's instructions. DNA eluted was stored at -20°C until eNOS polymorphism analysis. eNOS894G>T polymorphisms (rs1799983) analysis was performed by PCR-RFLP, using specific primers: Fw: 5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A-3' and Rv: 5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3'. Amplification conditions were as follow: 94°C for 3 minutes; 34 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, 66°C annealing for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute; final extension at 72°C for 10 min. RFLP was performed by amplicon digestion with BanII from BioLabs (New England, USA) for 1 h at 37°C. Restriction fragments were analyzed on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (10mg/ml). T allele showed 248 bp fragment, while the G allele was visualized as 163 pb and 85 bp fragments. The VNTR 4b/a polymorphism was detected by PCR as previously reported using the following primers: Fw: 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3' and Rv: 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3'. The amplified products were observed on 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide (10mg/ml). The 4b and 4a alleles were visualized as 420 bp and 393 bp, respectively.

2.5 Statistical analysis

Data were statistically analyzed using Prism statistical software (Version 4.03), calculating the crude odds ratio (OR), using 95% confidence intervals (CI) by Fisher's exact test. The Fisher's exact test was considered to be statistically significant $p < 0.05$.

3. Results and discussion

A total of ninety-four patients samples were used for the eNOS polymorphism evaluation. The socio-demographic and clinical aspects of the studied population are shown in Table 1. The majority of the woman has less than two household income and no more than high school educational level. Married women were almost 47% of population studied, more than 60% reported first sexual intercourse after sixteen years and were multiparous. The majority does not use oral contraceptive but reported tubal ligation. Smoking habit and alcohol consumption were less frequent in the population studied.

HPV genotype was determined in thirty-three samples. HPV16 was present in seven samples and HPV 18 was found in only one sample, already infected by HPV16. Seven patients showed cytological abnormalities: one ASC-US, five LSIL and one HSIL. All patients were also infected by HPV, which four were identified as high-risk genotypes.

eNOS 894G>T genotype distribution was 64.9% G/G, 30.8% G/T and 4.2% T/T; while VNTR 4b/4a was 67% 4b/4b and 30.8% 4a/4b. No VNTR 4a/4a genotype was found in this population, and two samples showed uncommon pattern of amplification. Table 2 summarizes the distribution of eNOS 894G>T and VNTR 4b/a polymorphisms according to cytopathology finding, showing higher frequency of G/G and 4b/4b genotypes. Only T/T genotype was associated to cervical lesions, but it is necessary to improve the number of samples to be sure about the role of eNOS 894G>T polymorphism in cervical lesions development. This polymorphism was reported as influencing in colorectal cancer development [27]. VNTR 4b/4a genotypes and allele frequencies did not significantly differ between women with cervical lesions and controls, as observed for vulvar cancer [24] and bladder cancer [28]. However, VNTR already proved to be a risk factor for the development of prostate and bladder cancer [29,30]. Öztürkand cols. (2011) reported VNTR 4a/4a genotype as associated to endometrial cancer, but this behavior could no be observed in our population once this genotype was absent [31].

There is no association of eNOS 894G>T or VNTR 4b/a polymorphisms with HPV infection (Table 3) or HPV risk genotype (Table 4). This observation could be because the HPV infection occurs by direct contact of the virus with the cervical epithelium, without viral circulation in the blood. No association was observed with bacterial vaginosis (Table 5).

We analyzed the association of both polymorphism as contributing to cervical lesion, HPV infection or bacterial vaginosis (Table 6). No statistical significance was observed, but G/T + 4a/4b haplotype presents OR of 5.3 for bacterial vaginosis, while and T/T + 4b/4a shower 5.0 OR values for HPV infection and cervical lesions. Allele combination T + 4a also presented 3.0 OR values for HPV infection.

This study has some limitations that influence the final results. The small number of participants led to the absence of VNTR 4a/4a genotype, avoiding the adequate evaluation of the influence of 4a allele in HPV infection and cervical lesions development. The inclusion of serum samples evaluation, to perform the measurement of nitrite/nitrate in plasma, could allow better understanding of the effect of the SNPs on behavior of NO in these patients.

4. Conclusions

The eNOS 894 T/T, when associated with the genotype eNOS VNTR 4b/4a genotype, can be related to HPV infection. Further studies are needed to confirm the role of eNOS polymorphism in cervical lesions.

Funding

The work was conducted with the project fund provided by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Pernambuco, Brazil and Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), Brazil.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank all the women who participated in the study.

5. References

- [1] D. Sources, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008.; *Int. J. Cancer*. 127 (2010) 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.
- [2] H. Hausen, PAPILLOMAVIRUSES AND CANCER: FROM BASIC STUDIES TO CLINICAL APPLICATION, *Nat. Rev. | CANCER*. 2 (2002) 342–350. doi:10.1038/nrc798.
- [3] S. Outtes, M. Beltra, Site of infections associated with human papillomavirus, *Arch Gynecol Obs. Arch Gynec* (2015) 481–491. doi:10.1007/s00404-014-3480-5.
- [4] N. Sunthamala, C. Pientong, T. Ohno, C. Zhang, A. Bhingare, Y. Kondo, et al., HPV16 E2 protein promotes innate immunity by modulating immunosuppressive status, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446 (2014) 977–982. doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.042.
- [5] R.W. Tindle, cervical cancer, *Nat. Rev. | CANCER*. 2 (2002) 1–7.
- [6] D. Fukumura, S. Kashiwagi, R.K. Jain, The role of nitric oxide in tumour progression, *Nat. Rev. | CANCER*. 6 (2006) 521–534. doi:10.1038/nrc1910.
- [7] S. Korde Choudhari, M. Chaudhary, S. Bagde, A.R. Gadail, V. Joshi, Nitric oxide and cancer: a review, *World J. Surg. Oncol.* 11 (2013) 118. doi:10.1186/1477-7819-11-118.
- [8] R.G. Dias, C.E. Negrão, M.H. Krieger, Review Article Nitric Oxide and the Cardiovascular System : Cell Activation , Vascular Reactivity and Genetic Variant, *Genet. Nitric Oxide Vasc. React.* 44 (2009) 68–75.
- [9] I. Fleming, Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 459 (2010) 793–806. doi:10.1007/s00424-009-0767-7.
- [10] Z. Taimeh, J. Loughran, E.J. Birks, R. Bolli, Vascular endothelial growth factor in heart failure., *Nat. Rev. Cardiol.* 10 (2013) 519–30. doi:10.1038/nrcardio.2013.94.
- [11] S.-S. Xing, X.-Y. Yang, T. Zheng, W.-J. Li, D. Wu, J.-Y. Chi, et al., Salidroside improves endothelial function and alleviates atherosclerosis by activating a mitochondria-related AMPK/PI3K/Akt/eNOS

pathway, *Vascul. Pharmacol.* 72 (2015) 141–152. doi:10.1016/j.vph.2015.07.004.

- [12] F. Zhang, D. Kong, L. Chen, X. Zhang, N. Lian, X. Zhu, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor- γ interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor- β receptor in hepatic stellate cells., *J. Cell Sci.* 127 (2014) 305–14. doi:10.1242/jcs.128306.
- [13] E. Nitric, O. Synthase, P.A. Marsden, H. Henry, Q. Heng, R.J. Stewart, et al., Structure and Chromosomal Localization of the Human Constitutive, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 268 (1993) 17478–17488.
- [14] M.S. Joshi, C. Mineo, P.W. Shaul, J.A. Bauer, Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium : altered caveolar localization and impaired response to shear, (n.d.) 2655–2663. doi:10.1096/fj.06-7088com.
- [15] M. Zhang, C. Zhang, Y.H. Shen, J. Wang, X.N. Li, Y. Zhang, et al., Biogenesis of Short Intronic Repeat 27-Nucleotide Small RNA from Endothelial Nitric-oxide Synthase Gene *, 283 (2008) 14685–14693. doi:10.1074/jbc.M801933200.
- [16] G.E. Cooke, A. Doshi, P.F. Binkley, Endothelial nitric oxide synthase gene : prospects for treatment of heart disease, 8 (2007) 1723–1734.
- [17] M. Zhang, C. Zhang, Y.H. Shen, J. Wang, X. Li, L. Chen, et al., Effect of 27nt Small RNA on Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression, 19 (2008) 3997–4005. doi:10.1091/mbc.E07.
- [18] L. Zhang, L.M. Chen, M.N. Wang, X.J. Chen, N. Li, Y. De Huang, et al., The G894t , T-786c and 4b / a polymorphisms in Enos gene and cancer risk : a meta-analysis, *J. Evid. Based. Med.* 7 (2014) 263–269. doi:10.1111/jebm.12126.
- [19] Y. Hao, R. Montiel, Y. Huang, Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G > T polymorphism is associated with breast cancer risk : a meta-analysis, *Breast Cancer Res Treat.* (2010) 809–813. doi:10.1007/s10549-010-0833-z.
- [20] C. Risk, eNOS Genetic Polymorphisms and Cancer Risk A Meta-Analysis and a Case – Control Study of Breast Cancer, *Medicine (Baltimore)*. 94 (2015) 1–10. doi:10.1097/MD.0000000000000972.

- [21] G. Ghilardi, M.L. Biondi, F. Cecchini, M. Demonti, E. Guagnellini, R. Scorza, Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T ! 786C polymorphism of NOS3 gene, NITRIC OXIDE. 9 (2003) 118–122. doi:10.1016/j.niox.2003.09.002.
- [22] K.L.Æ.J. Choi, Æ.J. Eun, D.N.Æ.S. Ahn, Æ.W. Han, K.Y.Æ. Richard, B.H.Æ. Daehee, Genetic polymorphisms of NOS3 are associated with the risk of invasive breast cancer with lymph node involvement, EPIDEMIOLOGY. (2007) 433–438. doi:10.1007/s10549-007-9506-y.
- [23] O. Investigation, Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with endometrial carcinoma : a preliminary study, J Turkish-German Gynecol Assoc. 12 (2011) 229–233. doi:10.5152/jtgga.2011.47.
- [24] E. Riener, L.A. Hefler, C. Grimm, A. Galid, R. Zeillinger, D. Tong-cacsire, et al., Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in women with vulvar cancer, Gynecol. Oncol. 93 (2004) 686–690. doi:10.1016/j.ygyno.2004.03.030.
- [25] V. Karantza, The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis, 2 (2012) 1–13. doi:10.3389/fonc.2012.00171.
- [26] R. Nayar, D. Solomon, Second edition of ' The Bethesda System for reporting cervical cytology ' – atlas , website , and Bethesda interobserver reproducibility project, Cytojournal. 2 (2004) 1–2. doi:10.1186/1742-6413-1-4.
- [27] M.J. Jang, Y.J. Jeon, J.W. Kim, S.Y. Chong, S.P. Hong, D. Oh, et al., Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population, Gene. 512 (2013) 275–281. doi:10.1016/j.gene.2012.10.032.
- [28] F. Polat, S.B. Diler, İ. Azazi, A. Öden, T-786C , G894T , and Intron 4 VNTR (4a / b) Polymorphisms of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Bladder Cancer Cases, 16 (2015) 2199–2202.
- [29] M.R. Safarinejad, S. Safarinejad, N. Shafiei, S. Safarinejad, Effects of the T-786C, G894T, and Intron VNTR 4b/a polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer., Urol. Oncol. 31 (2013) 1132–40. doi:10.1016/j.urolonc.2012.01.002.

- [30] A.S. Amasyali, C. Kucukgergin, S. Erdem, O. Sanli, S. Seckin, I. Nane, Nitric Oxide Synthase (eNOS4a/b) Gene Polymorphism is Associated with Tumor Recurrence and Progression in Superficial Bladder Cancer Cases., *J. Urol.* 188 (2012) 2398–403. doi:10.1016/j.juro.2012.07.096.
- [31] E. Oztürk, O. Balat, S. Pehlivan, M.G. Uğur, Y. Ozkan, T. Sever, et al., Nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish women with idiopathic recurrent miscarriage., *J. Turkish Ger. Gynecol. Assoc.* 12 (2011) 234–8. doi:10.5152/jtgga.2011.48.

Figure 1. Endothelial growth factor (VEGF), bradykinin (BK), the shear stress and epidermal growth factor (EGF) promote the production of NO by sequential activation of signaling pathways in endothelial cells. Therefore, it appears that the increase in eNOS activity promotes tumor progression, since VEGF is activated and angiogenesis is induced; BK and shear stress induce the cell cycle and EGF signaling increases the synthesis of proteins for cell growth.

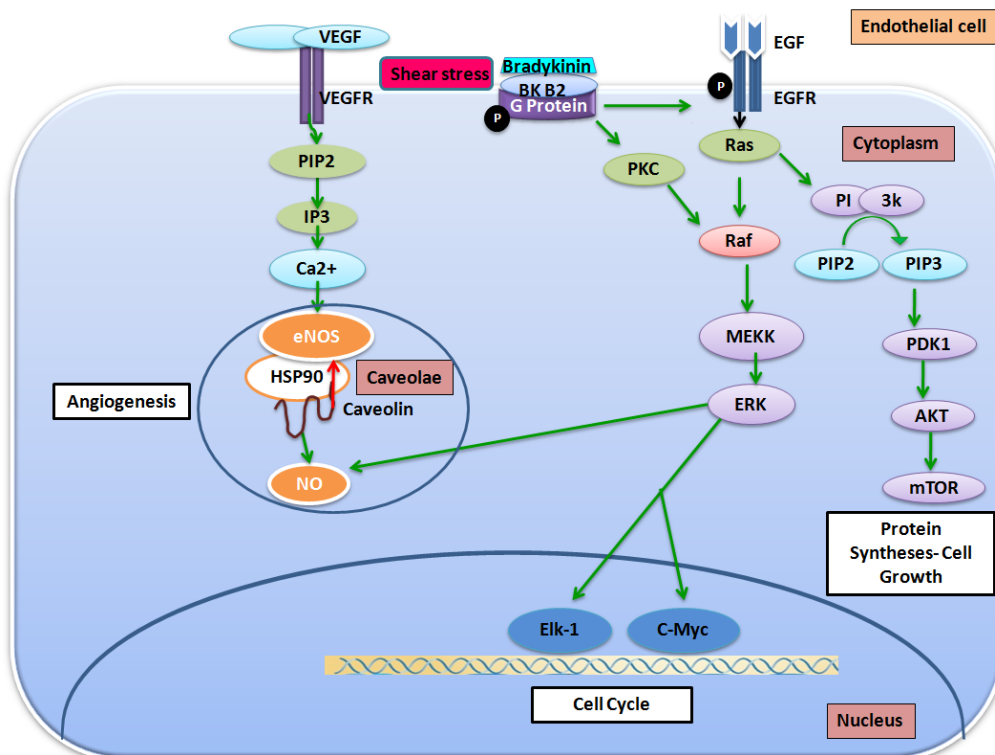


Table 1. Socio-demographic and clinical profile of 94 patients enrolled in the study.

Characteristics	N	(%)
Household income, minimum wage (R\$) ^{a,b}		
<2	70	74.5
2-5	21	22.3
>5	1	1.1
Educational level ^c		
High school or less	89	94.7
Incomplete college	3	3.2
College graduate	1	1.1
Matrimonial status		
Single	36	38.3
Married	44	46.8
Divorced	10	10.6
Widow	4	4.2
Age of first sexual intercourse, years ^d		
<16	30	31.9
≥16	61	64.9
Sexual partners ^b		
<3	45	47.9
3-7	39	41.5
>7	8	8.5
Parity		
Nulliparous	13	13.8

Primiparous	18	19.1
Multiparous (2-11)	59	62.7
Abortion ^e		
Yes (1-5)	31	32.9
No	46	48.9
Oral contraceptive ^c		
Yes	5	5.3
No	88	93.6
Tuballigation ^c		
Yes	35	37.2
No	58	61.7
Smoking habit		
Yes	17	18.1
No	77	81.9
Alcoholconsumption		
Yes	42	44.6
No	52	55.3

^a:

minimum wage = R\$ 622.00; ^b: 2 patients did not answer the question; ^c: 1 patients did not answer the question; ^d: 3 patients did not answer the question; ^e: excluding 17 patients that never were pregnant.

Table 2. eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles according to the cytopathology findings.

Variant		Cytopathology		p-value	OR (95% CI)
		Negative (%)	Positive (%)		
Genotype					
894G>T	G/G	58 (61.7)	3 (3.2)		Reference
	G/T	25 (26.6)	4 (4.2)	0.20	3.09 (0.64-14.85)
	T/T	1 (1.1)	3 (3.2)	0.0018	58.0 (4.55-738.4)
4b/4a	4b/4b	55 (58.5)	8 (8.5)		Reference
	4a/4b	27 (28.7)	2 (2.1)	0.50	0.50 (0.10-2.56)
Allele					
894G>T	G	83 (88.3)	7 (7.4)		Reference
	T	26 (27.6)	7 (7.4)	0.05	3.19 (1.03-9.94)
4b/4a	4b	82 (87.2)	10 (10.6)		Reference
	4a	27 (28.7)	2 (2.1)	0.73	0.61 (0.12-2.95)

Table 3. eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles, according to the presence of HPV-DNA in cervical samples.

Variant		HPV-DNA		p-value	OR (95% CI)
		Negative (%)	Positive (%)		
Genotype					
894G>T	G/G	36 (38.3)	25 (26.6)		Reference
	G/T	15 (15.9)	14 (14.9)	0.64	1.34 (0.55-3.27)
	T/T	2 (2.1)	2 (2.1)	1.00	1.44 (0.18-10.92)
4a/b	4b/4b	34 (36.2)	29 (30.8)		Reference
	4a/4b	18 (19.1)	11 (11.7)	0.50	0.71 (0.29-1.76)
Allele					
894G>T	G	32 (34.0)	28 (29.8)		Reference
	T	12 (12.7)	14 (14.9)	0.64	1.33 (0.52-3.35)
4a/b	4b	52 (55.3)	40 (42.5)		Reference
	4a	18 (19.1)	11 (11.7)	0.67	0.79 (0.33-1.87)

Table 4. eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles, according to the HPV genotyping.

Variant		HPV genotyping		p-value	OR (95% CI)
		LR-HPV (%)	HR-HPV (%)		
Genotype					
894G>T	G/G	12 (36.4)	12 (36.4)		Reference
	G/T	8 (24.2)	11 (33.3)	0.75	1.37 (0.40-4.62)
	T/T	0	2 (6.1)	-	-
4a/b	4b/4b	16 (48.5)	22 (66.7)		Reference
	4a/4b	8 (24.2)	7 (21.2)	0.54	0.63 (0.19-2.12)
Allele					
894G>T	G	25 (75.7)	27 (81.8)		Reference
	T	8 (24.2)	13 (39.4)	0.60	1.50 (0.53-4.24)
4b/4a	4b	24 (72.7)	29 (87.9)		Reference
	4a	8 (24.2)	7 (21.2)	0.77	0.72 (0.22-2.29)

Table 5. eNOS 894G>T and VNTR 4b/a genotypes and alleles, according to the presence of bacterial vaginosis.

Variant		Bacterial vaginosis		<i>p-value</i>	OR (95% CI)
		Negative (%)	Positive (%)		
Genotype					
894G>T	G/G	41 (43.6)	17 (18.1)		Reference
	G/T	17 (18.1)	11 (11.7)	0.46	1.56 (0.60-4.02)
	T/T	3 (3.2)	1 (1.1)	1	0.80 (0.08-8.29)
4a/b	4b/4b	48 (51.1)	18 (19.1)		Reference
	4a/4b	19 (20.2)	11 (11.7)	0.47	1.54 (0.61-3.87)
Allele					
894G>T	G	58 (61.7)	28 (29.8)		Reference
	T	20 (21.3)	12 (12.8)	0.66	1.24 (0.53-2.90)
4b/4a	4b	47 (50)	28 (29.8)		Reference
	4a	19 (20.2)	11 (11.7)	1.00	0.97 (0.40-2.33)

(*) Four patients were undetermined.

Table 6. eNOS 894G>T and VNTR 4b/4a polymorphisms combination according to cervical infection and lesions.

eNOS 894G>T + VNTR 4b/4a	N	Cytopathology			HPV-DNA			Bacterialvaginosis		
		Negative	Positive	<i>p</i> -value	Negative	Positive	<i>p</i> -value	Negative	Positive	<i>p</i> -value
				(OR 95% CI)			(OR 95% CI)			(OR 95% CI)
<i>Genotypecombination</i>										
GG + 4b/4b	37	35	2	1.00	22	15	1.00	26	9	1.00
GG + 4a/4b	22	21	1	0.83 (0.07-9.7)	13	9	1.01 (0.34-2.9)	15	6	0.83 (0.07-9.7)
GT + 4b/4b	23	19	4	0.55	10	13	0.16	16	6	0.14
GT + 4a/4b	6	6	0	0.33 (0.01-7.1)	5	1	0.15 (0.01-1.5)	2	4	5.3 (0.76-37.1)
TT + 4b/4b	3	1	2	1.00	2	1	1.00	2	1	1.00
TT + 4b/4a	1	0	1	1.8 (0.04-79.5)	0	1	5.0 (0.11-220)	1	0	0.55 (0.01-24.5)
<i>Allelecombination</i>										
G + 4b	88	81	7	0.68	50	38	0.52	59	25	0.48
G + 4a	28	27	1	0.42 (0.05-3.6)	18	10	0.73 (0.30-1.7)	17	10	1.38 (0.55-3.4)
T + 4b	4	1	3	1.00	2	2	1.00	3	1	1.00
T + 4a	1	0	1	1.29 (0.03-53.6)	0	1	3.0 (0.07-115)	1	0	0.77 (0.02-32.4)

6 CONCLUSÃO

A infecção pelo HPV está relacionadas à polimorfismos no gene eNOS, responsável pela liberação de NO, componente importante na imunidade inata. Análise dos polimorfismo 894G>T e VNTR 4b/4a demonstraram que a combinação dos genótipos T/T e 4b/4a pode estar relacionada com a infecção pelo HPV.

Estudo adicionais serão necessários para compreender as implicações destes polimorfismos da eNOS na progressão da lesão cervical e na instalação do câncer.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar, como voluntária, na pesquisa “SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DO COLO UTERINO”. 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 Pernambuco pelo telefone 81 21268588.

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, 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.
- 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 na pesquisa.
- C) Com a participação no projeto as 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.
- C) 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.
- D) As informações obtidas desta pesquisa serão publicadas em congressos, jornais e revistas científicas, bem como, veiculadas em meios de acesso do público em geral. Os produtos e serviços obtidos a partir desta pesquisa serão disponibilizados a toda a população, principalmente aos colaboradores do referido projeto.

ANEXO II

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO		DATA:	
Grupo do participante	☐ caso ☐ controle (preenchimento posterior)		
Número do prontuário	Código PRONEX		
Local de coleta			
2. INFORMAÇÕES PESSOAIS			
Nome			
Endereço de residência			
Bairro	CEP		
Zona	☐ Urbana ☐ Rural	Tempo de residência atual:	
Município	Estado		
Condições da moradia			
☐ alvenaria ☐ pau-a-pique ☐ água encanada ☐ esgoto encanado ☐ criação/manejo de bovinos ☐ criação/manejo de outro animais. Quais?			
Proximidades:			
☐ mineradora ☐ arte c/ pedra sabão ☐ fábricas/indústrias ☐ outros			
Telefone			
Data de nascimento	Idade	Sexo:	☐ F ☐ M
Residência anterior:	Cidade:	Estado:	
Tempo de residência			
Proximidades:			
☐ mineradora ☐ arte c/ pedra sabão ☐ fábricas/indústrias ☐ outros			
Localidade em que nasceu:			
Cidade:			
Estado:			
Tempo de residência			
Zona: ☐ Urbana ☐ Rural			
Proximidades:			
☐ mineradora ☐ arte c/ pedra sabão ☐ fábricas/indústrias ☐ outros			
3. SITUAÇÃO SOCIOECONOMICA E DEMOGRAFICA			
Etnia ☐ branca ☐ parda ☐ preta ☐ amarela ☐ indígena			
Situação conjugal: ☐ solteira ☐ casada ☐ viúva ☐ separada ☐ união consensual (estável)			
Profissão:	Tempo:	CBO	(cod. Posterior)
Qual é a sua principal ocupação? CBO (cód. Posterior)			
(Por Exemplo: Motorista de ônibus, mecânico de automóveis, Office boy, auxiliar de pesquisa, veterinária, etc.)			
Onde a Sra. trabalha?	COD	(cód. Posterior)	
(Por exemplo: Oficina de automóveis, escritório de contabilidade, veterinária, restaurante, etc.)			
Qual foi a ocupação que a Sra. teve por mais tempo? COD (cód. Posterior)			
(Por exemplo: Auxiliar de escritório, arquiteta, enfermeira, bombeiro hidráulico, etc.)			
A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho, em que ficava em contato com produtos químicos?			
☐ sim ☐ não ☐ NS/NR			
Que tipos de Produtos Químicos?			
☐ Tintas ☐ Combustíveis/lubrificantes ☐ preservativos de madeira ☐ Solvente ☐ inseticidas, pesticidas e herbicidas ☐ Corantes e pigmentos ☐ Resinas ☐ ácidos e cáusticos fortes ☐ produto para fabricação de plásticos ☐ produto para fabricação de borracha ☐ NS/NR ☐ Outros produtos químicos (especifique) COD (cód. Posterior)			
A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com metais pesados, como cromo, cádmio, níquel ou outros?			
☐ sim ☐ não ☐ NS/NR			
Que tipo de metais pesados?			
☐ Cromo ☐ Cádmio ☐ Níquel ☐ Mercúrio ☐ Chumbo ☐ NS/NR ☐ Outros metais pesados (especifique) COD (cód. Posterior)			

ANEXO III



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 403/2008 - CEP/CCS

Recife, 18 de Dezembro de 2008

Registro do SISNEP FR – 215803

CAAE – 0267.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 275/08

Título: "Análise do Perfil Epidemiológico de Infecções Causadas pelo Papilomavírus Humano em Mulheres Atendidas pelo Programa Saúde da Família na Cidade de Olinda-PE"

Pesquisador Responsável: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 18 de dezembro de 2008.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Vice-Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A

Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE