



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JANSSEN LOIOLA MELO VASCONCELOS

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR TLR9 (RS187084)
EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

SOBRAL – CE

2024

JANSSEN LOIOLA MELO VASCONCELOS

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR TLR9 (RS187084) EM
PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças crônicas e câncer.

Orientador: Prof. Dr. José Juvenal Linhares

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Weiny
Barbalho Silva

SOBRAL – CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V1a VASCONCELOS, JANSSEN.
ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR TLR9 (RS187084) EM PACIENTES
COM CÂNCER DE COLO UTERINO : DISSERTAÇÃO DE MESTRADO / JANSSEN VASCONCELOS.
– 2024.
59 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2024.
Orientação: Prof. Dr. JOSÉ JUVENAL LINHARES.
Coorientação: Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva.
1. POLIMORFISMO. 2. CÂNCER DE COLO UTERINO. 3. RECEPTOR TOOL LIKE. I. Título.
CDD 610
-

JANSSEN LOIOLA MELO VASCONCELOS

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR TLR9 (RS187084) EM
PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Ceará, como
requisito à obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde. Área de concentração:
Doenças crônicas e câncer.

Orientador: Prof. Dr. José Juvenal Linhares

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Weiny
Barbalho Silva

Aprovada em: ____ / ____ / 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Juvenal Linhares (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC) -*Campus* Sobral

Prof. Dr. Daniel Hardy Melo (Membro Interno)

Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa (Membro Externo)

Centro Universitário INTA (UNINTA)- *Campus* Sobral

AGRADECIMENTO

A Deus, que sempre nos fortalece em momentos difíceis e nos mostra o caminho.

À minha esposa Thaís Parente e ao meu filho Mateus Loiola, por todo amor oferecido, pela compreensão quanto as ausências e pelo estímulo de continuar.

À minha família, meus pais e irmãos, pelo exemplo de perseverança e vontade de sempre buscar algo melhor.

Ao Professor Juvenal Linhares, grande exemplo de profissional e pessoa desde os tempos de faculdade, pela parceria de vários outros trabalhos acadêmicos e pela parceria profissional no cotidiano.

Ao Professor Anderson Weiny, por todo empenho, amizade e organização desde o início dessa jornada.

À Professora Louhana Pinheiro, que mesmo em tempos difíceis foi crucial nas análises deste trabalho, sempre pensando em contribuir e nos ajudar. Sem sua atuação este trabalho não seria possível.

Ao Professor Paulo Goberlânio de Barros, pela amizade e análise estatística rápida e eficiente.

Ao amigo e colega de Mestrado Acadêmico Laiton Silva por toda ajuda na elaboração desta metodologia.

A todos os estudantes de iniciação científica que contribuíram constantemente na coleta de dados.

Aos parceiros e amigos de trabalho diário: Doutor Diego Bezerra, Doutor Samuel Carneiro, Tatiana Araújo e Luzilane Torres.

Por fim, às mulheres participantes desta pesquisa, por nos oferecerem a oportunidade de tentar evoluir na abordagem de uma doença tão avassaladora.

RESUMO

O câncer de colo uterino (CC) corresponde ao terceiro tipo mais prevalente no Brasil, bem como a quarta causa de morte entre mulheres. Seu desenvolvimento está ligado à infecção persistente por subtipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV), porém uma minoria de portadoras do vírus desenvolve câncer. Dentre os fatores imunológicos envolvidos nesta progressão estão os receptores *Toll- like* (TLR). Polimorfismos que geram deleções no TLR9 talvez estejam relacionados a uma maior suscetibilidade e a maior progressão de doença. A pesquisa atual teve o objetivo de avaliar a relação da presença do polimorfismo no receptor TLR9 (alelo rs187084) nas mulheres com diagnóstico de CC, bem como a sua associação com os desfechos da doença. Foi um estudo observacional e prospectivo, tipo caso- controle. Foram colhidas amostras de escovado bucal de 83 mulheres, 43 casos e 40 controles sadios. As amostras teciduais obtidas foram conservadas para posterior extração de DNA genômico e realização da técnica de PCR em protocolo específico. Foi também realizada entrevista e análise de prontuário para comparação dos dados epidemiológicos, informações da apresentação da doença e suas características, da avaliação dos tratamentos escolhidos, bem como seguimento oncológico para analisar os desfechos. A média de idade foi de 46 anos e a maior parte assintomática ao diagnóstico. Demais achados sociodemográficos também foram condizentes com a literatura nacional descrita. O tipo histológico de carcinoma epidermoide (CEC) foi o predominante com 40 casos e a maioria das mulheres foram diagnosticadas em estadiamento I/II, com predomínio do estágio IIB (acometimento parametrial). Em razão disso, o tratamento trimodal baseado em radioterapia foi o de escolha na maioria, com 36 casos, sendo intervenção cirúrgica opção inicialmente em 9 casos. A taxa de recidiva foi alta (34,2%) com 13 pacientes, no período médio de seguimento de 36,5 meses. Na análise do polimorfismo, a presença deste não aumentou o risco de câncer ($p=0,749$), porém as pacientes com CEC apresentaram mais o genótipo T/C e TT ($p=0,044$). A presença de heterozigose T/C foi mais associada ao tratamento trimodal, isto é, a doença mais avançada, bem como a presença de homozigose TT esteve mais relacionada à progressão hepática. Em razão da baixa taxa de óbitos (05 casos) não foi possível comparação de Sobrevida Global, porém avaliando a curva de sobrevida livre de progressão, esta foi pior no grupo Heterozigótico T/C ($p=0,031$). Em conclusão, este estudo sugeriu que, na nossa população, este polimorfismo não pode ser associado a um aumento no risco de CC. Porém, os genótipos T/C e TT parecem estar mais presentes nas pacientes que já progrediram para câncer, bem como estão relacionados a uma pior sobrevida livre de progressão e recidiva hepática, respectivamente.

Palavras- chave: neoplasia; polimorfismo genético; receptor toll- like; genotipagem.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) corresponds to the third most prevalent type in Brazil, as well as the fourth cause of death among women. Its development is linked to persistent infection with high-risk subtypes of the Human Papillomavirus (HPV), but a minority of virus carriers develop cancer. Among the immunological factors involved in this progression are *Toll-like* receptors (TLR). Polymorphisms that generate deletions in TLR9 may be related to greater susceptibility and disease progression. The current research aimed to evaluate the relationship between the presence of the polymorphism in the TLR9 receptor (allele rs187084) in women diagnosed with CC, as well as its association with disease outcomes. It was an observational and prospective, case-control study. Mouth brush samples were collected from 83 women, 43 cases and 40 healthy controls. The tissue samples obtained were preserved for subsequent extraction of genomic DNA and performance of the PCR technique using a specific protocol. An interview and medical record analysis were also carried out to compare epidemiological data, information on the presentation of the disease and its characteristics, evaluation of the chosen treatments, as well as oncological follow-up to analyze the outcomes. The average age was 46 years old and the majority were asymptomatic at diagnosis. Other sociodemographic findings were also consistent with the national literature described. The histological type of squamous cell carcinoma (SCC) was the predominant one with 40 cases and the majority of women were diagnosed in stage I/II, with a predominance of stage IIB (parametrial involvement). Because of this, trimodal treatment based on radiotherapy was the choice in the majority, with 36 cases, with surgery being an option initially in 9 cases. The recurrence rate was high (34.2%) with 13 patients, in a mean follow-up period of 36.5 months. In the polymorphism analysis, its presence did not increase the risk of cancer ($p=0.749$), but patients with SCC presented more T/C and TT genotypes ($p=0.044$). The presence of T/C heterozygosity was more associated with trimodal treatment, in other words, more advanced disease, and the presence of TT homozygosity was more related to liver progression. Due to the low death rate (05 cases), it was not possible to compare Overall Survival, but when evaluating the progression-free Survival curve, it was worse in the Heterozygous T/C group ($p=0.031$). In conclusion, this study suggested that, in our population, this polymorphism cannot be associated with an increased risk of CC. However, the T/C and TT genotypes seem to be more present in patients who have already progressed to cancer, as well as being related to worse progression-free Survival and liver recurrence, respectively.

Keywords: neoplasm; genetic polymorphism; toll- like receptor; genotyping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do genoma do HPV16, subtipo de alto risco, descrevendo os principais componentes da estrutura viral. <i>Regiões Early, late e LCR (Long Regulatory Region)</i>	16
Figura 2 - Estadiamento para Câncer de Colo Uterino segundo a FIGO 2018	18
Figura 3 - DFS em comparação quanto a presença do polimorfismo. *p=0,177, Teste Log-Rank Mantel-Cox	40
Figura 4 - DFS comparando alelo T homozigótico x CC- T/C. *p=0,193, Teste Log-Rank Mantel-Cox	40
Figura 5 - DFS comparando alelo C homozigótico x TT- T/C. *p=0,440, Teste Log-Rank Mantel-Cox	41
Figura 6 - DFS quando comparados Homozigoto e Heterozigoto. Curva com Significância estatística. *p=0,031, Teste Log-Rank Mantel-Cox	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Dados demográficos, de sintomas e histórico ginecológico dos grupos de mulheres entrevistadas	33
Tabela 2 - Dados relativos a estadiamento inicial e tratamento proposto	35
Tabela 3 - Dados relativos aos tipos de recidiva e tratamento proposto	36
Tabela 4 - Distribuição genotípica e frequência alélica dos grupos envolvidos	37
Tabela 5 - Relação genotípica e frequência alélica baseados nos tipos histológicos do tumor de colo uterino	38
Tabela 6 - Relação genotípica do alelo T em relação ao tipo histológico do tumor de colo uterino	38
Tabela 7 - Relação genotípica do gene T/C com o tratamento oncológico proposto	38
Tabela 8 - Relação genotípica e presença de recidiva	39
Tabela 9 - Relação genotípica e presença de recidiva em Fígado	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

et. al. - Abreviação em latim que significa "e outros"

HPV - Papiloma Vírus Humano

TLR - *Toll Like Receptor*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

CC - Câncer Cervical

PET/CT – Tomografia com emissão de Pósitrons

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

SIGTAP – Sistema de Gerenciamento de Tabela de Procedimentos

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

MHC/ HLA – Sistema de antígeno Leucocitário Humano

KIR - Receptor de células *natural killer*

NK - *natural killer*

CCR5- Quimioscina tipo 5

SCMS – Santa Casa de Misericórdia de Sobral

CEM – Centro de especialidades Médicas

qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase

LBMO - Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento

NUBEX - Núcleo de Biologia Experimental

UNIFOR - Universidade de Fortaleza

H₂O – Fórmula química da água

EPM – Erro padrão de Média

OR – *Oddis Ratio*

IC – Intervalo de confiança

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

UVA/ CE – Universidade Estadual Vale do Acaraú

CEC – Carcinoma espinocelular

DFS – Sobrevida Livre de recorrência

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

cm – centímetros

mm – milímetros

°C – graus Celsius

ml – mililitros

uL – microlitros

g – grama

ng/ uL – nanogramas por microlitros

nM – nanômetros

p – probabilidade de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Aspectos gerais sobre desenvolvimento do câncer e suas particularidades genéticas	13
2.2	Câncer de colo uterino e o Papilomavírus Humano (HPV)	15
2.3	Polimorfismos genéticos e o câncer	20
2.4	Polimorfismos genéticos associados ao câncer de colo uterino	22
2.5	O polimorfismo do receptor tlr9 e o câncer de colo uterino	24
3	JUSTIFICATIVA	25
4	HIPÓTESE	26
5	OBJETIVOS	27
5.1	OBJETIVO GERAL	27
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
6	MATERIAL E MÉTODOS	28
6.1	Desenho (Tipo de Estudo)	28
6.2	Casuística	28
6.3	Critérios	28
6.3.1	<i>Critérios de inclusão</i>	29
6.3.2	<i>Critérios de exclusão</i>	29
6.4	Coleta dos dados	29
6.5	Ensaio Laboratorial	29
6.5.1	<i>Extração de DNA</i>	30
6.5.2	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)</i>	30
6.6	Análise Estatística	31
6.7	Aspectos éticos da pesquisa	31
7	RESULTADOS	33
8	DISCUSSÃO	42
9	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	54
	APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS	57

1 INTRODUÇÃO

O útero é o órgão mais importante do aparelho reprodutor feminino, dividido basicamente em duas regiões: corpo e colo. Este último corresponde à porção inferior, mede em média 2,5 cm nas mulheres não grávidas e apresenta relação direta com a cavidade vaginal (Faizan; Muppidi, 2024).

O câncer de colo uterino (ou cervical), excetuando-se os tumores de pele não melanoma, figura-se como terceiro tipo mais prevalente no Brasil de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), bem como a quarta causa de morte entre mulheres no nosso país (Santos *et al.*, 2023).

Este tipo de câncer consiste em um desafio desde o diagnóstico, com necessidade de rastreio populacional por meio de exames de colpocitologia oncótica (Papanicolau) de rotina, biópsias e exames de imagem (Organização Mundial De Saúde, 2020). O tratamento deste tipo de doença maligna envolve, na maioria das vezes, procedimentos cirúrgicos complexos e/ou radioterapia associada a quimioterapia nos casos mais localmente avançados. Em casos mais avançados a taxa de cura é menor, ou muitas vezes levando a cirurgias e procedimentos mutilantes como as exenterações pélvicas e necessidade de ostomias definitivas. Procedimentos estes realizados muitas vezes em mulheres jovens. Na presença de metástases à distância, formalmente as chances de cura são próximas a zero e entender mais sobre o processo imunomodulador envolvido neste tumor, incluindo alguns tipos de polimorfismos genéticos, em nossa população, pode auxiliar na compreensão da biologia tumoral, bem como na evolução do seu tratamento (Sharma; Deep; Sharma, 2020).

O principal fator de risco do câncer de colo uterino está ligado à infecção persistente por subtipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV), notadamente os tipos 16,18, 31 e 52. O HPV corresponde a um vírus de DNA, transmitido de forma sexual e bastante prevalente na população mundial (Oyouni, 2023). Porém, felizmente a maioria das infecções pelo HPV são assintomáticas e apresentam resolução espontânea. Nos casos de infecção persistente na mucosa do colo uterino há uma tendência de progressão para Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e tendência a invasão tecidual (Douzandeh-Mobarrez *et al.*, 2022; Oyouni, 2023).

A célula infectada desenvolve mecanismos de evasão ao sistema imune, com o intuito de proliferação contínua. Dentre os fatores imunológicos envolvidos nesta regulação da infecção pelo HPV e sua progressão, estão os receptores *Toll- like* (TLR), que consistem em receptores de membrana celular auxiliares na identificação de antígenos tumorais e

apresentação ao sistema imune (Douzandeh-Mobarrez *et al.*, 2022). Existem vários tipos diferentes destes receptores, como os TLR 2 e 4, associados no reconhecimento de bactérias Gram positivas e negativas, respectivamente. Um outro tipo é o TLR9, também associado no reconhecimento de bactérias, porém atua juntamente aos componentes virais do HPV (Zhang *et al.*, 2023). Britto *et al.* (2020) sugere que as proteínas E6 e E7 do HPV regulam o microambiente tumoral a partir de deleções nos TLR9, o que faz desse receptor uma importante arma na imunologia do câncer de colo uterino (CC).

Os receptores Toll-like (TLR) também desempenham um papel importante no reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos, desencadeando respostas imunológicas (Xun *et al.*, 2021). Em relação ao câncer de colo do útero, estudos têm destacado a relevância dos TLRs na modulação do microambiente tumoral. O TLR9, em particular, tem sido objeto de investigação devido à sua capacidade de reconhecer padrões de DNA viral, como os presentes no papilomavírus humano (HPV), um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento do câncer cervical (Douzandeh-Mobarrez *et al.*, 2022). Alterações genéticas nos receptores TLR podem influenciar a resposta imunológica antitumoral, impactando a progressão e a resposta ao tratamento do câncer de colo do útero. Portanto, compreender a relação entre os receptores Toll-like e o câncer de colo do útero pode abrir novas perspectivas para estratégias terapêuticas e diagnósticos mais precisos. O estudo do polimorfismo do receptor TLR9 (rs187084) destaca-se como uma abordagem promissora para avaliar a variabilidade genética e sua associação com o risco e a progressão do câncer de colo do útero.

Diversas séries em população chinesa (Chen, 2012), italiana (Cannella, 2015) e indiana (Pandey, 2019) mostraram relação do polimorfismo no alelo rs187084 TLR9 na suscetibilidade à infecção persistente pelo HPV e na progressão para câncer de colo uterino.

Para melhor compreensão dos aspectos relacionados a este estudo, segue uma breve revisão de literatura que abordará os seguintes tópicos: Aspectos gerais do desenvolvimento do câncer; Câncer de colo uterino e o HPV; Polimorfismos genéticos e desenvolvimento de câncer; Polimorfismo genéticos associados ao câncer de colo uterino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais sobre desenvolvimento do Câncer e suas particularidades genéticas

O câncer é definido como uma doença genômica e surge a partir de alterações cumulativas no material genético (ácido desoxirribonucleico- DNA) de células normais que sofrem transformações até se tornarem malignas. Aquelas células capazes de uma divisão irrestrita geram multiplicação, o que traz oportunidades de alterações no material genético. De maneira geral, define-se como malignas as neoplasias com capacidade de invasividade e evolução para metástase. Todos os processos para gerar um câncer ocorrem em múltiplas etapas e podem envolver dezenas até centenas de genes (Park; Pyun; Park, 2020).

Em tecidos normais, as taxas de crescimento e de morte celular estão em equilíbrio. Porém, no câncer esse equilíbrio é rompido por diversas causas e ocorre uma perda no controle do crescimento celular e/ou mecanismos de apoptose (também chamada de morte celular programada). Existem vários fatores que podem levar ao desenvolvimento do câncer, desde fenômenos ambientais, a fatores intrínsecos e a contribuição da herança genética (N Kontomanolis *et al.*, 2021; Park; Pyun; Park, 2020).

Assim, as mutações genéticas podem ser adquiridas ao longo da vida devido a exposições a agentes carcinogênicos, como radiações, produtos químicos ou infecções virais persistentes. Além disso, alguns indivíduos podem herdar predisposições genéticas que aumentam a suscetibilidade ao câncer (Rajaram *et al.*, 2021). As células cancerígenas frequentemente acumulam alterações em genes-chave, como oncogenes que promovem o crescimento celular descontrolado e genes supressores de tumor que normalmente inibem a progressão do câncer. A instabilidade genômica, a epigenética e a interação complexa entre diferentes vias de sinalização celular são aspectos importantes do desenvolvimento tumoral (Volkova *et al.*, 2021). Compreender as particularidades genéticas associadas ao câncer é fundamental para avanços no diagnóstico precoce, tratamento direcionado e estratégias de prevenção.

Mutações e polimorfismos são caracterizados por alterações nas sequências de nucleotídeos do material genético, porém possuem características distintas em relação a sua frequência em uma população. As mutações são representadas pela substituição de bases e alterações na organização ou no tamanho das sequências de DNA. Os polimorfismos são variantes individuais no genoma e ocorrem na população geral de forma estável, onde sua frequência é de 1% ou superior. Uma das formas mais estudadas são os polimorfismos de

nucleotídeo único (SNP), os quais são resultantes da substituição de um nucleotídeo por outro (N Kontomanolis *et al.*, 2021).

Inúmeras anomalias podem ocorrer para gerar as alterações necessárias, como mutações intragênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos (como metilação e acetilação). As mutações encontradas na maioria dos tumores sólidos não obedecem a um padrão simples. Raramente é identificada uma única mutação (Butera; Melino; Amelio, 2021)

Existem seis processos associados ao desenvolvimento e proliferação de uma célula tumoral: sinalização para proliferação celular sustentada, diminuição supressores de crescimento, resistência à morte celular, permitir a replicação contínua, induzir a angiogênese e ativar a invasão e metástase (Madan *et al.*, 2022).

Pode-se dividir as etapas da carcinogênese em três etapas: iniciação, promoção e progressão. Vale lembrar que esta divisão é apenas didática, pois existe interseção e simultaneidade nestas etapas. A iniciação caracteriza-se por mutações em uma célula-tronco, normalmente associada a inativação de genes supressores de tumor ou ativação de protooncogenes. Na promoção ocorre a multiplicação das células alteradas e proliferação dos fatores de crescimento celular envolvidos, bem como ativação dos mecanismos de evasão do sistema imune. Já a progressão consiste na fase final, com proliferação celular contínua, invasão, estímulo à angiogênese e metastatização (Madan *et al.*, 2022; N Kontomanolis *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2021).

O padrão de apresentação genética dos casos de câncer pode ser classificado em três grupos: esporádico, familiar ou hereditário. O esporádico corresponde à maioria dos casos (70%) e apresenta-se como casos isolados em uma família, geralmente ocorrendo em idade mais avançada, tendo como principal causa fatores ambientais e endógenos exclusivamente. O padrão familiar corresponde a 20%, apresentando maior frequência de casos numa mesma família, porém sem padrão de herança mendeliano. Além de fatores ambientais e endógenos, os fatores genéticos também contribuem e as alterações genéticas encontradas nesse grupo são polimorfismos (variações genéticas comuns na população). Já o câncer hereditário responde por cerca de 5% a 10% dos casos e a causa principal é a mutação germinativa (presente em todas as células do corpo) em um gene de alta penetrância (N Kontomanolis *et al.*, 2021).

O câncer, de modo geral, corresponde a um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo uma das principais causas de morte prematura (abaixo dos 70 anos). Há uma proporção em que um em cada cinco pessoas no mundo desenvolverão câncer em

algum momento da vida. O câncer de mama feminino é o mais incidente no planeta, correspondendo a cerca de 11,7% do total de casos novos (Sung *et al.*, 2021).

2.2 Câncer de colo uterino e o papilomavírus humano (HPV)

Desde 1995 o Instituto Nacional do Câncer (INCA) faz estimativas sobre prevalência e incidência da doença no Brasil. Atualmente com dados de previsão trienal (2023, 2024 e 2025). A estimativa para o triênio é de 704 mil novos casos, sendo 17 mil de colo uterino (4,7%), um risco de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres. No nordeste a incidência é ainda maior e configura o segundo tipo mais comum, atrás somente do câncer de mama (17,59 casos por 100 mil mulheres) (Santos *et al.*, 2023).

Segundo a última publicação, o câncer de colo uterino, excetuando-se os tumores de pele não melanoma, figura-se como terceiro tipo mais prevalente no Brasil, bem como a quarta causa de morte entre mulheres. O número total de casos novos em 2020 no nosso país foi de 16.710 casos, sendo 1010 casos somente no Ceará, com um total de óbitos de 6.526. Para o triênio 2023-2025 a estimativa é de 17.010 novos casos (Santos *et al.*, 2023).

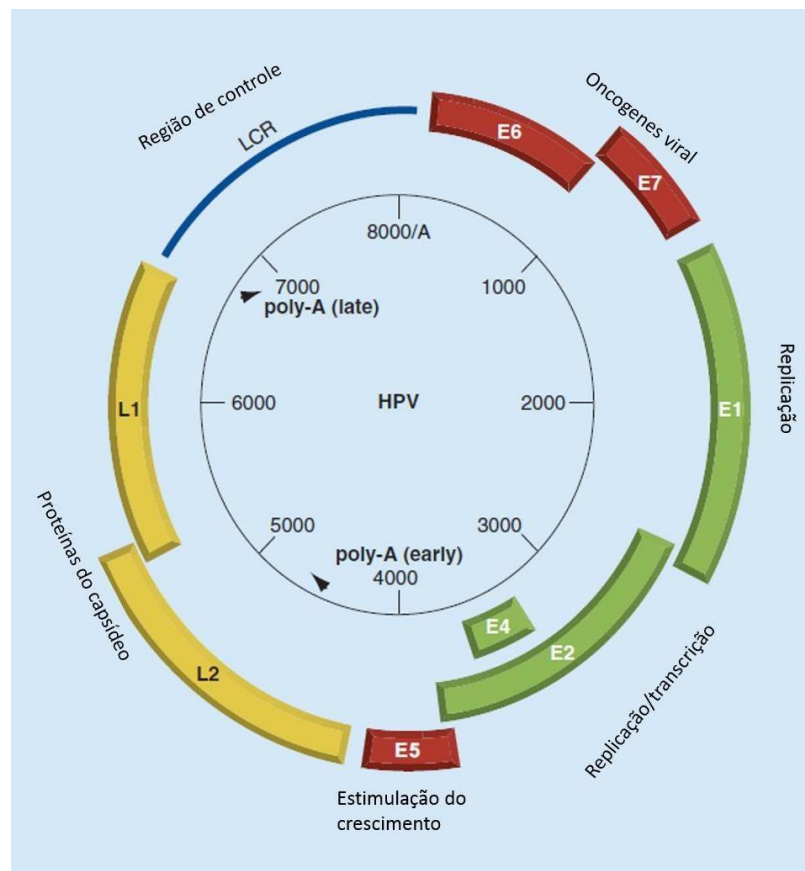
No mundo, consiste no quarto mais frequente em mulheres e na quarta causa de morte, com uma estimativa de 604 mil casos novos (6,5% de todos os tipos de câncer). As taxas de incidência são maiores em países africanos (Ferlay *et al.*, 2020). Nos Estados Unidos (EUA) há um número estimado de 13.110 novos casos e 4250 mortes segundo dados de 2019. (Siegel; Miller; Jemal, 2019; Sherman *et al.*, 2005).

O câncer de colo do útero é fortemente associado à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), representando uma relação importante na etiologia da doença. O HPV é um vírus sexualmente transmissível que infecta as células epiteliais do colo uterino, causando alterações no DNA que podem evoluir para lesões pré-cancerígenas e, eventualmente, para o câncer cervical. Seu desenvolvimento está associado à infecção persistente por subtipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV), notadamente os tipos 16,18, 31 e 52 (subtipos de alto risco). O vírus atua desregulando a regulação do ciclo celular, promovendo a persistência da infecção e a acumulação de mutações genéticas (Sheng *et al.*, 2020). A vacinação contra o HPV tem desempenhado um papel significativo na prevenção do câncer cervical, visando os subtipos mais comuns e agressivos. Além disso, os exames de rastreamento, como o Papanicolau e os testes de DNA viral, são determinantes para o diagnóstico precoce de lesões pré-cancerígenas, permitindo intervenções terapêuticas antes da progressão para estágios mais avançados da doença (Campos-Parra *et al.*, 2022). A compreensão da relação entre o HPV

e o câncer de colo do útero é essencial para orientar estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento.

O HPV corresponde ao vírus de DNA dupla hélice, da família *Papillomaviridae*, com capsídeo constituído por duas estruturas protéicas definidas com L1 e L2. Apresenta três regiões genômicas distintas: a Early (E) que codifica proteínas não- estruturais responsáveis pela replicação e infectividade, a Late (L) que codifica as proteínas estruturais do capsídeo e uma região não codificada conhecida como LCR (Long Regulatory Region). A região L tem basicamente função estrutural e de diferenciação dos subtipos de HPV, correspondendo a cerca de 40% do genoma do vírus. A região E pode ser dividida em E1, E2, E4, E5, E6 e E7, possuindo 50% da carga genômica. As proteínas E5, E6 e E7 são consideradas as principais oncoproteínas e responsáveis pela infectividade e processo de carcinogênese (FIGURA 1) (Haręza; Wilczyński; Paradowska, 2022; Brant, 2015).

Figura 1. Representação do genoma do HPV16, subtipo de alto risco, descrevendo os principais componentes da estrutura viral. Regiões Early, late e LCR (Long Regulatory Region).



Fonte: Adaptado de Brant, 2015.

A proteína E1 possui função na replicação viral, juntamente com E2. Esta última também age na transcrição das outras proteínas. Já a E4 interage com o citoesqueleto do vírus, enquanto a E5 participa da amplificação gênica e tem função no mecanismo de propiciar evasão do sistema imune. A E6 gera degradação da proteína P53, importante supressor de tumor e indutor de apoptose (morte celular programada), enquanto a E7 atua na proteína Retinoblastoma, também importante reguladora do ciclo celular (Oyouni, 2023; Hareža; Wilczyński; Paradowska, 2022).

Existem mais de 200 subtipos do HPV, divididos em alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68; e baixo risco: 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, and CP6108. É um vírus transmitido de forma sexual e bastante prevalente na população mundial. Porém, a grande maioria das infecções pelo HPV são assintomáticas e apresentam resolução espontânea. As lesões benignas causadas pelo vírus são os papilomas, conhecidos como “verrugas”. Nos casos de infecção persistente no colo uterino, há uma tendência na progressão para Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e/ou invasão (OYOUNI, 2023; HAREŽA; WILCZYŃSKI; PARADOWSKA, 2022). Estima-se que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas irão adquiri-la ao longo de suas vidas e em países com alta incidência de câncer de colo uterino (CC) e a prevalência de infecção crônica pelo HPV é de aproximadamente 10-20% das mulheres (Regauer; Reich, 2021; Hareža; Wilczyński; Paradowska, 2022; Carvalho *et al.*, 2020).

Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento do CC são tabagismo, multiparidade, uso de contraceptivos orais, sexarca precoce, história de múltiplos parceiros sexuais, história de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e imunossupressão crônica (Carvalho *et al.*, 2020). O Carcinoma de células escamosas (CEC) é o principal tipo histológico, correspondendo a cerca de 80% dos casos, enquanto o Adenocarcinoma é o responsável por aproximadamente 20%. Material genômico do HPV pode ser encontrado em até 99.7% dos casos de CEC, notadamente o subtipo 16. No adenocarcinoma os subtipos 16, 18 e 45 são os mais predominantes (Schubert *et al.*, 2023).

O processo de iniciação seria caracterizado por mutações em uma célula tronco provocadas pelo HPV, enquanto na promoção ocorre a expansão de clones mutantes e a célula em transformação secreta seu próprio fator de crescimento ou recruta células inflamatórias e estromais para produzirem esses fatores. A célula desenvolve mecanismos de evasão ao sistema imune, não somente neutralizando linfócitos e macrófagos, mas também os recrutando como aliados (Regauer; Reich, 2021). A alta incidência de doenças relacionadas ao HPV nos

indivíduos imunossuprimidos suporta a hipótese da importância do sistema imune no processo de carcinogênese (Oyouni, 2023).

Em estágios mais iniciais, as pacientes são assintomáticas ou os principais sintomas são corrimento vaginal e sangramento de pequena monta, seja pós coito ou intermitente (*spotting*). Infelizmente, apesar de o colo uterino ser acessível a procedimentos diagnósticos simples como o Papanicolau, biópsias e procedimentos como Conização, a maioria das mulheres não percebe esses sinais, gerando uma taxa de cerca de 50% dos casos com doença localmente avançada (Claro; Lima; Almeida, 2021). Por conseguinte, o rastreio adequando das mulheres do ponto de vista populacional é essencial e preconizado pela maioria dos países (Rajaram; Gupta, 2021; Pedro *et al.*, 2023; Claro; Lima; Almeida, 2021).

Com o diagnóstico realizado, o estadiamento é feito de maneira clínica com auxílio de exames de imagem como radiografia de tórax, tomografias, ressonância nuclear magnética e Tomografia com emissor de Pósitrons (PET/CT). A associação de outros exames como cistoscopia e retossigmoidoscopia depende do estadio inicial e suspeita de acometimento de bexiga e/ou reto, normalmente com indicação para doença com estadiamento maior ou igual a IB3 (Siegel *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2010). Em 2019, a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) atualizou o estadiamento para Câncer de colo uterino. O tratamento é baseado no estadiamento clínico inicial (FIGURA 2) (Bhatla *et al.*, 2019).

Figura 2. Estadiamento para Câncer de Colo Uterino segundo a FIGO 2018.

ESTADIAMENTO	DESCRIÇÃO
<u>ESTADIO I</u>	Carcinoma restrito ao colo uterino (extensão ao corpo uterino deve ser descartada)
IA	Carcinoma diagnosticado somente por microscopia, com invasão < 5mm
IA1	Invasão estromal profunda < 3mm
IA2	Invasão estromal profunda entre 3 e 5 mm
IB	Carcinoma restrito ao colo uterino, com invasão > 5mm
IB1	Tumor < 2cm no maior diâmetro
IB2	Tumor entre 2 e 4 cm no maior diâmetro
IB3	Tumor maior ou igual a 4 cm no maior diâmetro
<u>ESTADIO II</u>	Carcinoma invade além do útero, mas sem extensão ao 1/3 inferior da vagina ou parede pélvica

IIA	Limitado ao 1/3 superior da vagina sem invasão parametrial
IIA1	Tumor < 4 cm no maior diâmetro
IIA2	Tumor maior ou igual a 4 cm no maior diâmetro
IIB	Envolvimento parametrial, sem acometimento de parede pélvica
<u>ESTADIO III</u>	Carcinoma envolve o 1/3 inferior da vagina e/ou parede pélvica e/ou causa hidronefrose com ou sem alteração renal e/ou acomete linfonodos pélvicos/ retroperitoniais
IIIA	Envolve 1/3 inferior da vagina, sem acometimento de parede pélvica
IIIB	Acomete a parede pélvica e/ou causa hidronefrose com ou sem alteração renal
IIIC	Acomete linfonodos pélvicos/ retroperitoniais, independente da extensão
IIIC1	Presença de metástase para linfonodo pélvico somente
IIIC2	Presença de metástase para linfonodo retroperitonal
<u>ESTADIO IV</u>	Carcinoma que se estende além da pelve verdadeira e/ou acomete mucosa de bexiga ou reto
IVA	Acomete órgãos pélvicos adjacentes
IVB	Metástase à distância

Fonte: Adaptada de Bhatla *et al.* (2019).

De maneira geral, em mulheres com câncer acometendo somente colo uterino ou em casos selecionados de invasão pequena de vagina (até estadio IIa1) o tratamento padrão é cirurgia radical envolvendo Histerectomia com parametrectomia ampliada associada a abordagem linfonodal pélvica. Há possibilidade de tratamento cirúrgico individualizado em casos de doença inicial com desejo de preservação de fertilidade (Sgo, 2021; Abu *et al.*, 2020; Nih, 2020). A indicação ou não de tratamento adjuvante vai depender dos achados da patologia cirúrgica, podendo ou não ser indicada Radioterapia concomitante com Quimioterapia (Critérios de Peters) ou somente Radioterapia (Critérios de Sedlis). Os critérios de Peters correspondem a achados de paramétrios acometidos ou margem cirúrgica vaginal comprometida ou presença de linfonodos pélvicos positivos para câncer. Já os de Sedlis são invasão estromal maior que 1/3, presença de invasão linfovascular ou tumor maior que 4 cm. (Abu *et al.*, 2020; Sedlis *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2000).

Para doença localmente avançada, o tratamento preconizado é a Radioterapia concomitante com Quimioterapia baseada em platina (Musunuru *et al.*, 2021; Poddar; Maheshwari, 2021; Abu *et al.*, 2020; Nih, 2020).

Os casos de doença recidivada localmente após tratamento primário ainda podem ser candidatos a tratamento curativo, com uma taxa de sobrevida livre de doença em torno de 40%. As modalidades de tratamento são exposição a Quimiorradioterapia concomitantes nas mulheres nunca submetidas a radioterapia ou procedimentos cirúrgicos radicais e mutilantes como as Exenterações pélvicas (Zanini *et al.*, 2020; Ubinha *et al.*, 2024).

Para doença metastática, os casos são raramente curáveis e o tratamento primário preconizado é quimioterapia baseada em platina. Em situações individualizadas pode-se associar radioterapia para controle local ou sintomático (Abu *et al.*, 2020).

Mesmo avaliando somente os casos com potencial curativo, representa uma doença com importantes prejuízos funcionais, hormonais e de fertilidade para as pacientes envolvidas, assim como altos custos para o poder público (Schubert *et al.*, 2023). Segundo o Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos (SIGTAP) do governo federal, o custo de um procedimento de Histerectomia com ou sem anexectomia em Oncologia associado a Linfadenectomia pélvica em Oncologia (cirurgia padrão para o câncer cervical) corresponde à soma de R\$ 3.952,64 reais (DATASUS-SIGTAP). Enquanto os custos de realização de Radioterapia para Câncer Ginecológico associado a Braquiterapia Vaginal somam R\$ 8.830,00 reais (Diário Oficial Da União, 2019). Isso sem somarmos os custos das sessões de quimioterapia, custos com salários de equipe médica e multiprofissional e custos quando a opção é uma cirurgia de complexidade ainda maior como as Exenterações Pélvicas.

Além da questão financeira, é importante destacar que em todo o mundo há escassez de meios para tratamento da população de maneira adequada, principalmente em relação aos procedimentos de radioterapia, o que aumenta custos e dificulta o acesso da população (Mayadev *et al.*, 2022).

2.3 Polimorfismos genéticos e o câncer

O polimorfismo genético, a variação nas sequências de DNA entre indivíduos, desempenha um papel significativo na suscetibilidade e no desenvolvimento do câncer. Essas variações podem ocorrer em genes relacionados ao controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e resposta imunológica, afetando assim a predisposição genética para o câncer (Babu *et al.*, 2022). Certos polimorfismos podem conferir um risco aumentado ou diminuído de

desenvolver câncer, dependendo da sua natureza e localização nos genomas. Estudos têm identificado associações entre polimorfismos genéticos e diversos tipos de câncer, proporcionando *insights* valiosos sobre os mecanismos subjacentes à carcinogênese (Cura *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2019). Além disso, a compreensão dessas variações genéticas pode influenciar estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e desenvolvimento de terapias personalizadas, proporcionando uma abordagem mais direcionada e eficaz no enfrentamento do câncer.

Processos moleculares aleatórios podem provocar variações na sequência de genes responsáveis pela codificação de enzimas e outras proteínas envolvidas nas mais diversas reações do metabolismo humano. Uma variante específica de uma sequência de genes pode acumular-se na população de acordo com a pressão de seleção vigente. Se a frequência dessa variante genética atingir 1% ou mais na população, ela passa a ser definida como polimorfismo genético (Cui, 2022; Cicekliyurt; Dermenci, 2022).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento e análises genéticas, tornou-se possível a identificação da mais sutil forma de variação genética, que é caracterizada pela substituição de um único nucleotídeo por outro, denominada polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP* - *Single Nucleotide Polymorphism*), expandindo ainda mais a possibilidade de investigação da associação destas alterações genéticas com a patogênese de inúmeras doenças (KOMAR, 2009). Pesquisas genômicas com indivíduos de múltiplas populações revelaram a associação de milhares de *SNPs* como fatores de risco para diversas doenças (Schmiedel *et al.*, 2018).

Dentre uma ampla gama de categorias de doenças que podem ter o fenótipo influenciado pela presença de um ou mais polimorfismos, destaca-se o câncer como um dos principais objetos de interesse de estudo. Isso se justifica pelo fato de que tais polimorfismos podem modificar genes responsáveis por elementos envolvidos nos mecanismos de supressão tumoral do indivíduo, e em associação com fatores ambientais, contribuir para a evolução da carcinogênese (Tian *et al.*, 2019).

Esse fenômeno da interação dos polimorfismos genéticos com a origem de neoplasias baseia-se no conceito de que o organismo em contato com o ambiente é exposto a xenobióticos e os acumula. Tais substâncias são carcinogênicas e danificam o DNA provocando mutações que podem levar a malignidade. Portanto, o organismo possui mecanismos para a desativação e excreção desses xenobióticos visando impedir a ocorrência desse processo. Assim, polimorfismos que prejudiquem a função desses elementos de desintoxicação, como os do citocromo P-450 (CYP), N-acetiltransferase (NAT) e glutathione S-transferase (GST) podem

contribuir de forma direta para o surgimento do câncer (Cura *et al.*, 2021; Tavakoli *et al.*, 2021).

2.4 Polimorfismos genéticos associados ao câncer de colo uterino

Os polimorfismos genéticos desempenham um papel importante na predisposição ao câncer de colo do útero, com diversas variantes associadas a diferentes aspectos da patogênese da doença (Tavakoli *et al.*, 2021). Pesquisas têm identificado polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica, reparo do DNA e regulação do ciclo celular, que podem influenciar a suscetibilidade individual ao desenvolvimento do câncer cervical. Por exemplo, polimorfismos em genes como TP53 (Kamiza *et al.*, 2020), P16 (Thakur *et al.*, 2012), e IL-10 (Pereira *et al.*, 2020) têm sido estudados em relação ao câncer de colo do útero, destacando a complexa interação entre fatores genéticos e ambientais na carcinogênese cervical. Essas variações genéticas podem afetar a eficácia da resposta imunológica contra o papilomavírus humano (HPV), bem como a capacidade das células cervicais de resistir à transformação maligna. A compreensão dos polimorfismos genéticos associados ao câncer de colo do útero é crucial para uma abordagem mais personalizada na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença, possibilitando estratégias mais direcionadas e eficazes para a gestão clínica desse câncer específico.

A resposta imune é considerada o principal determinante na carcinogênese do CC, bem como sua progressão e desfechos oncológicos. Diversos polimorfismos em genes codificadores do complexo maior de histocompatibilidade (MHC/HLA), em inibidores de receptor de células *natural killer* (KIR), em citocinas, quimiocinas e receptores de membrana (TLR) podem estar associados ao desenvolvimento do CC em mulheres infectadas pelo HPV. Talvez a relação mais estudada seja a dos polimorfismos do HLA/ KIR. Muito embora os alelos de HLA classe II, mais especificamente o HLA-DQB1, sejam amplamente estudados, os resultados ainda se mostram inconsistentes. Isso pode se dever à variação populacional utilizada ou à diferença entre métodos empregados para avaliar o gene, como sorologia ou baseado em ácido nucleico. Com isso, o estudo combinado entre citologia e testagem para a presença de alelos HLA-DQB1 pode auxiliar no diagnóstico diferencial dos variados graus de risco para CC, caso seja levado em conta a variabilidade entre etnias, tipos de HPV, interação humano-vírus e variações entre os alelos de HLA (Zhang *et al.*, 2015).

O estudo de Rizzo analisou amostras de mulheres com lesão benigna de condiloma acuminado e carcinoma invasivo cervical e detectou a presença de DNA de HPVs de baixo e

de alto risco. Esse último HPV está mais relacionado ao câncer cervical, quando comparado ao primeiro, que está mais relacionado à benignidade. Além disso, também foi analisada a possível relação entre alelos do HLA e receptores das células Natural Killer (NK), em resposta ao vírus do HPV. Os resultados podem indicar que alelos do HLA-C1 facilitam a infecção de alto risco, enquanto interações inibitórias do JLA-C1/KIR2DL2 e HLA-C1/KIR2DL3 podem facilitar o desenvolvimento de lesões neoplásicas. Desse modo, o estudo delineia a importância da investigação da relação entre os alelos HLA, as células NK e o vírus do HPV para entender melhor sobre determinantes significativos para a malignidade das lesões cervicais uterinas (Rizzo *et al.*, 2014).

Além disso, a análise de Liu *et al.* (2019) estudou a associação dos polimorfismos do promotor P1 do receptor de quimiocina tipo 5 (CCR5) e o câncer de colo uterino, sugerindo que variações nesse promotor podem estar relacionadas à formação de neoplasias. O CCR5 possui dois promotores: PU ou P2, considerados mais fracos, e PD ou P1, considerados mais fortes. Desse modo, polimorfismos nessas regiões podem alterar a expressão de CCR5 na superfície da célula, influenciando a progressão patológica, já que estudos anteriores indicam que a expressão de CCR5 é elevada em tecidos neoplásicos cervicais. Dito isso, o artigo sugere que polimorfismos no promotor do CCR5 podem influenciar a progressão, a expressão gênica e a estabilidade do mRNA, sendo o polimorfismo rs1799987 o que aparentou aumentar significativamente o risco de neoplasia intraepitelial cervical.

Entretanto, alguns polimorfismos que já foram estabelecidos como determinantes para a carcinogênese de alguns tipos de câncer podem não influenciar diretamente o câncer cervical, como sugere o estudo de Kiran. As variações genéticas das enzimas metabólicas CYP e GST, por exemplo, são responsáveis por inativar metabólitos tóxicos de hidrocarbonetos policíclicos e a falta de suas isoformas GST é frequentemente observada no câncer de pulmão e de bexiga. Nesse estudo, não foi bem estabelecida a relação entre os genótipos nulos do GSTM1 e GSTT1 e o câncer cervical, muito embora o polimorfismo GSTP1 (Ile105Val) esteja presente em cânceres. Com isso, é importante destacar a necessidade de realizar mais estudos em populações maiores para esclarecer essa relação genética (Kiran *et al.*, 2010).

2.5 O polimorfismo do receptor TLR9 e o Câncer de colo uterino

Os receptores Toll-like (TLR) são de suma importância para o sistema imune inato reconhecer padrões moleculares de patógenos. Dessa forma, eles são capazes de induzir uma resposta inflamatória e afetar respostas específicas e adaptativas contra os antígenos (MOURA *et al.*, 2022). O receptor TLR4 parece estar mais envolvido na resistência à apoptose e proliferação do HPV e, em associação com o TLR2 aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF alfa e beta (De Matos *et al.*, 2017).

É sabido que as proteínas E6 e E7 do vírus HPV16 suprime tais respostas imunes através do TLR9. Há artigos que defendem que o polimorfismo do receptor TLR9 está relacionado com um maior risco de infecção pelos subtipos de alto risco do HPV e uma progressão da doença, porém algumas inconsistências podem ser observadas avaliando trabalhos relacionados. Moura *et al.* (2022) realizou metanálise que avaliou vários polimorfismos do TLR 4 e TLR9 (incluindo o rs187084), tendo como conclusão que estão sim associados ao câncer de colo uterino. Esses achados são corroborados por diversos outros trabalhos (Pandey *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2023; Pandey *et al.*, 2021; Chauhan *et al.*, 2019).

3 JUSTIFICATIVA

A investigação dos polimorfismos genéticos e sua relação com o câncer cervical desempenha um papel importante na compreensão da complexidade da carcinogênese e na personalização das estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento dessa doença. Os polimorfismos genéticos, variações nas sequências de DNA entre indivíduos, têm o potencial de influenciar a predisposição individual ao câncer cervical, afetando a resposta imunológica, a regulação do ciclo celular e a capacidade de reparo do DNA (Zhang *et al.*, 2023). Estudos nessa área podem identificar marcadores genéticos associados a um maior risco de desenvolvimento da doença, permitindo a identificação de subgrupos populacionais mais suscetíveis. Além disso, a compreensão dessas variações genéticas pode fornecer *insights* valiosos sobre os mecanismos moleculares subjacentes à progressão do câncer cervical, contribuindo para o desenvolvimento de terapias mais direcionadas e eficazes. A personalização da abordagem clínica, considerando os perfis genéticos individuais, pode resultar em estratégias preventivas e terapêuticas mais eficientes, marcando um avanço significativo no enfrentamento do câncer cervical e na melhoria dos resultados clínicos para os pacientes.

Diante disso, tendo em vista a necessidade de se pensar de forma preventiva e terapêutica, este estudo justifica-se pela necessidade de elucidação dos mecanismos que controlam a patogênese do CC avaliando a correlação entre o polimorfismo do gene TLR9, no alelo rs187084, e a relação com o câncer cervical, possibilitando a expansão de novas estratégias na assistência das pacientes com esse perfil. É importante destacar que ainda há poucos estudos que investigaram a associação de polimorfismos deste gene com os mecanismos da patogênese do CC. Em adição, ainda não há relatos acerca do polimorfismo do gene TLR9 (rs187084) e sua relação com o câncer de colo uterino em populações da América do Sul, e isso constitui o incentivo à realização dessa pesquisa em mulheres do nordeste brasileiro.

Caso identifique-se uma associação significativa de algum genótipo específico deste polimorfismo em mulheres com câncer no nordeste do Brasil, este poderia ser considerado um novo biomarcador genético que traria melhores esclarecimentos frente às condutas com pacientes diagnosticadas positivamente para o CC, possibilitando modificar a evolução da doença e melhorar o prognóstico destas pacientes, reduzindo as altas taxas de mortalidade nessa população, o que traria impacto na situação socioeconômica do Brasil.

4 HIPÓTESE

- O polimorfismo do gene TLR9 (rs187084) pode estar relacionado com o câncer de colo uterino e sua identificação prévia pode ser útil como medida de prevenção primária dessa doença;
- Existe uma associação significativa do polimorfismo do gene TLR9, notadamente o alelo rs187084, em mulheres com câncer do colo uterino;
- O polimorfismo do gene TLR9 (rs187084) pode ser considerado como um biomarcador genético na patogênese do CC, possibilitando a identificação da suscetibilidade à doença e uma detecção precoce às manifestações clínicas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar a associação entre a presença de um polimorfismo no gene TLR9 (rs187084) e o câncer de colo uterino em mulheres do nordeste brasileiro.

5.2 Objetivos específicos

- Verificar a distribuição genotípica desse polimorfismo em mulheres brasileiras com câncer de colo uterino, acompanhadas na Santa Casa de Sobral – Ceará e Centro de Especialidades Médicas do Município de Sobral – Ceará;
- Analisar a expressão genotípica do polimorfismo genético para o receptor TLR9 (rs187084) em pacientes com câncer de colo uterino em relação ao tipo histológico diagnosticado;
- Realizar uma avaliação prognóstica de sobrevida global e sobrevida câncer específica nas pacientes com o diagnóstico de câncer e a presença do polimorfismo TLR9 (rs187084).

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Desenho (Tipo de Estudo)

Trata-se de um estudo observacional e prospectivo, tipo caso- controle, entre mulheres com diagnóstico histopatológico de câncer cervical (CC) e mulheres saudáveis.

6.2 Casuística

Foram colhidas amostras de escovado de mucosa bucal com escova do tipo “cytobrush®” de 43 mulheres com diagnóstico de CC, independente do estadiamento clínico inicial, atendidas por livre demanda e que estejam em proposta de tratamento de qualquer natureza no Serviço de Oncologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS) – CE. A SCMS consiste em um grande centro terciário de referência em Oncologia, que atende toda a zona Norte do Ceará.

Como controle foram realizadas também coleta de escovado de mucosa bucal de 40 mulheres atendidas no Centro de Especialidades Médicas (CEM) da Secretaria de Saúde do município de Sobral – CE. O CEM corresponde a importante serviço secundário de saúde, que atende como local para triagem dos casos com suspeita de câncer de colo uterino. Apresenta dois fluxos definidos para resultados de colpocitologia, a saber: (a) análise com laudo normal – o resultado é enviado para o Centro de Saúde da Família (CSF) e a equipe faz a busca ativa e entrega do exame para paciente, assim como agendamento para avaliação e/ou tratamento, se necessário; (b) análise com laudo anormal – de posse do resultado a equipe do CEM agenda consulta ginecológica para análise e seguimento com realização de colposcopia e biopsia, se necessário. Foram selecionadas as pacientes com achados de exame preventivo e colposcopia normais.

O diagnóstico foi sempre confirmado com biópsia do colo uterino e posteriormente avaliados dados de estadiamento, inicialmente, através de exame clínico e radiológico (tomografia e/ou ressonância magnética). O estadiamento utilizado foi o da FIGO, edição de 2018 (Figura 2).

6.3 Critérios

6.3.1 Critérios de inclusão

Para o grupo caso foram incluídas pacientes com confirmação histopatológica de câncer de colo uterino, com os subtipos histológicos de Carcinoma de Células escamosas ou Adenocarcinoma, que sejam acompanhadas no serviço de Oncologia da SCMS.

Para o grupo controle foram incluídas pacientes encaminhadas ao CEM para investigação de possível alteração no papanicolau que, após novo exame e colposcopia, mostrou-se normal e pacientes sem alteração no papanicolau (exame de rastreio simples).

Em ambos os grupos, as pacientes incluídas foram convidadas a responder ao questionário semi- estruturado e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6.3.2 Critérios de exclusão

Pacientes que não aceitem realizar qualquer tratamento oncológico, seja curativo ou paliativo, bem como as que não concordarem em participar da pesquisa clínica.

6.4 Coleta dos dados

Para obtenção do DNA genômico e avaliação do polimorfismo TLR9 (rs187084) foram colhidas amostras de raspado bucal utilizando escova cytobrush®, e posteriormente serão armazenadas a – 80°C, até a extração do DNA e avaliação de genotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

A colheita do raspado bucal, com a utilização de escovinha “cytobrush®”, foi realizado no período de dezembro/2021 a junho/2022, mediante assinatura de termo de consentimento (TCLE) pelas pacientes envolvidas no estudo. Foi utilizado formulário padronizado para a coleta dos dados referentes ao estudo de todas as pacientes.

Foram avaliadas informações sociodemográficas, passado ginecológico/ obstétrico e história da doença atual com as informações do diagnóstico, as características clínicas, anatomopatológicas e de resposta ao tratamento das mulheres com câncer de colo uterino.

6.5 Ensaio Laboratorial

O ensaio laboratorial do estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD)- Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) - Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

6.5.1 Extração de DNA

As amostras dos raspados bucais obtidas foram armazenadas a -80°C até posterior extração de DNA genômico. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific - K182002), segundo protocolo do fabricante. Em um tubo de 1,5 ml irá ser misturado 50 μL de saliva com 50 μL de tampão de lise. As amostras foram aquecidas a 95°C por 3 minutos e em um bloco pré-aquecido. Em seguida, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 1 minuto e adicionado 50 μL de solução tampão estabilizante. O material foi então centrifugado por 1 minuto a 10.000 g a temperatura ambiente e em seguida a concentração de DNA em cada amostra foi quantificada utilizando-se o kit Qubit® dsDNA BR (Broad Range) Assay. O DNA assim obtido e quantificado foi genotipado utilizando a técnica de PCR em tempo real.

6.5.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O método de qPCR foi usado para a determinação do polimorfismo do TLR9, notadamente o alelo rs187084, por meio de um equipamento que associa um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utilizou fluoróforos do tipo TaqMan®, que correspondem a sondas de hibridização utilizadas para detectar sequências específicas no DNA amplificado na PCR.

Para a PCR de genotipagem serão utilizadas placas de 96 poços em um volume total de 10 μL /poço. Cada reação foi preparada contendo 5 μL TaqMan™ Genotyping Master Mix (ThermoFisher Scientific- 4371355), 0,25 μL TaqMan™ SNP Genotyping Assay, human (ThermoFisher Scientific- 4351379), 2 μL DNA genômico a 1,5 ng/ μL , e 2,75 μL H₂O ultra pura. Os ciclos térmicos foram de 95°C por 20 segundos para ativação da polimerase e 40 ciclos de: desnaturação a 95°C por 3 segundos e anelamento/ extensão a 60°C por 90 segundos. O reagente TaqMan™ Genotyping Master Mix (ThermoFisher Scientific- 4371355) é composto por AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, UP, dNTPs, Tracking Dye e ROX™ dye. O reagente TaqMan™ SNP Genotyping Assay, human (ThermoFisher Scientific- 4351379) é composto por um par de iniciadores (primers) não marcados (concentração final de reação 900 nM) e as sondas fluorescentes: Applied Biosystems™ VIC™ dye – MGB para o alelo A e Applied Biosystems™ FAM™ dye – MGB para o alelo G (concentração final de reação 200 nM).

A sonda para amplificação consiste na sequência descrita pelo SNP ID: rs187084 (ThermoFisher Scientific):
TCCCCTGCTGGAATGTCAGCTTCTT[A/G]AGGGCAGTGATCTTTTATCTGCA

Após o preparo do mix de reação e da placa com as amostras específicas, estas foram pré-lidas em um instrumento de PCR em Tempo Real StepOnePlus (Applied Biosystems). Após a pré-leitura, os ciclos termais foram realizados para amplificação das amostras de DNA para a genotipagem das pacientes. Ao final, foi realizada uma pós-leitura (da qual foram descontados os valores iniciais de fluorescência em cada amostra), que foi analisada através do StepOne™ Software v. 2.3 para a discriminação alélica.

A distribuição genotípica envolverá 03 formas de variantes: homozigoto (TT), heterozigoto (T/C) e homozigoto (CC). Cada genótipo foi avaliado sob modelos de hereditariedade genética (dominantes, recessivos e codominantes).

6.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SigmaPlot® versão 11.0 (SYSTAT. Software Inc.). O teste de Shapiro-Wilk foi feito para analisar a distribuição normal dos dados. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M) ou mediana com auxílio do Teste t (paramétricos) ou Mann-Whitney (não paramétricos), ambos de amostras independentes, para comparar os valores de parâmetros entre os grupos polimorfismo e controle.

O Teste X² de Pearson ou Teste exato de Fisher foi necessário para comparar a distribuição de genótipos e frequência de alelos em todos os grupos. Modelos de regressão logística foram utilizados para avaliar a associação entre os genótipos e o câncer de colo uterino.

A abordagem do risco relativo foi feita pela avaliação do “odds ratio” (OR) por regressão logística contemplando um intervalo de confiança (IC) de 95% de certeza. Um valor de $p < 0,05$ será considerado como estatisticamente significativo.

6.7 Aspectos éticos da pesquisa

O cuidado ético fundamental do estudo foi manter em sigilo o nome das mulheres envolvidas na pesquisa. Para tanto, cada caso foi identificado no instrumento de coleta de dados apenas pelo número do prontuário, iniciais do nome e número do caso da pesquisa.

O estudo levou em consideração e se adequa a Resolução 466/12, a qual trata das diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e seus fundamentos éticos e científicos.

O processo de coleta de material foi realizado pelos pesquisadores treinados, com escova do tipo “cytobrush®”. O processo é indolor e não traz malefícios às pacientes do estudo. Corresponde a um raspado bucal realizado através da escova, sendo posteriormente acondicionado em tubo próprio juntamente com saliva das pacientes. Não ocorreram intervenções maiores.

Seguindo as recomendações da Resolução 441/11, sobre armazenamento e utilização do material biológico, os tubos identificados foram condicionados regularmente e estocados no laboratório NUBES/LABIREP da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral. Posteriormente foram utilizados para extração do DNA e identificação do polimorfismo.

Não houve nenhuma diferenciação ou prejuízo no atendimento e/ou tratamento das pacientes envolvidas no estudo.

Todo o processo de entrevista e coleta do escovado bucal será realizado pelos pesquisadores seguindo os cuidados necessários contra a propagação da COVID- 19, com uso de álcool e máscaras de proteção.

O projeto de pesquisa APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ (UVA/CE) com o número CAAE 55461022. 4. 0000. 5053. Todas as pacientes tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido/ assentimento assinado, sendo informados dos riscos e benefícios do estudo.

7 RESULTADOS

Foram incluídos um total de 83 mulheres na pesquisa, divididas em 40 no grupo controle (48,2%) e 43 no grupo caso (51,8%). A média de idade foi de 46 anos e a maioria das pacientes eram casadas (total de 46; 55,4%), sendo 25 (30,1%) com estado civil solteira.

A maior parte das pacientes eram assintomáticas ao diagnóstico (total de 50; 60,2%), mas o sangramento transvaginal anormal foi o principal sintoma quando presente (total de 26; 31,3%). Outros sintomas como dor (8,4%) estiveram presentes em menor proporção. Mesmo no grupo caso, 13 (31,7%) não apresentavam sintomas ao diagnóstico.

Com relação aos dados de história ginecológica, a maioria teve menarca após os 12 anos de idade (total 41; 52,6%), 36 (43,4%) eram menopausadas no momento da coleta, com média de idade de 46 anos, e 9 mulheres (10,8%) não menstruavam em decorrência de algum tratamento (histerectomia ou radioterapia). A média de gestações foi acima de 3 (3,82) e a idade média do primeiro parto foi de 21 anos. Outros fatores incluem a sexarca, com idade média de 16 anos, porém a maioria só começou a fazer exame de Papanicolau aos 26 anos. A maioria teve até três parceiros sexuais durante a vida (total de 58; 73,4%)

A história familiar de câncer de colo uterino foi baixa, apenas 8 casos (9,8%). Apenas uma minoria tinha hábitos de tabagismo (24,4%) e etilismo (14,6%). Outro dado de bastante relevância foi a taxa de vacinação contra HPV, com 20 casos (24,4%).

Tabela 1. Dados demográficos, de sintomas e histórico ginecológico dos grupos de mulheres entrevistadas.

	Total
Grupo	
Controle	40(48.2%)
Caso	43(51.8%)
Idade	46.00±15.05
Estado civil	
Solteiro	25(30.1%)
Casado	46(55.4%)
Divorciado	3(3.6%)
União estável	4(4.8%)
Viúvo	5(6.0%)
Assintomática	
Não	33(39.8%)
Sim	50(60.2%)
Dor Pélvica	
Não	76(91.6%)
Sim	7(8.4%)

Sangramento Transvaginal	
Não	57(68.7%)
Sim	26(31.3%)
Menarca	
< 12 anos	37(47.4%)
>12 anos	41(52.6%)
Menopausa	
Não	38(45.8%)
Sim	36(43.4%)
Pós-TTO	9(10.8%)
Idade para Menopausa	46.12±5.30
Passado Obstétrico	
G	3.82±3.38
P	3.43±3.10
A	0.37±0.85
Idade do primeiro parto	21.29±5.20
Sexarca	16.76±2.87
Idade do primeiro Papanicolau	26.16±11.38
História_familiar_de_câncer	
Não	39(47.6%)
Sim, colo uterino	8(9.8%)
Sim, outros tipos	35(42.7%)
Tabagismo	
Não	62(75.6%)
Sim	20(24.4%)
Etilismo	
Não	70(85.4%)
Sim	12(14.6%)
Número_de_parceiros	
1	25(31.6%)
2-3	33(41.8%)
4-5	10(12.7%)
>5	11(13.9%)
Vacina_HPV	
Não	62(75.6%)
Sim	20(24.4%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores são dados como média ± erro padrão da média para idade, estado civil, padrão dos sintomas, história ginecológica e vida sexual. * ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos (Teste *t* student /Mann-Whitney).

Dentro do grupo portador de câncer, o subtipo histológico mais comum foi o Carcinoma Espinocelular (CEC), com 40 casos (93%), sendo o Adenocarcinoma somente 3 casos (7%) e sem nenhum outro tipo histológico documentado.

Com relação ao estadiamento clínico/ patológico, dividimos em estádios I/ II com 23 pacientes (59%) e III/IV com o total de 16 (41%). Em quatro pacientes entrevistadas não havia certeza documentado em prontuário do estadio inicial.

O tratamento inicial de escolha foi cirurgia em 9 mulheres e o trimodal (radioterapia/ braquiterapia/quimioterapia concomitante) em 36 casos. Observou-se que em 3 (três) casos inicialmente operados, foi necessário complementação de tratamento trimodal posteriormente. Um total de 39 pacientes (92,9%) completaram toda terapia inicial proposta.

Tabela 2. Dados relativos a estadiamento inicial e tratamento proposto.

Estadio Clínico	
I-II	23(59.0%)
III-IV	16(41.0%)
Cirurgia	
Não	33(78.6%)
Sim	9(21.4%)
Radioterapia	
Não	6(14.3%)
Sim	36(85.7%)
Braquiterapia	
Não	6(14.3%)
Sim	36(85.7%)
Quimioterapia	
Não	6(14.3%)
Sim	36(85.7%)
Completo tratamento	
Não	3(7.1%)
Sim	39(92.9%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores são dados como média \pm erro padrão * ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo caso (Teste *t* student / Mann-Whitney).

Foi observada uma taxa de recidiva geral de 34,2% (13 pacientes). Os principais locais de recidiva foram: osso (total de 5; 8,6%), locorregional pélvica (total de 4; 6,9%), pulmão (total de 3; 5,2%), retroperitônio (total de 3; 5,2%), fígado (total de 2; 3,4%). O tratamento da recidiva foi realizado com cirurgia de resgate em 3 casos, radioterapia em 4 casos e quimioterapia em 9 casos. A média de tempo de seguimento das pacientes no momento do fechamento da série foi de 36,5 meses. Durante o período de seguimento houve um total de 5 óbitos (7,7%), todos em razão de complicações da doença.

Tabela 3. Dados relativos aos tipos de recidiva e tratamento proposto.

Recidiva	
Não	25(65.8%)
Sim	13(34.2%)
Recidiva em Colo Uterino	
Não	57(98.3%)
Sim	1(1.7%)
Recidiva Pélvica	
Não	54(93.1%)
Sim	4(6.9%)
Recidiva em Pulmão	
Não	55(94.8%)
Sim	3(5.2%)
Recidiva em Fígado	
Não	56(96.6%)
Sim	2(3.4%)
Recidiva em Retroperitônio	
Não	55(94.8%)
Sim	3(5.2%)
Recidiva em Osso	
Não	53(91.4%)
Sim	5(8.6%)
Recidiva em SNC	
Não	57(98.3%)
Sim	1(1.7%)
Recidiva em Linfonodo retroperitoneal	
Não	56(96.6%)
Sim	2(3.4%)
Recidiva em Linfonodo cervical	
Não	57(98.3%)
Sim	1(1.7%)

Recidiva em Vagina

Não	57(98.3%)
Sim	1(1.7%)

Recidiva: Tratamento com cirurgia

Não	55(94.8%)
Sim	3(5.2%)

Recidiva: Tratamento com RT

Não	54(93.1%)
Sim	4(6.9%)

Recidiva: Tratamento com QT

Não	49(84.5%)
Sim	9(15.5%)

Óbito

Não	60(92.3%)
Sim	5(7.7%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores são dados como média \pm erro padrão da média. * ($p \leq 0,05$) em relação aos dados de recidiva no grupo caso. (Teste *t* student). SNC: Sistema Nervoso Central; RT:

Pode-se observar a distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo receptor TLR9 rs187084 na Tabela 4. Não houve diferenças significativas em termos de distribuição de genótipos ($p = 0,749$), mostrando que o polimorfismo não aumentou o risco de câncer de colo uterino na nossa amostragem.

Tabela 4. Distribuição genotípica e frequência alélica dos grupos envolvidos.

	Alelos TLR9				p-Valor
	Total	CC	T/C	TT	
Grupo					
Controle	40(48.2%)	5(41.7%)	20(46.5%)	15(53.6%)	0,749
Caso	43(51.8%)	7(58.3%)	23(53.5%)	13(46.4%)	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem.

Porém, quando analisadas as características clínicas em relação ao tumor, pode-se observar que as pacientes com CEC de colo uterino apresentaram o genótipo heterozigótico T/C e homozigótico TT significativamente superior ao genótipo CC ($p = 0,044$), bem como a presença em maior significância de Heterozigose do alelo T em relação ao alelo C ($p = 0,014$) (Tabelas 5 e 6).

Comparando presença de homozigose e heterozigose, percebeu-se que a presença do gene T/C esteve mais relacionada a não realização de cirurgia, isto é, predileção pelo tratamento trimodal, que é realizado em estadiamentos mais avançados ($p=0,041$) (Tabela 7).

Tabela 5. Relação genotípica e frequência alélica baseados nos tipos histológicos do tumor de colo uterino.

	Alelos TLR9				p-Valor
	Total	CC	T/C	TT	
Biopsia					
CEC	40(93.0%)	5(71.4%)	22(95.7%)	13(100.0%)	0,044
Adenocarcinoma	3(7.0%)	2(28.6%)	1(4.3%)	0(0.0%)	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem.

Tabela 6. Relação genotípica do alelo T em relação ao tipo histológico do tumor de colo uterino.

	Alelo T		p-Valor
	CC	TT + T/C	
Biopsia			
CEC	5(71.4%)	35(97.2%)	0,014
Adenocarcinoma	2(28.6%)	1(2.8%)	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem.

Tabela 7. Relação genotípica do gene T/C com o tratamento oncológico proposto.

	Monozigose		p-Valor
	T/C	CC + TT	
Cirurgia			
Não	20(90.9%)	13(65.0%)	0,041
Sim	2(9.1%)	7(35.0%)	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem.

Com relação aos dados de recidiva, não houve diferença estatística em comparação aos genes de modo geral (comparação entre TT- T/C- CC). Porém, na análise de subgrupo em relação à presença de progressão para metástase hepática, a presença da Homozigose TT houve significância ($p= 0,039$) com a presença de dois casos (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Relação genotípica e presença de recidiva.

Alelos TLR9				
	Total	CC	TC	TT
Recidiva				
Não	25(65.8%)	5(83.3%)	11(55.0%)	9(75.0%)
Sim	13(34.2%)	1(16.7%)	9(45.0%)	3(25.0%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem.

Tabela 9. Relação genotípica e presença de recidiva em Fígado.

Alelo C		
	TT	CC+TC
Recidiva_Fígado		
Não	17(89.5%)	39(100.0%)
Sim	2(10.5%)	0(0.0%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem.

Em relação ao pequeno número de eventos de óbito durante o seguimento, não foi possível estabelecer curvas de Sobrevida Global. Já em relação às recidivas, comparando os outros dados de sobrevida, na Sobrevida Livre de Progressão de Doença (*Disease Free Survival- DFS*) não foi observada diferença entre os genes separados e a presença de recidiva de câncer de colo uterino ($p= 0,177$) (Figura 3). Da mesma maneira, também não houve diferenças comparando alelo T homozigótico aos demais alelos C e vice-versa (Figuras 4 e 5). Porém, na comparação entre os Homozigóticos e Heterozigóticos houve uma diferença de DFS, com pior sobrevida no grupo T/C ($p= 0,031$) (Figura 6).

Figura 3. DFS em comparação quanto a presença do polimorfismo. * $p=0,177$, Teste Log-Rank Mantel-Cox.

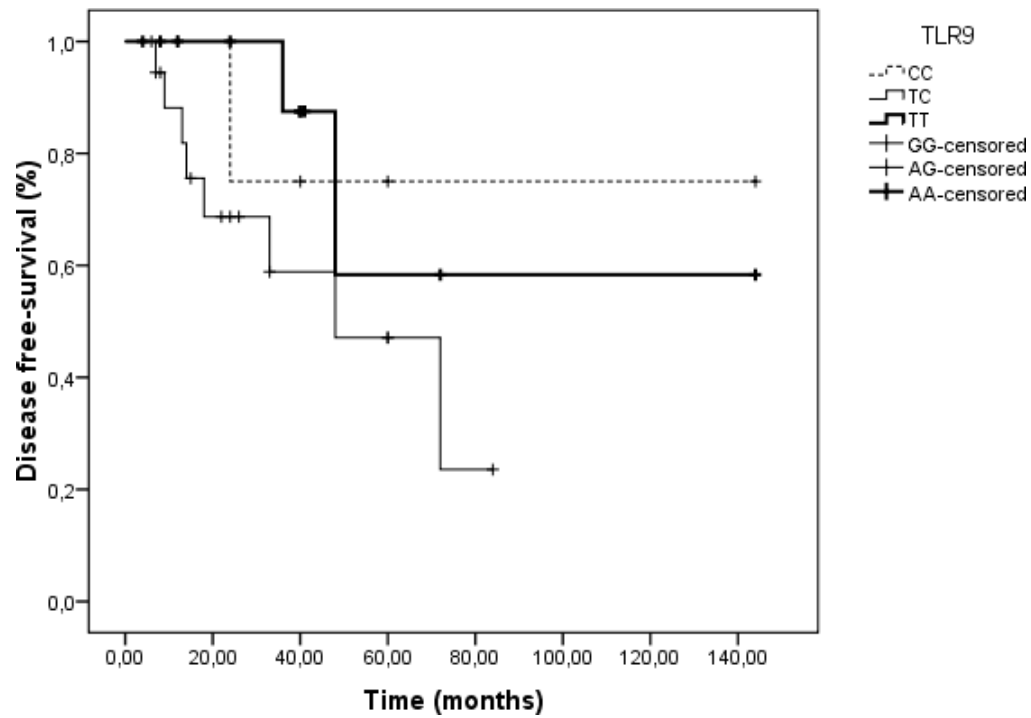


Figura 4. DFS comparando alelo T homozigótico x CC- T/C. * $p=0,193$, Teste Log-Rank Mantel-Cox.

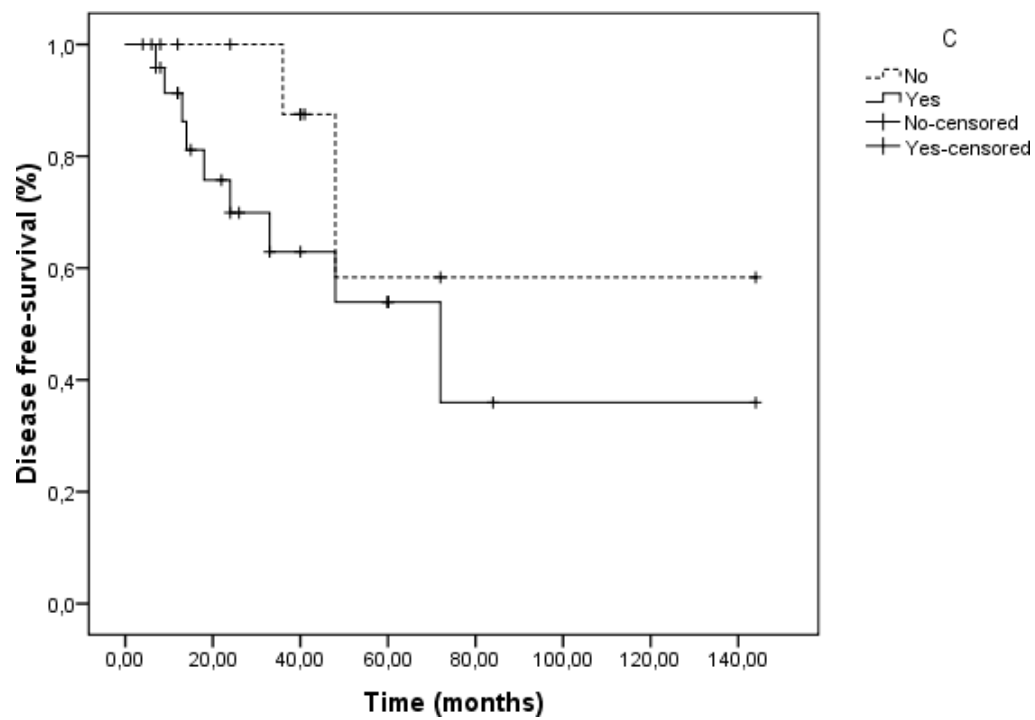


Figura 5. DFS comparando alelo C homozigótico x TT- T/C. * $p=0,440$, Teste Log-Rank Mantel-Cox.

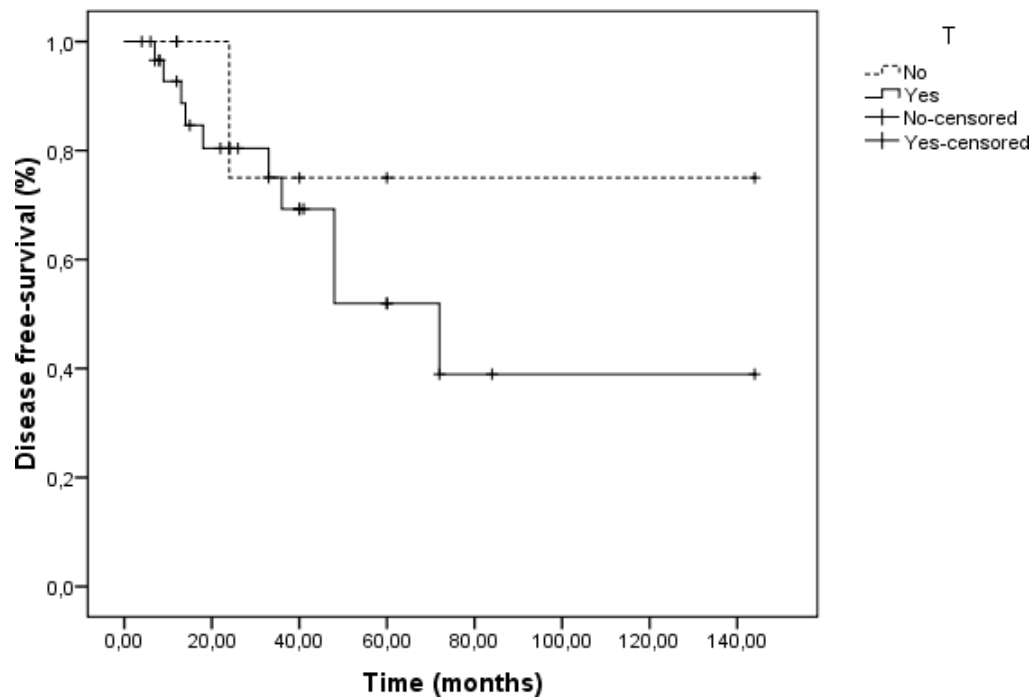
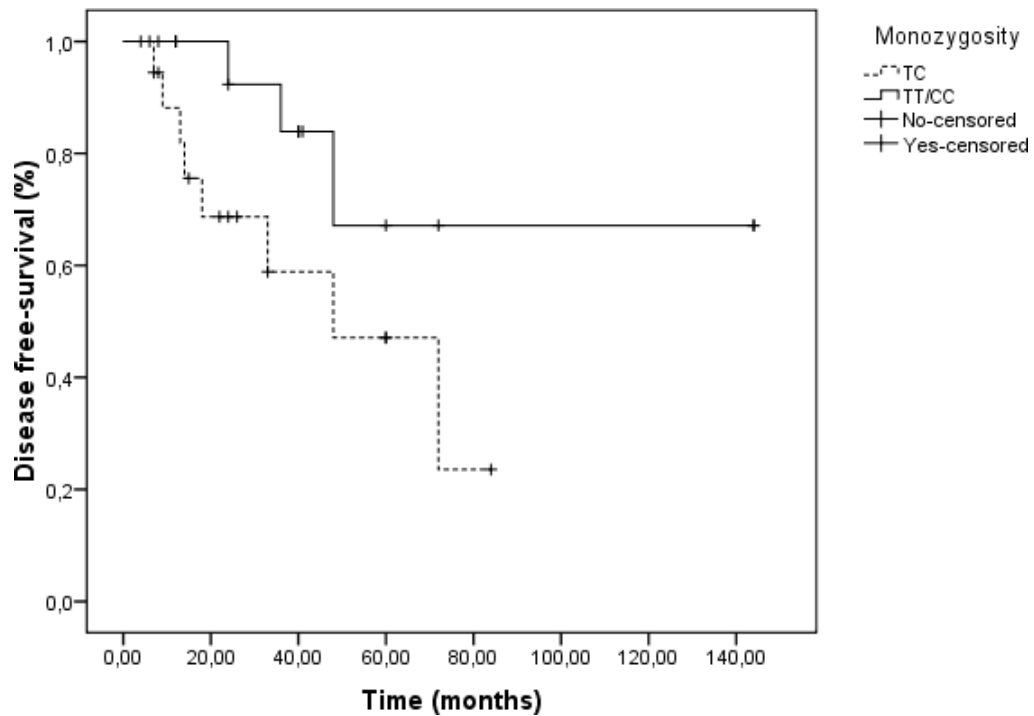


Figura 6. DFS quando comparados Homozigoto e Heterozigoto. Curva com Significância estatística. * $p=0,031$, Teste Log-Rank Mantel-Cox.



8 DISCUSSÃO

O presente estudo enfoca a importância de estruturas de imunomediação como o TLR9 na progressão da carcinogênese associada ao HPV em mulheres, bem como a possibilidade de identificar biomarcadores associados a polimorfismo nesse receptor, gerando maior probabilidade de infecção e doença mais grave. Trata-se de uma pesquisa inédita na América do Sul, onde foram estudadas 83 mulheres, sendo 43 portadoras de Câncer de colo uterino e 40 sadias, genotipadas em relação ao polimorfismo do alelo rs187084 do TLR9.

Com base nas características sociodemográficas, não foram encontradas nenhuma diferença estatística entre os grupos. O HPV é o principal promotor do câncer de colo uterino e acomete principalmente mulheres após os 30 anos, com pico de incidência entre os 45 e 50 anos (Oyouni, 2023), o que condiz com a mediana de idade da nossa amostra de 46 anos +- 15 anos (Tabela 1).

Quanto a sintomatologia, a maior parte dos estudos mostra que as infecções por HPV ou portadoras de câncer em inicial são assintomáticas ou apresentam sangramento de pequena monta (Carvalho *et al.*, 2020). Nossa avaliação mostrou que 59% das pacientes portadoras de câncer estavam em estadiamento I ou II e, seguindo as informações das referências atuais, a maior parte das pacientes eram assintomáticas ao diagnóstico (60,2%). O sangramento transvaginal anormal esteve presente em 31,3% dos casos.

Autores como Winer *et al.* (2008) evidenciaram que, mesmo com um único parceiro, a mulher tem um risco de infecção pelo HPV de 50% ao final de 3 anos de relacionamento. Porém, também associam uma relação de maior risco para infecção por HPV em mulheres solteiras e com múltiplos parceiros, o que não condiz com nossa amostra em que somente 26,6% das mulheres tiveram quatro ou mais parceiros e a maioria era casada (55,4%) no momento da entrevista.

A multiparidade e a sexarca precoce são outros importantes fatores de risco. Embora a taxa de paridade da nossa amostra seja alta (>3), a média de idade de início de realações sexuais foi de 16,7 anos, o que está fora da definição de sexarca precoce, que é para início antes dos 13 anos de idade (Lara; Abdo, 2015). Destacam-se também outros cofatores conhecidos associados à progressão da doença, que incluem a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras condições imunossupressoras, como tabagismo (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020). Na nossa avaliação somente uma minoria tinha história de tabagismo (24,4%) e etilismo (14,6%) (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020). Tivemos um caso de paciente com coinfeção com HIV, porém a mesma diagnosticada precocemente e câncer em estágio inicial, foi submetida a cirurgia com intenção curativa, sem

sinais de recidiva no momento do fechamento do estudo. A mesma possuía genótipo homozigótico TT na avaliação do polimorfismo estudado.

O rastreio com exame de Papanicolau é preconizado pela maioria dos países (Rajaram; Gupta, 2021). Segundo as diretrizes nacionais de rastreamento de câncer de colo uterino, o exame deve ser começado aos 25 anos, com periodicidade a cada 3 anos após 2 exames normais (INCA, 2016; FIOCRUZ, 2018). A média de idade de início na nossa população alvo foi aos 26 anos, em linha com a recomendação.

Alguns estudos apontam que mulheres com parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) que tiveram câncer de colo do útero têm um risco maior de desenvolver a doença, provavelmente causados por uma condição hereditária que torna algumas mulheres menos capazes de combater a infecção pelo HPV. Em outros casos, as mulheres da mesma família de uma paciente já diagnosticada têm um ou mais fatores de risco não genéticos para a doença (Carvalho *et al.*, 2021; Schubert *et al.*, 2023). Na nossa avaliação, a história familiar de câncer de colo uterino foi baixa, com apenas 8 casos (9,8%).

Outro dado de bastante relevância foi a taxa de vacinação contra HPV na nossa população geral estudada, com 20 casos (24,4%). A vacina para HPV quadrivalente é disponibilizada gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e previne contra a infecção e complicações da doença. Segundo dados do Ministério da Saúde, a proposta nacional é vacinar crianças e adolescentes de 9 a 14 anos, pessoas de 9 a 45 anos em condições clínicas especiais, como as que vivem com HIV/Aids, transplantados de órgãos sólidos ou medula óssea e pacientes oncológicos (imunossuprimidos), bem como passou também a ser oferecida a vítimas de abuso sexual. Entretanto, percebe-se uma queda na cobertura da vacinação. Em 2022, entre as meninas, a primeira e a segunda dose tiveram, respectivamente, 75,91% e 57,44% de adesão. Entre os garotos, os valores são ainda menores: 52,26% na primeira aplicação e 36,59% na segunda. Nossa amostragem não incluiu crianças e adolescentes, portanto, uma taxa de quase 25 % em uma população de média de idade de 46 anos, consideramos alta a adesão na nossa região (Santos; Santos; Fernandes, 2023; Moura; Codeço; Luz, 2020; Luvisaro *et al.*, 2022).

Em uma casuística chinesa da mesma testagem do alelo rs187084, foram recrutadas 712 mulheres, com uma taxa de 89,3% de Carcinoma de células escamosas (CEC) (Chen *et al.*, 2012). Segundo Rozario *et al.* (2019) em análise retrospectiva de atendimentos no INCA avaliando mais de mil mulheres, o Carcinoma de células escamosas foi o mais comum, com 83,9% dos casos. Na nossa avaliação essa taxa de CEC foi ainda maior, com 40 casos (93%), sendo o Adenocarcinoma somente 3 casos (7%). Comparando as porcentagens em relação ao

estadiamento inicial, o mesmo grupo evidenciou uma taxa de somente 26,5% de mulheres em estádios I/II, o que difere da nossa amostra em que a maioria (59%) apresentavam-se com quadros mais iniciais. Com a ressalva de que a taxa de pacientes com estágio IIB foi alta, com 14 casos (32,5%).

Embora a maior parte da nossa amostra tenha sido de mulheres em estágio inicial, somente 9 casos foram submetidos a cirurgia como terapêutica inicial, em razão do alto índice de estadiamento IIB, com acometimento de paramétrios, em que a terapia Trimodal é a escolha. Reiterando que tivemos uma taxa alta de tratamento baseado em radioterapia, com 36 pacientes (85,7%) Das pacientes submetidas a cirurgia, 3 (três) tiveram dados patológicos pós-operatórios de doença mais avançada, sendo também submetidas a terapia Trimodal na adjuvância, isto é, somente 6 (13,9%) mulheres eram realmente estágio I, com doença restrita ao colo uterino. Este dado é condizente com os dados do grupo de Rozario *et al.* (2019) em que grande maioria (73,3%) dos casos também eram de doença estágio IIB em diante.

O dado de sobrevida mais importante do nosso estudo foi a de recidiva geral, correspondendo a 34,2% (13 pacientes). Um estudo indiano, retroEMBRACE, evidenciou taxa de progressão de doença semelhante, de 30%, com a maioria dos casos correspondendo a recidiva sistêmica (17%) (Tan *et al.*, 2019). No nosso estudo o principal local de recidiva também foi sistêmico, em osso (total de 5; 8,6%), com taxa de progressão locorregional pélvica de 6,9%.

Outros estudos também corroboram a alta taxa de recidiva, principalmente nos casos inicialmente mais avançados, chegando a 74% em doença IVa. Cerca de 25% das mulheres tratadas com radioterapia, de maneira geral, desenvolverão algum tipo de recorrência, o que explica nossa alta taxa de recorrência (Vieira *et al.*, 2009; Höckel, 2003). De maneira geral, somente as recidivas locorregionais centrais são passíveis de tratamento cirúrgico com histerectomia radical ou procedimentos de exenteração pélvica, com taxa de sobrevida em cinco anos variando de 20 a 50%. No nosso estudo, a maioria das recidivas também foram tratadas com quimioterapia, em razão da ocorrência de progressão sistêmica e a alta utilização de radioterapia como terapêutica inicial. Somente 3 casos foram submetidos a cirurgia de resgate. (Musunuru *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2009; Costa; Antunus; Lupinacci, 2008). Apesar da alta taxa de recidiva na nossa amostra, observamos um pequeno número de óbitos com 5 casos, o que pode ser explicado pelo tempo de seguimento de apenas 36,5 meses.

Existem alguns trabalhos no Brasil com essa linha de pesquisa, entretanto, nenhum testando as mesmas variáveis. Segundo dados de Oliveira *et al.* (2013) não houve diferença estatística na carcinogênese e sobrevida testando polimorfismo do TLR9, porém com outro

alelo: rs5743836. Já levando em consideração o trabalho de Xabregas *et al.* (2022) embora tenha sido testado o mesmo alelo do nosso estudo (rs187084), foi avaliado o risco de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).

Como objetivo principal do nosso estudo, observamos que a presença do polimorfismo rs187084 do TLR9 não aumentou o risco de câncer de colo uterino ($p=0,749$), ao contrário de outras séries descritas na literatura mundial, o que pode ser explicado por nossas características genéticas regionais ou por nossa amostragem menor, de somente 83 mulheres. O estudo de caso-controle de Chen *et al.* (2012) corresponde ao primeiro trabalho que evidenciou aumento no risco de progressão para câncer de colo uterino na presença de heterozigose T/C, não vista em homozigose TT. Foi uma série que recrutou 712 mulheres com câncer e 717 controles saudáveis na China. O trabalho indiano de Pandey *et al.* (2021) testou 110 casos e 141 controles para diversos polimorfismos e alelos do TLR4 e TLR9, dentre eles o nosso alelo testado, com população semelhante à nossa de maioria com histologia de CEC e pacientes em estágio II e III, e observou aumento no risco de infecção por HPV 16 e 18, bem como evolução para câncer. Esses dados são também corroborados por séries chinesas (Tian *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018), polonesa (Roszak; Lianeri; Sowin, 2012) e italiana (Cannella *et al.*, 2014).

Apesar do achado negativo quanto a relação entre a presença do polimorfismo e o aumento no risco de câncer, tivemos achados relevantes como desfechos secundários. Nas pacientes do grupo caso e portadoras de CEC, observamos a presença do genótipo heterozigótico T/C e homozigótico TT significativamente superiores ao genótipo CC ($p=0,044$), com a presença em maior significância de heterozigose. Estes dados também aparecem nas outras séries descritas (Tian *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Roszak; Lianeri; Sowin, 2012; Cannella *et al.*, 2014). A presença do genótipo T/C esteve mais relacionada a realização do tratamento trimodal e, portanto, a doença mais avançada ($p=0,041$). Mesmo não tendo diferença significativa entre os genótipos quanto a recidivas, a presença da homozigose TT foi relacionada a maior taxa de metástase hepática como progressão de doença. Ainda como análise de subgrupo, na comparação entre os Homozigóticos e Heterozigóticos houve uma diferença de DFS, com pior sobrevida no grupo T/C ($p=0,031$).

Do ponto de vista populacional, nosso estudo não teve êxito em identificar a importância da presença do polimorfismo rs187084 na progressão para câncer, porém nenhuma outra série descrita trouxe dados relacionados a desfechos clínicos das mulheres envolvidas (Tian *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Roszak; Lianeri; Sowin, 2012; Cannella *et*

al., 2014). Enumeramos como principais limitações do nosso trabalho o número dos sujeitos envolvidos e a testagem de somente um polimorfismo.

9 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo realizado com intuito de investigar a relação da presença de polimorfismo no alelo rs187084 do TLR9 na progressão para câncer de colo uterino sugeriu que, na nossa amostra, esta associação não pode ser associada a um aumento no risco.

Porém, os genótipos T/C e TT parecem estar mais presentes nas pacientes que já progrediram para câncer, bem como estão relacionados a uma pior Sobrevida Livre de Progressão e recidiva hepática, respectivamente.

Sendo assim, nossos dados podem abrir portas para novas discussões a respeito desse cenário e a realização de pesquisas futuras com amostras de tamanho maior poderiam revelar um efeito mais proeminente deste polimorfismo.

São necessários estudos de maior tamanho amostral para a validação dos nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- ABU, R.N.R. *et al.* NCCN guidelines insights: Cervical cancer. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 18, p. 660–6, 2020.
- BHATLA, N. *et al.* Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 145, p. 129-135, 2019.
- BRANT, A. C. **Análise da integração genômica do Papilomavírus Humano e a expressão de seus genes em câncer cervical.** Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2015.
- BRASIL. **Diário Oficial da União.** Edição 41, Seção 1, p. 43, 2019.
- BRITTO, A.M.A. *et al.*, HPV Induces Changes in Innate Immune and Adhesion Molecule Markers in Cervical Mucosa With Potential Impact on HIV Infection. **Front Immunol**, v. 11. e2078, 2020.
- BUTERA, A.; MELINO, G.; AMELIO, I. Epigenetic "Drivers" of Cancer. **J Mol Biol**, v. 433, n. 15, 167094, 2021.
- CAMPOS-PARRA, A. D. *et al.* Molecular Differences between Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Cervical Cancer Subtypes: Potential Prognostic Biomarkers. **Curr Oncol**, v. 29, n. 7, p. 4689-4702, 2022.
- CANNELLA, F. *et al.* TLR9 is expressed in human papillomavirus-positive cervical cells and is overexpressed in persistent infections. **Immunobiology**, v. 220, n. 3, p. 363-8, 2014.
- CARVALHO, N. S. *et al.* Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo papilomavírus humano (HPV) [Brazilian Protocol for Sexually Transmitted Infections 2020: human papillomavirus (HPV) infection]. **Epidemiol Serv Saude**, v. 30, e2020790, 2021.
- CHAUHAN, A. *et al.* Association of TLR4 and TLR9 gene polymorphisms and haplotypes with cervicitis susceptibility. **PLoS One**, v. 14, n. 7, e0220330, 2019.
- CHEN, X. *et al.* A Genetic Variant in the Promoter Region of Toll-Like Receptor 9 and Cervical Cancer Susceptibility. **DNA AND CELL BIOLOGY**, v. 31, n. 5, p. 766–771, 2012.
- CICEKLIYURT, M.M.; DERMENCI, B. Relationship between oxytocin receptor gene polymorphism and hypertension in Turkish population. **Rev Port Cardiol**, S0870-2551, n. 22, 2022.
- CLARO, I.B.; LIMA, L.D.; ALMEIDA, P.F. Cervical cancer guidelines, prevention and screening strategies: experiences from Brazil and Chile. **Cien Saude Colet**, v. 26, n. 10, p. 4497-4509, 2021.

COSTA, S.R.P.; ANTUNUS, R.C.P.; LUPINACCI, R.A. A exenteração pélvica para o tratamento da neoplasia pélvica localmente avançada e recorrente: experiência de 54 casos operados. **Rev Soc Bras Cancerol**, v. 11, n. 35, p. 13-22, 2008.

CUI, Y. *et al.* The genetic polymorphisms in the *SP4* gene and the risk of gastric cancer. **Future Oncol**, v. 18, 36, p. 3993-4004, 2022.

CURA, Y. *et al.* Genetic polymorphisms on the effectiveness or safety of breast cancer treatment: Clinical relevance and future perspectives. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 788, e108391, 2021.

de Matos, L.G. *et al.* Association between Toll-like receptor and tumor necrosis factor immunological pathways in uterine cervical neoplasms. **Tumori**, v. 103, n. 1, p. 81-86. 2017.

DOUZANDEH-MOBARREZ B. *et al.* TLR9 in the Human Papilloma Virus Infections: Friend or Foe? **Viral Immunol**, v. 35, n. 7, 2022.

FAIZAN, U.; MUPPIDI, V. Uterine Cancer. **Treasure Island (FL): StatPearls**, 2024.
FERLAY, J. *et al.* Global cancer observatory: cancer today. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer**, 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira. Portal de Boas Práticas em Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente. Postagens: Rastreamento do Câncer do Colo do Útero: cobertura, periodicidade e população-alvo. Rio de Janeiro, 2018.

HAREŹA, D.A.; WILCZYŃSKI, J.R.; PARADOWSKA, E. Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 3, p. 1818, 2022.

HÖCKEL, M. Laterally extended endopelvic resection. Novel surgical treatment of locally recurrent cervical carcinoma involving the pelvic side wall. **Gynecol Oncol**, v. 91, n. 2, p. 369-77, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

KAMIZA, A.B. *et al.* Association of TP53 rs1042522 with cervical cancer in the sub-Saharan African population: a meta-analysis. **Trop Med Int Health**, v. 25, n.6, p. 666-672, 2020.

KIRAN, B. *et al.* GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. *Journal of gynecologic oncology*, v. 21, n. 3, p. 169-173, 2010.

KONTOMANOLIS, E. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. **J BUON**, v.26, n. 5, p. 1723-1734, 2021.

LARA, L.A.S.; ABDO, C.H.N. Aspectos da atividade sexual precoce. **Rev. Bras. Ginecol**, v. 37, n. 5, 2015.

LIU, S. *et al.* Polymorphisms in the CCR5 promoter associated with cervical intraepithelial neoplasia in a Chinese Han population. **BMC cancer**, v. 19, p. 1-10, 2019.

LUVISARO, B.M.O. *et al.* Environmental factors associated with human papillomavirus vaccine coverage in adolescents: 2016-2020 analysis. **Rev Lat Am Enfermagem**, v. 30, e3804, 2022.

MADAN, E. *et al.* Cell Competition in Carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 82, n. 24, p. 4487-4496, 2022.

MAYADEV, J.S. *et al.* Global challenges of radiotherapy for the treatment of locally advanced cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 32, n. 3, p. 436-445, 2022.

MOURA, E.L. *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptors genes changes the host's immune response and is associated with cervical cancer. **Immunobiology**, v. 227, n. 2, 152187, 2022.

MOURA, L.L.; CODEÇO, C.T.; LUZ, P.M. Human papillomavirus (HPV) vaccination coverage in Brazil: spatial and age cohort heterogeneity. **Rev Bras Epidemiol**, v. 24, e210001, 2020.

MUSUNURU, H.B. *et al.* Advances in management of locally advanced cervical cancer. **Indian J Med Res**, v. 154, n. 2, p. 248-261, 2021.

National Institute of Health, U.S. National Library of Medicine. Radical versus simple hysterectomy and pelvic node dissection with low-risk early stage cervical cancer, ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01658930, 2020.

OLIVEIRA, L.B. *et al.* Villa1,3 and for the Ludwig–McGill Cohort Study. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 1858–1864, 2013.

Organização Mundial de Saúde. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. OMS: Genebra, 2020.

OYOUNI, A.A.A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. **J Infect Public Health**, v. 16, n. 4, p. 626-631, 2023.

PANDEY N.O. *et al.* Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 972-9, 2019.

PANDEY, N. *et al.* Influence of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes on multiple hrHPV infections and HPV16 copy number in cervical cancer and cervicitis. **Microb Pathog**, v. 159, 105149, 2021.

PARK, J.H.; PYUN, W.Y.; PARK, H.W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**, v. 9, n. 10, 2308, 2020.

PATEL, S. *et al.* Imaging of endometrial and cervical cancer. **Insights Imaging**, v. 1, p. 309-328, 2010.

PEDRO, A. *et al.* Orientações de Consenso para a Abordagem dos Resultados Alterados nos Testes de Rastreio do Cancro do Colo do Útero pela SPCPTGI [Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests by the SPCPTGI]. **Acta Med Port**, v. 36, n. 4, p. 285-295, 2023.

PEREIRA, A.P.L. *et al.* *IL-10* c.-592C>A (rs1800872) polymorphism is associated with cervical cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 146, p. 1971–1978, 2020.

PETERS, W.A. *et al.* Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. **J Clin Oncol**, v. 18, p. 1606-1613, 2000.

PODDAR, P.; MAHESHWARI, A. Surgery for cervical cancer: consensus & controversies. **Indian J Med Res**, v. 154, n. 2, p. 284-292, 2021.

RAJARAM, S.; GUPTA, B. Screening for cervical cancer: Choices & dilemmas. **Indian J Med Res**, v. 154, n. 2, p. 210-220, 2021.

REGAUER, S.; REICH, O. The origin of Human Papillomavirus (HPV) - induced cervical squamous cancer. **Curr Opin Virol**, v. 51, p. 111-118, 2021.

RIZZO, R. *et al.* Implication of HLA-C and KIR alleles in human papillomavirus infection and associated cervical lesions. **Viral immunology**, v. 27, n. 9, p. 468-470, 2014.

ROSZAK, A.; LIANERI, M.; SOWIN, A. Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 8425–8430, 2012.

ROZARIO, S. *et al.* Caracterização de mulheres com câncer cervical atendidas no Inca por tipo histológico. **Rev Saude Publica**, v. 53, n. 88, 2019.

SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Rev. Bras. Cancerol**, v. 69, n. 1, e-213700, 2023.

SANTOS, W. M.; SANTOS, D. M.; FERNANDES, M. S. HPV immunization in Brazil and proposals to increase adherence to vaccination campaigns. **Revista de Saúde Pública**, v. 57, p. 79, 2023.

SCHMIEDEL, B. J. *et al.* Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. **Cell**, v. 175, n. 6, p. 1701-1715.e16, 2018.

SCHUBERT, M. *et al.* Challenges in the Diagnosis and Individualized Treatment of Cervical Cancer. **Medicina (Kaunas)**, v. 59, n. 5, p. 925, 2023.

SEDLIS, A. *et al.* A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecologic Oncology**, v. 73, p. 177-183, 1999.

SHARMA, S.; DEEP, A.; SHARMA, A. K. Current Treatment for Cervical Cancer: An Update. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 15, p. 1768-1779, 2020.

SHENG, J. *et al.* Molecular alterations and clinical relevance in cervical carcinoma and precursors. **Oncology Reports**, v. 44, n. 6, p. 2397-2405, 2020.

SIEGEL, C. L. *et al.* ACR Appropriateness Criteria(R) pretreatment planning of invasive cancer of the cervix. **Journal of the American College of Radiology**, v. 9, p. 395-402, 2012.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAN, L. T. *et al.* Change in patterns of failure after image-guided brachytherapy for cervical cancer: Analysis from the RetroEMBRACE study. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 104, p. 895-902, 2019.

TAVAKOLI, F. *et al.* Cervical Cancer Diagnosis: Insights into Biochemical Biomarkers and Imaging Techniques. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 24, n. 5, p. 605-623, 2021.

THAKUR, N. *et al.* Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 407-414, 2012.

THE SOCIETY OF GYNAECOLOGIC ONCOLOGY. SGO member update: Emerging data on the surgical approach for radical hysterectomy in the treatment of women with cervical cancer. [Acesso em: 10 ago. 2021].

TIAN, J. *et al.* Cumulative evidence for association between genetic polymorphisms and esophageal cancer susceptibility: A review with evidence from meta-analysis and genome-wide association studies. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 3, p. 1289-1305, 2019.

TIAN, S. *et al.* The Associations between Toll-Like Receptor 9 Gene Polymorphisms and Cervical Cancer Susceptibility. **Mediators Inflamm**, v. 25, 9127146, 2018.

UBINHA, A. C. F. *et al.* The Role of Pelvic Exenteration in Cervical Cancer: A Review of the Literature. **Cancers**, v. 16, p. 817, 2024.

VIEIRA, S. C. *et al.* Exenteração pélvica para câncer do colo uterino recidivado pós-radioterapia: experiência de um centro terciário do Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 1, p. 22-27, 2009.

VOLKOVA, L. V. *et al.* Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12571, 2021.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. World cancer report: cancer research for cancer prevention. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer**, 2020.

WINER, R. L. *et al.* Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 279-282, 2008.

XABREGAS, L. A. *et al.* Association of Toll-like receptors polymorphisms with the risk of acute lymphoblastic leukemia in the Brazilian Amazon. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 15159, 2022.

XUN, Y. *et al.* Toll-like receptors and toll-like receptor-targeted immunotherapy against glioma. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 176, 2021.

YANG, S. *et al.* The Relationship of the TLR9 and TLR2 Genetic Polymorphisms with Cervical Cancer Risk: a Meta- Analysis of Case-Control Studies. **Pathology & Oncology Research**, v. 26, n. 1, p. 307-315, 2018.

YIN, W. *et al.* Cancer and stem cells. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 246, n. 16, p. 1791-1801, 2021.

ZANINI, L. A. G. *et al.* Analysis of the surgical management of patients with recurrent cervical cancer after radiotherapy and chemotherapy. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 47, e20202443, 15, 2020.

ZHANG, C. *et al.* Association of TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with cervical HR-HPV infection status in Chinese Han population. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 152, 13, 2023.

ZHANG, X. *et al.* The HLA-DQB1 gene polymorphisms associated with cervical cancer risk: A meta-analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 73, p. 58-64, 2015.

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidada pelo médico e pesquisador JANSSEN LOIOLA MELO VASCONCELOS como participante da pesquisa intitulada PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO (SNPS) DO RECEPTOR TLR9 rs187084 EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE COLO UTERINO. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Esta pesquisa possui como orientador o também médico e professor DR. JUVENAL LINHARES, bem como conta com a participação de alunos de iniciação científica capacitados e treinados pela equipe.

Ao assinar este termo, você declara que aceitou submeter-se aos seguintes procedimentos e que o médico JANSSEN LOIOLA MELO VASCONCELOS explicou com clareza todas as seguintes etapas do protocolo de coleta de dados.

- RASPADO BUCAL: O material será colhido por escovado de mucosa bucal com escova do tipo “cytobrush®”, sendo o material armazenado em tubos secos. O procedimento será realizado através da fricção de um escovinha na parte interna da bochecha e em seguida a paciente bochechará 5 mL de soro fisiológico e colocará em um tubo de vidro de 20mL. O material será enviado ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS – UFC) para análise. Todo este processo é indolor, será acompanhado por um pesquisador experiente e não acarretará em prejuízo à sua saúde ou ao seu atendimento.

- ENTREVISTA: O pesquisador irá aplicar um questionário com os seguintes tópicos:

Nome completo; idade; estado civil; profissão; queixa principal; menarca; menopausa; idade do primeiro parto; número de gestações prévias; número de partos prévios; número de abortos prévios; história familiar de câncer; história prévia de tabagismo.

- REGISTRO DE PRONTUÁRIO MÉDICO

Os potenciais riscos são: condições clínicas que podem escapar do processo de diagnóstico inicial; assimilação não desejada de potenciais informações inerentes ao processo de coleta da história clínica.

Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que os polimorfismos estudados poderão estar relacionados com o câncer de colo

uterino e que possam vir a serem úteis para documentar nossa população e entender como funciona esse câncer. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

A participante não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa. Além disso, não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. A participante tem o direito de ser atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

A pesquisa ocorrerá nas seguintes instituições: Centro de Especialidades Médicas Doutor Aristides Andrade e Santa Casa de Misericórdia de Sobral.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador compromete-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

O estudo leva em consideração e se adéqua a Resolução 466/12, a qual trata das diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e seus fundamentos éticos e científicos. O pesquisador responsável garante que as informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

A pesquisa segue também as recomendações da resolução nº 441/2011 sobre cuidados e armazenamento do material biológico colhido. Os tubos identificados serão condicionados regularmente e estocados no laboratório NUBES/ LABIREP da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral. Posteriormente serão utilizados para extração do DNA e identificação do polimorfismo.

A sua contribuição será de grande valia para o desenvolvimento e progresso das pesquisas em pacientes com câncer de colo uterino.

Endereço do responsável pela pesquisa: Av. Monsenhor Aloisio Pinto, 1362. Sala 103-104. Sobral-CE.

O abaixo assinado _____, _____anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Sobral, ____/____/____

Nome da testemunha (se o voluntário não souber ler)

Data

Assinatura

- Nome do profissional que aplicou o TCLE:

APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS

- Nome completo: _____ Fone para contato:

- Instituição: _____ - Matrícula: _____

- Idade: _____ - DN: _____

- Estado civil: _____ - Profissão: _____

- Queixa principal: _____ - Menarca: _____ - Menopausa:

- G__P__A__ - Idade do primeiro parto: _____ anos

- História familiar de Câncer: () SIM () NÃO – QUAL?

- Tabagismo () SIM () NÃO / Etilismo () SIM () NÃO

- Sexarca: _____ - Número de parceiros: () 1 () 2-3 () 4-5 () >5

- Vacina do HPV () SIM () NÃO

- Idade do primeiro exame de prevenção: _____ anos

- EXAMES DE PREVENÇÃO:

- COLPOSCOPIA:

- BIOPSIA DE COLO UTERINO- ANATOMOPATOLÓGICO:

- TEMPO ESTIMADO ENTRE INÍCIO DOS SINTOMAS E DIAGNÓSTICO:

() 0-6 MESES () 6- 12 MESES () 12-24 MESES () >24 MESES

- TRATAMENTO PRÉVIO NO COLO UTERINO: () SIM () NÃO – QUAL?

- ESTADIAMENTO INICIAL:

- TRATAMENTO ONCOLOGICO:

a. CIRURGIA () SIM () NÃO

b. RT/QT/BRAQUITERAPIA () SIM () NÃO

COMPLETOU TRATAMENTO COMPLETO () SIM () NÃO

- RECIDIVA? () SIM () NÃO – ONDE?

- TRATAMENTO DA RECIDIVA:

- SEGUIMENTO ONCOLOGICO:

- TEMPO DE SEGUIMENTO: _____

- CASO () CONTROLE ()

- PRESENÇA DO POLIMORFISMO: () SIM () NÃO