



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DENISE MACEDO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *TLR4* 896 A>G (rs4986790) E *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) COM O CÂNCER DO COLO UTERINO EM MULHERES INFECTADAS PELO HPV EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE ALAGOAS, BRASIL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE E META-ANÁLISE**

Maceió  
2022

DENISE MACEDO DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *TLR4* 896 A>G (rs4986790) E  
*iNOS* -1173 C>T (rs9282799) COM O CÂNCER DO COLO UTERINO EM  
MULHERES INFECTADAS PELO HPV EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE  
ALAGOAS, BRASIL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE E META-ANÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Karol Fireman de Farias

Maceió

2022

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586a Silva, Denise Macedo da.  
Associação dos polimorfismos dos genes *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* 1173C>T (rs9282799) com o câncer do colo uterino em mulheres infectadas pelo HPV em uma amostra da população de Alagoas, Brasil : um estudo caso-controle e meta-análise / Denise Macedo da Silva. – 2022.  
83 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientadora: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo.

Co-orientadora: Karol Fireman de Farias.

Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 50-60.

Apêndices: f. 61-70.

Anexos: f. 71-83.

1. Polimorfismo genético. 2. Neoplasias do colo do útero. 3. Papillomaviridae - Alagoas. 4. Receptor Toll-Like 4. 5. Óxido nítrico sintase. Tipo II. I. Título.

CDU: 618.14-006(813.5)



## Folha de Aprovação

DENISE MACEDO DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES TLR4 896 A>G (rs4986790) E  
iNOS -1173 C>T (rs9282799) COM O CÂNCER DO COLO UTERINO EM  
MULHERES INFECTADAS PELO HPV EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE  
ALAGOAS, BRASIL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE E META-ANÁLISE

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 01 de dezembro de 2022.

### Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente  
 ELAINE VIRGINIA MARTINS DE SOUZA FIGUEIREDO  
Data: 17/12/2022 08:31:49-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Presidente – ELAINE VIRGINIA MARTINS DE SOUZA FIGUEIREDO  
(ORIENTADORA)

Documento assinado digitalmente  
 MARCIO BEZERRA SANTOS  
Data: 20/12/2022 10:08:16-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr. – MARCIO BEZERRA SANTOS – UFAL

Documento assinado digitalmente  
 ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS  
Data: 18/12/2022 13:41:21-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> – ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS - UFAL

## RESUMO

O câncer do colo do útero se configura como uma das principais causas de morte entre mulheres no mundo, representando o quarto tipo mais frequente e a quarta maior causa de morte por câncer na população feminina mundial. Esta neoplasia maligna atinge, sobretudo, mulheres socioeconomicamente vulneráveis e aproximadamente 90% dos casos estão associados à infecção por HPV de alto risco. Além disso, fatores imunológicos e genéticos, como os Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNPs) presentes em genes do hospedeiro podem desempenhar uma importante função na eliminação do vírus ou na susceptibilidade ao câncer cervical, como os SNPs em genes do receptor *Toll-like 4* (*TLR4*) e da Óxido Nítrico Sintase Induzível (*iNOS*). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a associação dos polimorfismos dos genes *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) com o câncer do colo uterino em mulheres infectadas pelo HPV em uma amostra da população de Alagoas, Brasil. Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, onde foram genotipadas 99 amostras para o gene *TLR4* 896 A>G (72 controles saudáveis, 27 casos de câncer cervical HPV+) e 120 amostras para o *iNOS* -1173 C>T (82 controles saudáveis, 38 casos de câncer cervical HPV+) por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Adicionalmente, foi realizada uma revisão sistemática e meta-análise do polimorfismo *TLR4* 896 A>G (rs4986790). No estudo caso-controle, os resultados referentes ao SNP 896A>G no gene *TLR4* mostraram uma diferença estatisticamente significativa na comparação das frequências alélicas e genotípicas, onde o alelo 896G ( $p=0,01$ ; RC com 95% IC=5,87 [1,41-24,40]) e o genótipo 896A/G foram associados ao aumento do risco de câncer cervical ( $p=0,01$ ; RC com 95% IC=6,57 [1,51-28,56]). Isto demonstra que ao comparar o homocigoto 896A/A com o heterocigoto 896A/G a presença de um alelo G foi suficiente para aumentar o risco. O poder amostral foi de 100% e a população estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p=0,63$ ). Os resultados da meta-análise do polimorfismo *TLR4* 896 A>G (rs4986790) não demonstraram associações significativas, divergindo dos resultados encontrados na população do agreste alagoano. Tal fato pode ser explicado devido à escassez de estudos de associação entre o SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e o câncer cervical, assim como o baixo número amostral dos estudos incluídos na meta-análise. Na análise geral da associação entre a variante polimórfica -1173C>T do *iNOS* e o câncer cervical, nenhuma associação foi encontrada. O genótipo raro -1173T/T não foi identificado em nenhum grupo e o heterocigoto -1173T/C apresentou uma baixa frequência nesta população. A distribuição das frequências genotípicas da população estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p=0,88$ ). Conclui-se que o alelo G no SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) representa um fator de risco para o câncer do colo uterino na população do agreste alagoano. Na meta-análise com outras populações, não foram encontradas associações. O SNP *iNOS* -1173 C>T não foi associado ao câncer cervical nesta população. Entretanto, os resultados referentes ao polimorfismo do gene *iNOS* -1173 C>T são inconclusivos devido ao tamanho limitado da amostra, que apresentou um baixo poder amostral.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Câncer do colo do útero. HPV. Receptor Toll-Like 4. Óxido Nítrico Sintase Tipo II. Alagoas.

## ABSTRACT

Cervical cancer is one of the leading causes of death among women in the world, representing the fourth most frequent and fourth leading cause of cancer death in the female population worldwide. This malignant neoplasm mainly affects socioeconomically vulnerable women and approximately 90% of cases are associated with high-risk HPV infection. In addition, immunological and genetic factors such as Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) present in host genes may play an important role in virus clearance or cervical cancer susceptibility, such as SNPs in Toll-Like Receptor 4 genes (*TLR4*) and Inducible Nitric Oxide Synthase (*iNOS*). Thus, the present study aimed to evaluate the association of *TLR4* 896 A>G (rs4986790) and *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) gene polymorphisms with cervical cancer in women infected with HPV in a sample of the population of Alagoas, Brazil. This is a case-control study, where 99 samples were genotyped for the *TLR4* 896 A>G gene (72 healthy controls, 27 cases of HPV+ cervical cancer) and 120 samples for *iNOS* -1173 C>T (82 healthy controls, 38 cases of HPV+ cervical cancer) using the real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Additionally, a systematic review and meta-analysis of the *TLR4* 896 A>G (rs4986790) polymorphism was performed. In the case-control study, the results referring to SNP 896A>G in the *TLR4* gene showed a statistically significant difference when comparing allele and genotypic frequencies, where the 896G allele ( $p=0.01$ ; OR with 95% CI=5.87 [1.41-24.40]) and 896A/G genotype were associated with increased risk of cervical cancer ( $p=0.01$ ; OR with 95% CI=6.57 [1.51-28.56]). This demonstrates that when comparing the 896A/A homozygote with the 896A/G heterozygote the presence of a G allele was sufficient to increase the risk. The sampling power was 100% and the population was in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium ( $p=0.63$ ). The results of the meta-analysis of the *TLR4* 896 A>G (rs4986790) polymorphism did not demonstrate significant associations, differing from the results found in the population of Alagoas. This fact can be explained by the scarcity of association studies between the SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) and cervical cancer, as well as the low sample size of the studies included in the meta-analysis. In the overall analysis of the association between the polymorphic variant -1173C>T of *iNOS* and cervical cancer, no association was found. The rare genotype -1173T/T was not identified in any group and the heterozygote -1173T/C had a low frequency in this population. The distribution of genotypic frequencies in the population was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium ( $p=0.88$ ). It is concluded that the G allele in the SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) represents a risk factor for cervical cancer in the population of Alagoas. In the meta-analysis with other populations, no associations were found. The *iNOS* -1173 C>T SNP was not associated with cervical cancer in this population. However, the results regarding the polymorphism of the *iNOS* -1173 C>T gene are inconclusive due to the limited sample size, which presented a low sampling power.

Keywords: Polymorphism. Cervical cancer. HPV. Toll-Like Receptor 4. Nitric Oxide Synthase Type II. Alagoas.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por neoplasia maligna do colo do útero, por 100 mil mulheres, estimadas para o triênio 2020-2022 .....	14
Figura 2 - Organização do genoma do HPV e a sua integração nas células do hospedeiro .....	17
Figura 3 - Fatores que estabeleceram o papel da infecção por HPV na etiologia do câncer cervical .....	18
Figura 4 - Imunidade inata e adaptativa .....	23
Figura 5 - Reconhecimento de padrões moleculares de diferentes patógenos infecciosos por TLRs .....	24
Figura 6 - Vias de sinalização dos TLRs .....	25
Figura 7 - Mapa do município de Arapiraca, Alagoas .....	30
Figura 8 - Gel de eletroforese da PCR com os primers $\beta$ -actina humano para controle interno da detecção do HPV .....	38
Figura 9 - Gel de eletroforese da PCR com primers MY09/11 e GP5+/6+ que anelam na região L1 do HPV para detecção viral .....	38
Figura 10 - Fluxograma da seleção dos artigos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de recomendações para conduta inicial frente aos resultados alterados de exames citopatológicos nas unidades de atenção básica .....	21
Tabela 2 - Critérios de inclusão e exclusão para seleção das participantes do estudo .....	29
Tabela 3 – Características genéticas dos polimorfismos selecionados para o estudo .....	33
Tabela 4 – Critérios de elegibilidade para inclusão e exclusão dos artigos .....	34
Tabela 5 - Distribuição por faixa etária, infecção por HPV e tipo de câncer das pacientes dos grupos casos e controles para o gene <i>TLR4</i> e <i>iNOS</i> .....	37
Tabela 6 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do SNP <i>TLR4</i> 896 A>G rs4986790 e suas associações com o câncer cervical .....	39
Tabela 7 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do SNP <i>iNOS</i> -1173 C>T rs9282799 e suas associações com o câncer cervical .....	40
Tabela 8 - Análise da qualidade dos estudos incluídos na meta-análise por meio da escala de <i>Newcastle-Ottawa</i> (NOS – Estudos caso-controle) .....	42
Tabela 9 - Caracterização dos estudos incluídos na meta-análise .....	42
Tabela 10 - Meta-análise da associação entre o SNP <i>TLR4</i> 896 A>G e o câncer cervical .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ASC	Células Escamosas Atípicas (do inglês, <i>atypical squamous cells</i> )
ASC-H	Células escamosas atípicas não se podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau
ASC-US	Possivelmente não-neoplásicas
ASP	Ácido Aspártico (do inglês, <i>Aspartic acid</i> )
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
CCU	Câncer do colo do útero
CD	Células Dendriticas
E	Genes precoce (do inglês: <i>early</i> )
G	Guanina
<i>i</i> NOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto grau (HSIL – do inglês, <i>high-grade squamous intraepithelial lesions</i> )
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
IVA	Inspeção Visual com Ácido acético
L	Genes tardio (do inglês, <i>late</i> )
L1	Proteínas de capsídeo maior
L2	Proteínas de capsídeo menor
LCR	Região regulatória (do inglês, <i>Long Control Region</i> )
LPS	Lipopolissacarídeos
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo grau (do inglês, <i>low-grade squamous intraepithelial lesions</i> )
NPDC	Núcleo de Prevenção e Diagnóstico de Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
nPCR	nested-PCR
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> )
SIL	Lesão Intraepitelial Escamosa (do inglês, <i>squamous intra-epithelial lesions</i> )

SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (do inglês, <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TLR</i>	Receptores do tipo Toll (do inglês, <i>Toll like Receptor</i> )
<i>TLR4</i>	Receptores do tipo Toll 4 (do inglês, <i>Toll like Receptor 4</i> )
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero.....	16
2.2 Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino.....	17
2.3 Papilomavírus humano (HPV): Ciclo Viral e Carcinogênese Cervical .....	18
2.4 Rastreamento e diagnóstico do câncer cervical .....	21
2.5 Resposta imunológica do hospedeiro .....	24
2.6 Polimorfismo do gene <i>TLR4</i> 896 A>G (rs4986790).....	26
2.7 Polimorfismo do gene <i>iNOS</i> -1173 C>T rs9282799 .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Geral .....	30
3.2 Específicos .....	30
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
4.1 Aspectos éticos e desenho do estudo.....	31
4.2 População e local do estudo .....	31
4.3 Coleta e armazenamento das amostras .....	32
4.3.1 Amostras do grupo controle .....	32
4.3.2 Amostras do grupo caso .....	33
4.4 Procedimentos de biologia molecular .....	33
4.4.1 Extração, quantificação e verificação do estado do DNA .....	33
4.4.2 Detecção do HPV .....	33
4.4.3 Genotipagem dos polimorfismos.....	34
4.5 Análise Estatística.....	35
4.6 Revisão sistemática com meta-análise .....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1 Aspectos sociodemográficos e clínicos das participantes do estudo.....	38
5.2 Detecção do HPV .....	39
5.3 Frequência alélica e genotípica do SNP 896 A>G no gene <i>TLR4</i> .....	41
5.4 Frequência alélica e genotípica do SNP -1173 C>T no gene <i>iNOS</i> .....	42
5.5 Meta-análise dos estudos de associação do SNP <i>TLR4</i> 896 A>G (rs4986790) na susceptibilidade ao câncer cervical .....	42
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
6.1 <i>TLR4</i> 896 A>G.....	47

<b>6.2 <i>iNOS</i> -1173 C&gt;T .....</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICE A – GRÁFICOS DE FLORESTA E DE FUNIL DA META-ANÁLISE DO POLIMORFISMO TLR4 896 A&gt;G (RS1800629) .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO .....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE C – PATENTE DEPOSITADA DURANTE O MESTRADO .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO A – PARECER SUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO C – PROTOCOLO DO KIT COMERCIAL PARA EXTRAÇÃO DE DNA ....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO D – PROTOCOLO STREGA PARA ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Ao nível global, representa a quarta causa de morte por câncer na população feminina (WHO, 2019; INCA, 2019). No Brasil, ocupa a terceira posição e as taxas de mortalidade (ajustadas pela população mundial) nas Regiões Norte (9,52/100 mil), Nordeste (5,58/100 mil) e Centro-Oeste (5,25/100 mil) estão acima do índice nacional (4,60/100 mil) (INCA, 2020). Os altos índices de mortalidade nestas Regiões estão associados à vulnerabilidade social, visto que mulheres socialmente vulneráveis estão mais expostas aos fatores de risco e possuem dificuldade de acesso ao rastreamento, ao diagnóstico precoce e ao tratamento adequado (KOCK et al., 2020; FERNANDES et al., 2019).

Devido ao alto impacto causado por esta neoplasia, em 1998 foi criado o Programa Nacional de Combate ao Câncer do Colo do Útero, visando controlar a doença. Posteriormente, foi publicada a Portaria nº408/99 acerca da criação do Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero (SISCOLO), como fruto de uma parceria entre o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) e o Departamento de Informática do SUS (DATASUS) (INCA, 2021a).

Diante da persistência da relevância do problema, o Ministério da Saúde desenvolveu ao longo dos anos diversas portarias, políticas e diretrizes para reduzir a incidência e a mortalidade por câncer do colo uterino. Em 2021, foi desenvolvido o novo Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos não Transmissíveis no Brasil (2021-2030), tendo como uma das metas reduzir em 20% a mortalidade prematura por câncer cervical (BRASIL, 2021a; INCA, 2021a). No mesmo ano foi instituída a Câmara Técnica Assessora para o enfrentamento do Câncer de Colo do Útero no âmbito da Atenção Primária à Saúde, por meio da Portaria nº 84/21 (BRASIL, 2021b).

Esses esforços ao longo das décadas se devem ao fato de que apesar da gravidade do problema, o carcinoma do colo uterino é uma doença prevenível, de desenvolvimento lento e que está associada a múltiplos fatores de risco como o comportamento sexual e reprodutivo, o tabagismo, a vulnerabilidade socioeconômica, as infecções sexualmente transmissíveis (IST) e os determinantes genéticos e imunológicos, sendo o principal destes fatores a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico (YUAN et al., 2021; INCA, 2016; CHELIMO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2006; ZUR HAUSEN, 2000).

Apesar da infecção por HPV de alto risco desempenhar um papel fundamental na progressão para o câncer cervical, ainda há muitas lacunas na literatura sobre os mecanismos

da resposta imune contra o HPV que conduzem a infecção persistente e a susceptibilidade ao câncer do colo uterino (YANG; CHENG; LI, 2017; KOSHIOL et al., 2008). Estudos demonstraram que a história natural da infecção por HPV e a progressão para o câncer cervical pode variar entre os indivíduos devido aos fatores genéticos, como os Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNPs) (ISAKOVA et al., 2019; DENG et al., 2017). Esses SNPs podem desempenhar uma importante função na eliminação do vírus ou na susceptibilidade ao câncer cervical, a exemplo dos SNPs em genes de receptores *Toll-like* (*TLRs*) e da Óxido Nítrico Sintase Induzível (*iNOS*) (MOURA et al., 2022; PANDEY et al., 2019; SOWJANYA et al., 2016; LEE et al., 2007).

Segundo Yang et al. (2017) o HPV é capaz de causar interferência na expressão e na regulação das vias de sinalização dos receptores *Toll-like*, induzindo uma infecção persistente. O receptor *Toll-like 4* (*TLR4*) está localizado na superfície celular e a sua expressão foi identificada em tecidos do colo uterino com câncer, cuja ativação pode estar relacionada a respostas pró ou antitumorais (YANG; CHENG; LI, 2017; YU et al., 2010).

A sinalização desse receptor pode acontecer tanto pela via dependente do fator de diferenciação mieloide humana 88 (MyD88) quanto pela via independente. E ao se ligar aos lipopolissacarídeos (LPS) induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e a modulação de outras diversas moléculas, como a Óxido Nítrico Sintase Induzível (*iNOS* ou *NOS2*). Essa isoforma produz maiores quantidades de Óxido Nítrico (NO), no entanto, com um intervalo maior de tempo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; PANDEY et al., 2018; YANG; CHENG; LI, 2017). Assim como o receptor *Toll-like 4* (*TLR4*), a enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (*iNOS* ou *NOS2*) também exerce um importante papel no processo de carcinogênese, visto que pode desempenhar tanto funções favoráveis ao desenvolvimento do câncer quanto funções anticancerígenas (VANNINI; KASHFI; NATH, 2015).

A importância do *TLR4* e a via de sinalização *iNOS* no câncer do colo do uterino se dá pelo fato de que foi identificada uma grande expressão da via *TLR4/iNOS* nesse tipo de carcinoma, onde foi sugerida também uma associação entre os genes dessa via e a infecção por HPV de alto risco oncogênico. O *TLR4* é um gene bastante polimórfico e a sua ativação pelos lipopolissacarídeos (LPS) inicia respostas inflamatórias que interferem nos níveis de expressão de *iNOS*, cuja regulação desses níveis está ligada a citocinas inflamatórias, como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1). Além disso, o *TLR4* ao ativar o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) interfere na transcrição da *iNOS* na resposta inflamatória, visto que a regulação dessa

isoforma é pelas vias NF- $\kappa$ B e MAPK (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; PANDEY et al., 2018; YANG; CHENG; LI, 2017; DENG et al., 2015).

Apesar dessas associações, as variações genéticas presentes nos genes *TLR4* e *iNOS* que influenciam nessas respostas imunológicas ainda carecem de investigação acerca do seu papel no processo de carcinogênese cervical, visto que as evidências sobre a associação dos polimorfismos genéticos nestes genes em mulheres com câncer cervical ainda são limitadas, principalmente na população brasileira.

Assim, o presente trabalho propõe a investigação de SNPs nos genes *TLR4* e *iNOS* em mulheres com câncer do colo uterino e HPV+ no estado de Alagoas, até então nunca investigados nesta população e norteado pela seguinte pergunta: Qual a relação entre os SNPs *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) com o câncer do colo uterino em mulheres infectadas pelo HPV no estado de Alagoas?

Diante do exposto, a hipótese levantada é de que SNPs presentes nos genes *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) podem causar alterações na resposta imune conduzindo à infecção persistente por HPV e o desenvolvimento do câncer do colo uterino. Logo, o presente estudo teve como objetivo analisar a associação dos polimorfismos dos genes *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) com o câncer do colo uterino em mulheres infectadas pelo HPV em uma amostra da população de Alagoas, Brasil.

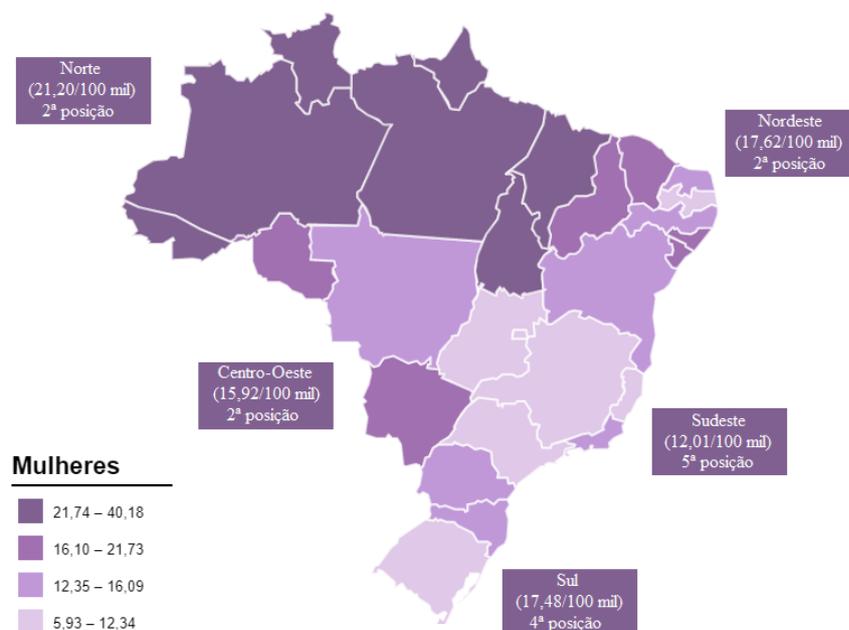
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero se configura como uma das principais causas de morte entre mulheres no mundo, representando o quarto tipo mais frequente e a quarta maior causa de morte por câncer na população feminina mundial (WHO, 2019; INCA, 2019). Em 2020 foram registrados 604.127 novos casos de neoplasias cérvico-uterinas e 341.831 óbitos, cujo ranking é liderado por países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2020).

No Brasil, é a terceira neoplasia maligna que mais acomete as mulheres, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Estima-se que para cada ano do triênio 2020-2022 surgirão 16.590 novos casos, com um risco estimado de 15,43/100 mil mulheres. Os cânceres mais incidentes em mulheres brasileiras são de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%) e colo do útero (7,4%). Este último, desconsiderando os tumores de pele não melanoma, ocupa o segundo lugar nas regiões Norte (21,20/100.000), Nordeste (17,62/100.000) e Centro-Oeste (15,92/100.000) do Brasil (Figura 1) (INCA, 2019).

**Figura 1 - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por neoplasia maligna do colo do útero, por 100 mil mulheres, estimadas para o triênio 2020-2022.**



Fonte: Adaptado de INCA (2022).

Segundo dados do Sistema de Informações de Câncer (SISCAN), no período de 2019 a 2021 foram diagnosticados 12.765 casos de neoplasia maligna do colo do útero na região Nordeste, destes, 744 eram referentes ao estado de Alagoas. Em 2021, foi registrada uma redução de 50,7% no número de diagnósticos no Nordeste e de 64,7% em Alagoas, quando comparado ao número de diagnósticos notificados no ano de 2020 (DATASUS, 2022). Essa diminuição está relacionada aos impactos causadas pela pandemia da COVID-19 nos serviços de saúde, atrasando o rastreamento e o diagnóstico de doenças como o câncer do colo do uterino (CAVALCANTI et al., 2022; INCA, 2020).

## **2.2 Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino**

O câncer, também denominado como tumor maligno ou neoplasia maligna, é uma doença genética, simplificada como o crescimento celular anormal resultante do acúmulo de mutações no DNA das células. A transformação de células normais em células tumorais aliada à incapacidade de identificação e destruição dessas células cancerosas pelo sistema imunológico, geralmente resulta na progressão de uma lesão pré-cancerígena para o câncer. No caso do câncer do colo uterino esse processo pode levar até 20 anos e alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da doença (ZHANG et al., 2020; OPAS, 2020; ROY; SAIKIA, 2016; INCA, 2016).

Os principais fatores de risco para o surgimento do câncer cervical são a vulnerabilidade socioeconômica, o tabagismo, o início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros, a multiparidade, a predisposição genética e imunológica e as infecções sexualmente transmissíveis, especialmente a infecção persistente por HPV de alto risco, sendo este o principal fator associado à doença, presente em cerca de 90% dos casos de câncer do colo uterino. Atualmente, as principais medidas para a prevenção do câncer cervical são o rastreamento de lesões em colo uterino e a vacinação contra o HPV (YUAN et al., 2021; INCA, 2016; CHELIMO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2006).

A vulnerabilidade socioeconômica interfere diretamente na incidência, na mortalidade, na sobrevida e na qualidade de vida das mulheres com câncer do colo uterino, visto que mulheres em situação de vulnerabilidade social apresentam maior exposição aos fatores de risco e sofrem com a desigualdade de acesso ao exame para rastreamento, o diagnóstico tardio e as barreiras para o início do tratamento (KOCK et al., 2020; INCA, 2020; FERNANDES et al., 2019).

O tabagismo representa um fator de risco para o câncer do colo uterino devido às alterações causadas no organismo pela nicotina e por cerca de 60 substâncias cancerígenas presentes no cigarro, como a nitrosamina cetônica derivada da nicotina (NNK) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (MOIR et al., 2008; HECHT, 2006; HECHT, 2003). Além do tabagismo ativo, o tabagismo passivo também foi associado em alguns estudos com o aumento do risco de lesões pré-cancerígenas e de câncer do colo uterino (NATPHOPSUK et al., 2012; WARD; BERENSON; BREITKOPF, 2011; TSAI et al., 2007; TAY; TAY, 2004).

O início precoce da atividade sexual e a multiplicidade de parceiros são considerados fatores de risco, pois aumentam as chances de contaminação por HPV de alto risco, que é o principal fator etiológico do câncer do colo do útero (INNERHOFER; KOFLER; RIECHELMANN, 2020; SEPÚLVEDA-CARRILLO; GOLDENBERG, 2014; LENSELINK; 2008).

No tocante à multiparidade, acredita-se que a sua associação com o câncer cérvico-uterino se deve a eversão do epitélio colunar para a ectocérvice (ectopia), causada pela elevada quantidade de estrogênio e progesterona durante a gestação e pelos traumas no colo do útero no parto. Este fenômeno, por sua vez, acaba tornando a junção escamocolunar (JEC) mais exposta e vulnerável a infecção por HPV. É importante salientar que o uso de anticoncepcionais orais também pode causar ectopia (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

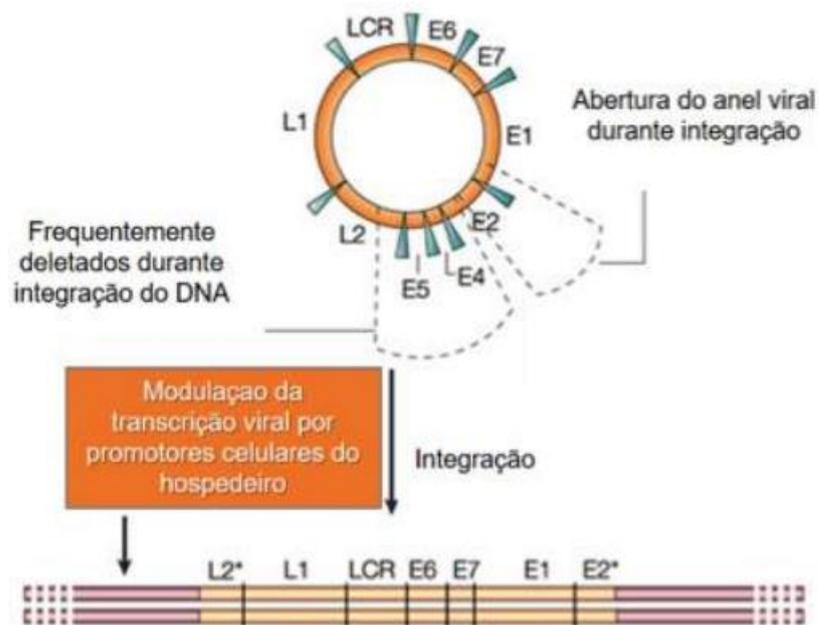
### **2.3 Papilomavírus humano (HPV): Ciclo Viral e Carcinogênese Cervical**

O papilomavírus humano (HPV), principal agente etiológico do câncer do colo uterino, é um vírus de DNA circular de fita dupla, capsídeo icosaédrico, epiteliotrópico e de aproximadamente 8000 pares de base (pb). Pertence à família *Papillomaviridae*, ao gênero *Papillomavirus* e a espécie *Human papillomavirus* (HPV), sendo nomeado dessa forma devido ao grupo animal que infecta. Dentre os 12 gêneros de *Papillomavirus* que infectam diferentes espécies animais, cinco são responsáveis por contaminar seres humanos (DE VILLIERS et al.; 2004; FAUQUET et al., 2008).

O genoma do HPV consiste em três regiões, sendo uma região reguladora (LCR - *Long Control Region*) ou (URR - *Upstream Regulatory Region*), uma região codificadora de proteínas expressas de forma precoce (E - *Early*), constituída por seis genes envolvidos na

replicação viral e transformação celular (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e outra região que codifica as proteínas expressas de forma tardia (L – *Late*) durante a infecção, formada por dois genes (L1 e L2) cujas proteínas desempenham função estrutural (Figura 2) (DE VILLIERS et al.; 2004; MUNGER et al., 2004).

**Figura 2 - Organização do genoma do HPV e a sua integração nas células do hospedeiro.**



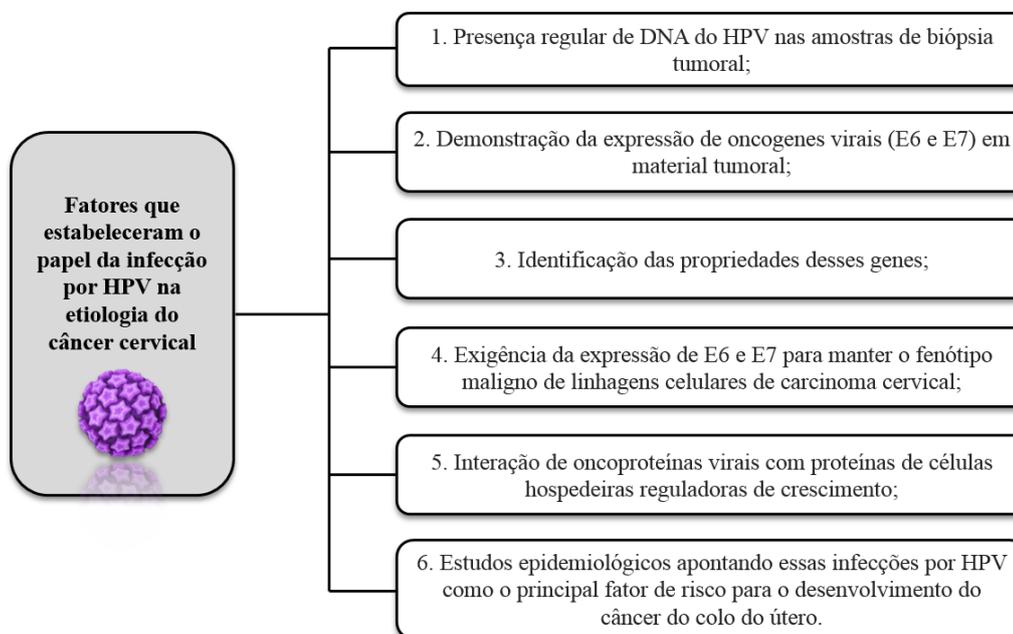
Fonte: Adaptado de ZUR HAUSEN (2002) apud CARDOSO (2017).

Devido a sua alta prevalência e transmissibilidade, a infecção por HPV representa um importante problema de saúde pública e se configura como a infecção viral do trato reprodutivo mais frequente na população mundial sexualmente ativa (OPAS, 2021; YIN et al., 2017). Embora a maioria das infecções causadas pelo HPV sejam assintomáticas e eliminadas em um período de dois anos, esse agente etiológico viral está associado a indução de lesões nos epitélios cutâneos ou mucosos, ao surgimento de verrugas benignas e neoplasias malignas, como o câncer do colo uterino, câncer orofaríngeo, câncer anal, câncer peniano, entre outros (SZYMONOWICZ; CHEN, 2020; CHEN et al., 2015; IARC, 2007; BERNARD, 2005).

A associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical foi descoberta em 1970 e, posteriormente, foi identificado o DNA do HPV-16 em amostras de biópsia na década de 80. Já em 2003 foram descritos e classificados os sete tipos de HPV de alto risco mais prevalentes e responsáveis por grande parte dos casos de câncer do colo uterino. Na Figura 3 estão apresentados alguns fatores que auxiliaram no estabelecimento do papel da

infecção por HPV na etiologia do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 1996; LEHTINEN; PAAVONEN, 2004; RAFFLE, 2007).

**Figura 3 - Fatores que estabeleceram o papel da infecção por HPV na etiologia do câncer cervical.**



Fonte: Adaptado de ZUR HAUSEN (2000).

Com o passar dos anos foram identificados mais de 200 tipos de HPV e, aproximadamente, 40 tipos são responsáveis por atingir o epitélio da região anogenital ou membranas mucosas, dos quais, cerca de 18 são considerados de alto risco ou oncogênicos (HPV-HR), sendo estes o HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-63, HPV-66, HPV-68 e HPV-82). Os outros tipos genitais (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43 e HPV-44) são considerados de baixo risco (BERNARD, 2005; DOORBAR et al., 2012).

Dentre os HPV de alto risco, os tipos 16 e 18 são os mais associados ao processo de carcinogênese e os mais frequentemente encontrados no câncer do colo do útero (IARC, 2007; HIRTH, 2019). O HPV de alto risco foi classificado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) como um dos quatro principais patógenos infecciosos cancerígenos (MARTEL et al., 2020).

O HPV é altamente epiteliotrópico e o seu ciclo viral se inicia pela infecção das células basais do epitélio escamoso estratificado, onde a entrada do vírus ocorre através de microlesões que facilitam a inserção das partículas virais, em seguida essas partículas migram em direção ao topo do epitélio e o vírus é internalizado por endocitose. Esse ciclo biológico do HPV leva

de 2 a 3 semanas. A replicação do vírus ocorre no interior do núcleo e as oncoproteínas virais do HPV de alto risco (E6 e E7) interferem no reparo de DNA, na apoptose e interagem com proteínas celulares como a p53 e a pRb que são supressoras de tumor (IARC, 2007; STANLEY, 2010).

A carcinogênese cervical induzida por HPV pode estar relacionada a integração do DNA do vírus aos cromossomos do hospedeiro, visto que os tipos oncogênicos, especialmente o 16 e o 18 induzem a imortalização celular e possuem maior carga viral, diferentemente dos tipos não-oncogênicos que provocam somente infecção e não interferem no processo de morte celular (STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999; STANLEY, 2001; YU et al., 2005; IARC, 2007; LI et al., 2008). Além disso, a persistência da infecção por um longo prazo é um fator determinante para o aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical, considerando que geralmente o CCU surge em hospedeiros que não conseguem eliminar o HPV ou mantê-lo em estado de latência, perdurando por anos a expressão de oncogenes (DOORBAR, 2006; IARC, 2007; VINOKUROVA et al., 2008; LI et al., 2008).

#### **2.4 Rastreamento e diagnóstico do câncer cervical**

O rastreamento, também chamado de *screening* ou *check-up* é um exame ou teste realizado em populações ou indivíduos saudáveis que visa a detecção precoce de doenças ou marcadores de doença, precedendo o aparecimento dos sintomas e facilitando o diagnóstico definitivo, o tratamento, a diminuição dos riscos e mortes. Assim como o rastreamento, o diagnóstico precoce também faz parte do nível de prevenção secundária, entretanto, os exames ou testes são efetuados em pessoas com sinais ou sintomas da doença em estágio inicial (BRASIL, 2010).

Atualmente, os métodos mais utilizados mundialmente para rastreamento de lesões pré-cancerígenas são o exame citopatológico (teste de Papanicolau) e o teste de inspeção visual com ácido acético (teste de IVA), entretanto, de acordo com as novas recomendações da Organização Mundial de Saúde para rastreio do câncer do colo do útero o teste de HPV baseado em DNA (teste de HPV-DNA) passa a ser recomendado como o método de preferência para esse fim (OPAS, 2021).

No Brasil, a colpocitologia oncótica continua sendo o método mais utilizado para rastreamento do câncer do colo uterino, o qual compõe as ações da Política Nacional de Prevenção do Câncer e tem suas recomendações explicitadas nas Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. Trata-se de um exame capaz de detectar alterações

morfológicas nas células do colo do útero coradas por meio da técnica de Papanicolau, identificando assim lesões pré-cancerígenas e evitando a progressão para o câncer cervical (INCA, 2016; BRASIL 2021).

Apesar da grande contribuição desse método para o rastreamento das lesões, prevenção do CCU e diminuição da mortalidade, algumas limitações e falhas da citologia oncótica são conhecidas, como o alto número de resultados falso-negativos (STABILE et al., 2012). Assim, os testes para detecção do DNA do HPV apresentam algumas vantagens em relação a citologia, como a identificação imediata da doença em estágio inicial, com uma antecipação de cerca de 10 anos no diagnóstico. A estratificação do risco é feita de acordo com a genotipagem do HPV, onde os tipos 16 e 18 apresentam maior relação com o câncer cervical. Além disso, o teste de DNA-HPV apresenta características que permitem sua implementação em larga escala e maior eficácia (TEIXEIRA et al., 2022).

O padrão-ouro para o diagnóstico do câncer do colo uterino é o exame histopatológico, também conhecido como anatomopatológico, onde são coletados por meio de biopsia fragmentos de tecidos representativos da lesão que, posteriormente, serão analisados microscopicamente quanto a sua estrutura, identificando assim a natureza da lesão (MARQUES et al., 2015).

Em relação a nomenclatura citopatológica e histopatológica, os laudos emitidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e os laboratórios conveniados seguem a Nomenclatura Brasileira de Laudos de Exames Citopatológicos, semelhante a Nomenclatura de Bethesda, onde são descritas as seguintes categorias diagnósticas: Alterações benignas, atípicas de significado indeterminado, lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), adenocarcinoma in situ (AIS) e carcinoma invasor. Diante do resultado de exames com alterações citológicas são recomendadas algumas condutas iniciais na atenção primária, como a repetição da citologia ou o encaminhamento para colposcopia, a fim de uma melhor investigação diagnóstica (Tabela 1) (INCA, 2016).

**Tabela 1 - Resumo de recomendações para conduta inicial frente aos resultados alterados de exames citopatológicos nas unidades de atenção básica.**

<b>Diagnóstico citopatológico</b>	<b>Faixa etária</b>	<b>Conduta inicial</b>
<b>Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS)</b>	< 25 anos	Repetir em 3 anos
	Entre 25 e 29 anos	Repetir a citologia em 12 meses
	≥ 30 anos	Repetir a citologia em 6 meses
	Não se podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H)	Encaminhar para colposcopia
<b>Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGC)</b>	Possivelmente não neoplásicas ou não se podendo afastar lesão de alto grau	Encaminhar para colposcopia
<b>Células atípicas de origem indefinida (AOI)</b>	Possivelmente não neoplásicas ou não se podendo afastar lesão de alto grau	Encaminhar para colposcopia
<b>Lesão de baixo grau (LSIL)</b>	< 25 anos	Repetir em 3 anos
	≥ 25 anos	Repetir a citologia em 6 meses
<b>Lesão de alto grau (HSIL)</b>		Encaminhar para colposcopia
<b>Lesão intraepitelial de alto grau não podendo excluir microinvasão</b>		Encaminhar para colposcopia
<b>Carcinoma escamoso invasor</b>		Encaminhar para colposcopia
<b>Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS) ou invasor</b>		Encaminhar para colposcopia

Fonte: Adaptado de INCA (2016).

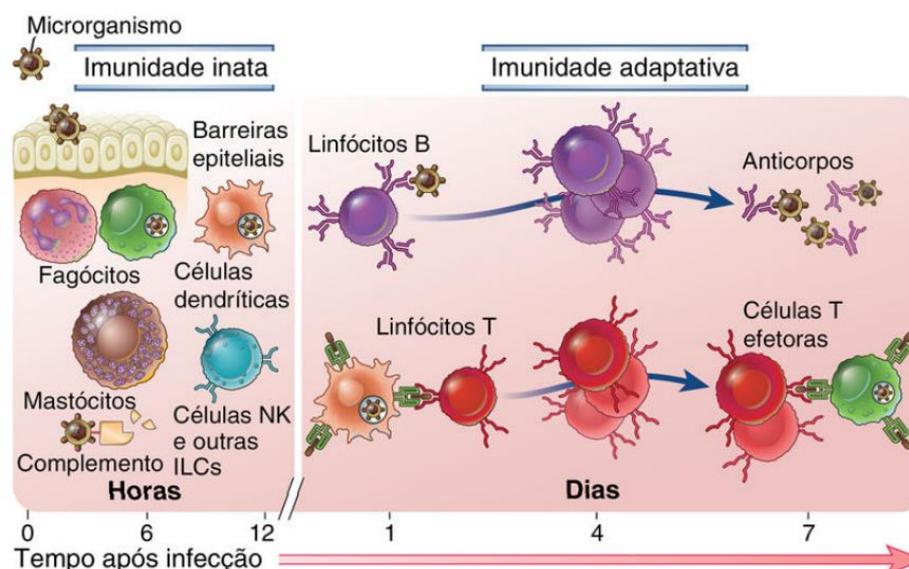
Vale salientar ainda a utilização de métodos auxiliares no rastreamento do câncer cérvico-uterino, como a investigação de polimorfismos genéticos que podem ser utilizados como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e na conduta terapêutica em pacientes com CCU (STRIMBU; TAVEL, 2010).

## 2.5 Resposta imunológica do hospedeiro

A resposta imune desempenha um papel essencial na defesa contra microrganismos infecciosos, atuando na destruição desses agentes e impedindo a progressão da infecção, assim como de diversas doenças, entre elas o câncer. Esse sistema é composto pela imunidade inata e adaptativa (Figura 4) e é formado por um extenso conjunto de células e moléculas capazes de reconhecer, destruir ou inativar diversos antígenos e estruturas moleculares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A capacidade de defesa do sistema imunológico se fundamenta inicialmente pela ação da imunidade inata ou natural, fornecendo a defesa inicial contra microrganismos infecciosos e células danificadas. A imunidade inata é composta pelos epitélios, células fagocitárias, como neutrófilos e macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células NK (*natural killer*), proteínas sanguíneas, entre outras (Figura 4). As duas principais reações desencadeadas pela resposta imune inata contra os microrganismos são a inflamação, onde ocorre o recrutamento dos fagócitos e outros leucócitos que atuam na destruição dos microrganismos, e a defesa antiviral, caracterizada pelo bloqueio da replicação viral ou a destruição das células infectadas por vírus, onde são eliminados os reservatórios da infecção viral, sem a ocorrência de uma reação inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Apesar dessa divisão entre imunidade inata e adaptativa, ambas trabalham em conjunto através de um processo simultâneo, que ocorre quando um microrganismo infeccioso consegue escapar do sistema imune inato e, então, o sistema imune adaptativo é ativado, cuja resposta é mediada pelos linfócitos e seus produtos, sendo capaz de reconhecer uma ampla variedade de antígenos. Os principais tipos são os linfócitos B, produtores de anticorpos e derivados da medula óssea, e os linfócitos T, mediadores da imunidade celular, originados na medula óssea e cuja maturação ocorre no timo (Figura 4) (JANEWAY et al., 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

**Figura 4 - Imunidade inata e adaptativa.**

Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2019).

A resposta imune adaptativa ou adquirida se subdivide em imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade humoral é constituída por anticorpos (produzidos pelos linfócitos B) que se ligam aos microrganismos impedindo-os de infectar as células. A imunidade celular é composta pelos linfócitos T (células T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, células T reguladoras) que não produzem anticorpos, mas são capazes de reconhecer os antígenos e auxiliar os fagócitos na destruição dos microrganismos e no caso das células TCD8, a destruição das células infectadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A imunidade contra infecções virais, como a infecção por HPV, ocorre a partir da integração entre a imunidade inata e a adaptativa, onde a superfície epitelial é a primeira barreira de proteção contra o HPV e a entrada do vírus ocorre através de microtraumas presentes na pele ou mucosa, expondo as células basais ao vírus (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; KOBAYASHI et al., 2000).

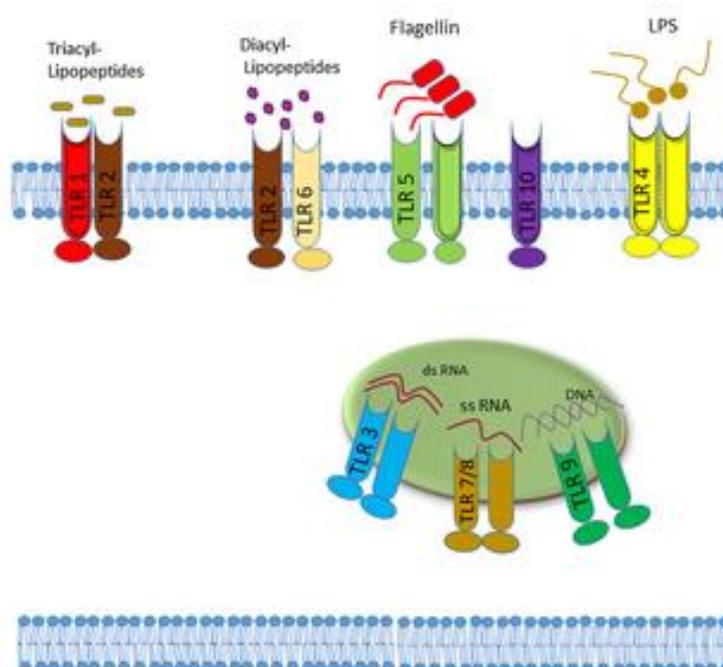
Sabe-se que o câncer do colo do útero está associado a infecção persistente por subtipos oncogênicos do HPV, entretanto, o mecanismo funcional da resposta imune contra o HPV, que conduz a infecção persistente e a susceptibilidade ao câncer cervical não está totalmente elucidado na literatura (WANG et al., 2012). Estudos têm demonstrado que fatores envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra a infecção por HPV estão associados com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer do colo do útero (YANG; CHENG; LI, 2017; AL-HARBI et al., 2017).

## 2.6 Polimorfismo do gene TLR4 896 A>G (rs4986790)

Os receptores do tipo *Toll* (TLRs, do inglês, *Toll-like receptors*) são proteínas transmembranares, receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês, *Pattern recognition receptors*) e desempenham uma importante função na imunidade inata, mediando o processo de detecção e eliminação de patógenos e controle da resposta inflamatória, sendo responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*), por exemplo, o *TLR4* reconhece lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 5) (ARBOUR et al., 2000; KABELITZ, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Foram identificados nove tipos de TLRs em seres humanos (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 e TLR9), encontrados na superfície celular e nos endossomos (Figura 5). Nesses locais ocorre a ligação do ligante ao TLR onde são ativadas vias de sinalização, cujos principais fatores de transcrição ativados por essas vias são o IRF3 e o IRF7 (fator regulador de interferon 3 e 7), o NFκB (fator nuclear κB) e a AP-1 (proteína de ativação 1) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

**Figura 5 - Reconhecimento de padrões moleculares de diferentes patógenos infecciosos por TLRs.**



Fonte: MUKHERJEE et al. (2019).

O TLR4 sinaliza tanto através do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) quanto do adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon-β (TRIF). Essa sinalização através



na base 896 (896A>G), resultando na substituição do ácido aspártico pela glicina na posição 299 da sequência de aminoácidos (Asp299Gly) (ARBOUR et al., 2000; SCHMITT et al., 2002; BARBER et al., 2004; KOLEK et al., 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Essas variações na sequência do DNA são geradas por mutações e denominadas de polimorfismos, apresentando uma frequência acima de 1% na população. Quando a variação em uma população ocorre em apenas um par de bases no DNA, trata-se de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *single-nucleotide polymorphism*), ocorrendo aproximadamente a cada 1.200 pb (pares de base) do genoma humano. Além disso, devido à sua frequência e distribuição no genoma humano os SNP são considerados marcadores genéticos de grande utilidade, visto que podem afetar a expressão dos genes e influenciar na susceptibilidade à infecção por HPV e ao câncer cervical (SNUSTAD; SIMMONS, 2017; GRIFFITHS et al., 2013; NATHA et al., 2020).

## **2.7 Polimorfismo do gene *iNOS* -1173 C>T rs9282799**

O óxido nítrico (NO) é um composto gasoso, radical livre, vasodilatador, citotóxico e desempenha importantes funções fisiológicas, como a participação na defesa do sistema imunológico e mensageiro celular. A síntese de NO é realizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), onde ocorre a reação de oxidação da L-arginina em L-citrulina e o NO é liberado. Existem três tipos de sintases de NO: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). Através de reações imunológicas e citotóxicas os lipossacarídeos (LPS) estimulam a ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), obtendo assim o óxido nítrico (NO) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; BELIGNI et al., 2002; HUGHES, 2008).

Ao se integrar ao genoma do hospedeiro o HPV causa interferência na resposta imune e atua no aumento dos níveis de inflamação, colaborando assim para o processo de carcinogênese cervical (SREEDEVI; JAVED; DINESH, 2015). Nesse processo estão envolvidas algumas moléculas pró-inflamatórias como as interleucinas 1, 6, 8 e 18 (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), entre outras (DEIVENDRAN; MARZOOK; RADHAKRISHNA PILLAI, 2014).

A iNOS é independente de cálcio e se evidencia por gerar mais NO do que as outras isoformas e o seu gene está localizado no cromossomo 7q11.2-q12 (VANNINI; KASHFI; NATH, 2015; PAUTZ et al., 2010). Polimorfismos presentes no gene da *iNOS* desempenham

uma importante função e podem ser considerados biomarcadores para o prognóstico de doenças como o câncer, visto que alterações nos níveis e na atividade da *iNOS* podem estar associadas a susceptibilidade ou agressividade de doenças genéticas e infecciosas (QIDWAI; JAMAL, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Analisar a associação dos polimorfismos dos genes *TRL4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) com o câncer do colo uterino em mulheres infectadas pelo HPV em uma amostra da população de Alagoas, Brasil.

#### 3.2 Específicos

- Realizar uma revisão sistemática e meta-análise dos SNPs *TRL4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799);
- Identificar o perfil sociodemográfico e clínico das participantes do estudo;
- Detectar a presença do DNA do HPV em amostras cervicais de pacientes saudáveis e em fragmentos de tecido do colo uterino provenientes de biópsia de pacientes com CCU;
- Identificar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs dos genes *TRL4* 896 A>G e *iNOS* -1173 C>T;
- Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene *TRL4* 896 A>G (rs4986790) e o câncer cervical em mulheres infectadas por HPV;
- Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) e o câncer cervical em mulheres infectadas por HPV;
- Comparar os resultados identificados na população do agreste alagoano com outros estudos realizados no Brasil e no mundo.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Aspectos éticos e desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional do tipo caso-controle realizado no município de Arapiraca, Alagoas. As pacientes foram selecionadas por meio de critérios de inclusão e exclusão, conforme o grupo do estudo (Tabela 2). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP/UFAL) e aprovado, sob parecer de número 739.340 (Anexo I). Todas as participantes receberam informações detalhadas acerca do estudo e ao aceitarem participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II). Foram respeitadas todas as diretrizes e normas regulamentadas pelas resoluções nº 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

**Tabela 2 – Critérios de inclusão e exclusão para seleção das participantes do estudo.**

Grupo	Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
<b>Caso (CCU)</b>	≥ 18 anos, diagnóstico de câncer cervical e HPV positivo.	< 18 anos, imunossuprimidas e gestantes.
<b>Controle</b>	≥ 18 anos, clinicamente saudáveis, exame citopatológico normal e HPV negativo.	< 18 anos, imunossuprimidas, gestantes e hysterectomizadas.

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

### 4.2 População e local do estudo

A pesquisa foi realizada no município de Arapiraca, segunda maior cidade do estado de Alagoas, com uma população de 214.006 habitantes, segundo o censo de 2010 e com 345,655 km<sup>2</sup> de área territorial (Figura 7) (IBGE, 2022). A cidade faz parte da região metropolitana do agreste alagoano, composta por 15 municípios e é referência no rastreamento e diagnóstico do câncer do colo do útero nessa região.

**Figura 7 – Mapa do município de Arapiraca, Alagoas.**



Fonte: SANTOS (2016).

### 4.3 Coleta e armazenamento das amostras

#### 4.3.1 Amostras do grupo controle

As amostras cervicais foram obtidas por meio da realização de exame citopatológico (Teste de Papanicolau), onde foram provocadas pequenas descamações na endocérvice e ectocérvice com o auxílio de uma espátula de madeira (espátula de Ayre) e uma escova cervical durante consulta ginecológica em cinco centros de saúde e duas unidades básicas localizadas em diferentes bairros do município de Arapiraca, Alagoas. Em seguida, as células coletadas foram depositadas e fixadas em uma lâmina para análise citológica. As escovas cervicais utilizadas durante esse processo foram armazenadas em tubos de 2mL contendo 600  $\mu$ L de PBS (Tampão fosfato salina 10 Mm pH 7,4), identificadas, refrigeradas durante o transporte, conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, realizada a extração do DNA para identificação viral.

As participantes do grupo controle eram mulheres que procuraram a atenção básica para realização do exame citopatológico. As amostras foram coletadas por discentes do curso de Enfermagem sob orientação dos pesquisadores do projeto e de enfermeiros do município de Arapiraca que aceitaram colaborar com a pesquisa. Foram realizadas também ações de educação em saúde com foco na prevenção do câncer do colo do útero, do câncer de mama e

de infecções sexualmente transmissíveis (IST), onde participaram discentes dos cursos de Enfermagem, Ciências Biológicas e Química.

#### 4.3.2 Amostras do grupo caso

O banco de amostras do Núcleo de Prevenção e Diagnóstico do Câncer (NPDC) foi utilizado para composição do grupo caso devido à ausência de pacientes com diagnóstico de câncer do colo uterino durante as coletas realizadas nas unidades de saúde. O banco de amostras era composto por blocos de tecidos embebidos em parafina, coletados por meio de biópsia e oriundos de pacientes diagnosticadas com câncer cervical por meio de exame histopatológico. As amostras foram obtidas a partir de 10 cortes de 10 µm de espessura cada e armazenadas em tubos de 2mL. Antes da extração de DNA o material passou por lavagem com xilol para remoção da parafina. Os procedimentos de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG) da Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*.

### 4.4 Procedimentos de biologia molecular

#### 4.4.1 Extração, quantificação e verificação do estado do DNA

A extração de DNA total foi realizada segundo as instruções do fabricante do kit comercial *Promega® (Company Eppendorf, Hamburg, Germany)*. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20° C em tubos de 1,5mL. A quantificação das amostras foi realizada por meio da técnica de espectrofotometria (*Biophotometerplus, Eppendorf*) e, posteriormente, o material foi aplicado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese. A visualização das bandas de DNA ocorreu por meio do transluminador com luz UV (Ultravioleta) e fotografadas através do equipamento de fotodocumentação de gel *L. PixTransilluminator (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil)* para verificação da integridade do DNA.

#### 4.4.2 Detecção do HPV

Foram consideradas adequadas as amostras com uma concentração >20 ng/µL e que apresentaram um bom estado de DNA no gel, sendo submetidas à amplificação por PCR com primers específico para o gene da β-actina humana *forward* (5' - AGCGGGAAATCGTGCGTG

- 3') e *reverse* ('5 - GGTGATGACCTGGCCGTC - 3') que amplifica um fragmento de 134 pb, o qual consiste em um gene estrutural usado para verificar a qualidade do DNA e também como controle interno da reação.

As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5  $\mu\text{L}$ , contendo 6,25  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Green Master Mix (Promega®), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (forward, reverse) e 3,25  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O livre de nuclease. As reações de amplificações foram realizadas em equipamento termociclador *Swift*® de ESCO®, sob as seguintes condições: 95 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 5 minutos. Em todos os conjuntos de reações foram usados controles negativos, formados por todos os reagentes, exceto as amostras de DNA. Os resultados das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese e visualizados em gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio e, em seguida fotografados por meio do equipamento de captura de imagem *L. Pix Transilluminator* (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

As amostras positivas para o gene  $\beta$ -actina humana foram destinadas à PCR com os primers MY09/11 e GP5+/GP6+ para amplificação do gene L1, localizado no material genético do vírus HPV. Para aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico e diminuir a probabilidade de resultados falso-positivos, foi realizado a técnica de *nested*-PCR de acordo com Demathe et al. (2010). Desse modo, 1  $\mu\text{L}$  do produto da amplificação por PCR com os iniciadores MY09/MY11 foram submetidos à outra reação de PCR, utilizando-se os iniciadores GP5+/GP6+. A PCR de ambos iniciadores foi realizada em 12,5  $\mu\text{L}$  de volume final, contendo 6,25  $\mu\text{L}$  de GoTaq Green Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (MY09/MY11-GP5+/GP6+) e 3,25  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O livre de nucleases. O produto da reação de PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio e, posteriormente, fotografado pelo aparelho *L. Pix Transilluminator* (Loccus Biotecnologia).

#### 4.4.3 Genotipagem dos polimorfismos

As amostras de DNA extraído que apresentaram absorbância maior ou igual a 20 ng/ $\mu\text{L}$ , razão das absorbâncias 260/280 nm entre 1,7-1,9, e que foram visualizadas após migração eletroforética foram diluídas na concentração de 4 ng/ $\mu\text{L}$ . Os genótipos das participantes da pesquisa em relação ao SNP 896 A>G (rs4986790) do gene TLR4 e -1173 C>T (rs9282799) do gene iNOS foram determinados pelo método de discriminação alélica através da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real utilizando

sonda *TaqMan*. As informações acerca dos polimorfismos de interesse foram obtidas através do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) (Tabela 3).

**Tabela 3 - Características genéticas dos polimorfismos selecionados para o estudo.**

Gene	Sequência de referência	Nucleotídeo substituído	Tipo de alteração	Global MAF*
<i>TLR4</i>	rs4986790	A>G	Transcricional	0,05
<i>iNOS</i>	rs9282799	C>T	Transcricional	0,01

\*MAF: do inglês, *minor allele frequency*.

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

O volume final da reação foi de 10 $\mu$ L, contendo 5 $\mu$ L de solução *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems® - *TaqDNA* polimerase, desoxirribonucleotídeos trifosfatados e tampão com MgCl<sub>2</sub>); 0,125 $\mu$ L de sonda referente aos SNPs rs1800629 (*TNFA* -308G>A) e rs1800871 (*IL-10* -819C>T) e 4,87  $\mu$ L de DNA extraído (4 ng/ $\mu$ L). As reações foram realizadas em equipamento *ABI StepOneplus* da Applied Biosystems® sob as seguintes condições: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 92 °C por 15s, 60 °C por 1min. Em todas as reações foram usados controles negativos, formados por todos os reagentes, exceto a amostra de DNA. Os resultados das reações foram fornecidos pelo *StepOne Software* versão 2.2.2 em forma de gráfico com as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada indivíduo.

#### 4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas do estudo foram feitas através do *software* SPSS 23.0. As frequências genótípicas foram testadas quanto ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) por meio do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As associações genótípicas e alélicas entre os grupos do estudo foram comparadas mediante a regressão logística, onde foram obtidos valores de associação e razão de chances (RC) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Valor de RC<1 indica a proteção, enquanto RC>1 indica o risco. As associações genótípicas foram comparadas no modelo genético codominante. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos. Os dados sociodemográficos e clínicos foram analisados por meio do teste exato de Fisher. A análise do poder do tamanho da amostra foi conduzida pelo *software* *G\*Power*

versão 3.0, utilizando os testes Qui-quadrado, *Goodness-of-fit: Contingency tables e Post hoc*, segundo Silva et al. (2016).

#### 4.6 Revisão sistemática com meta-análise

Trata-se de uma revisão sistemática com meta-análise, com protocolo registrado no PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*) sob código de identificação: CRD42022341623 e orientada pelas recomendações PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). As buscas foram realizadas nas bases de dados: PubMed, Web of Science, Science Direct, Embase, SciELO e Scopus, utilizando os seguintes termos: *Polymorphism, TLR4, “cervical cancer” e “Toll-like receptor 4”*. Não houve restrição de tempo. Os critérios de inclusão foram: Estudos de caso-controle que investigaram o polimorfismo 896 A>G no gene *TLR4* em pacientes com e sem câncer cervical, artigos completos disponíveis eletronicamente em inglês ou português e frequências genóticas (Tabela 4). Não foi possível realizar uma revisão acerca do polimorfismo -1173 C>T no gene *iNOS* em mulheres com câncer do colo uterino devido à escassez de artigos publicados com esse foco.

**Tabela 4 - Critérios de elegibilidade para inclusão e exclusão dos artigos.**

Características	Inclusão	Exclusão
<b>Pacientes (P)</b>	Mulheres com idade >18 anos e diagnóstico de câncer cervical	Pacientes sem diagnóstico histopatológico de câncer cervical
<b>Intervenção (I)</b>	Identificação de polimorfismos no gene <i>TLR4</i> 896A>G (rs4986790)	Polimorfismos no gene <i>TLR4</i> , porém com sequência de referência diferente da rs4986790
<b>Comparação (C)</b>	Grupo controle (Ausência de câncer cervical)	-
<b>Desfecho (O)</b>	Presença ou ausência de polimorfismos no gene <i>TLR4</i> no grupo de pacientes com câncer cervical	-
<b>Desenho de estudo (S)</b>	Caso-controle	Estudo randomizado, qualitativo, relato de caso, revisão, tese, editorial, comentário
<b>Publicação</b>	Idioma inglês ou português; período: Sem restrição de tempo	Artigos incompletos, indisponíveis eletronicamente ou com frequências genóticas insuficientes

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

Foram extraídas dos artigos selecionados informações como o ano de publicação, os autores, o país, os grupos de comparação, o SNP estudado, as frequências genotípicas e o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW). A avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos na meta-análise foi realizada por meio da escala de *Newcastle-Ottawa* (NOS) para estudos caso-controle, sendo classificados em baixa (0-3), moderada (4-6) e alta qualidade (7-9). Os estudos incluídos também foram analisados de acordo com as recomendações do protocolo STREGA para estudos de associação genética (Anexo IV). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software Review Manager 5.3*. Para avaliação da sensibilidade foram calculados o Odds Ratio (OR) e o Intervalo de Confiança de 95%. Foram analisados os modelos genéticos codominante, dominante, recessivo e a associação alélica. Os valores de OR agrupados foram estabelecidos pelo teste Z (valor de  $p > 0,05$ ). Para avaliação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi utilizado o teste  $\chi^2$ , considerando valor de  $p > 0,05$  como significativo. A heterogeneidade foi examinada por Q2 e estatística I2. Para detecção de viés nas comparações foi utilizado o teste de *Egger*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Aspectos sociodemográficos e clínicos das participantes do estudo

A Tabela 5 descreve as características gerais da amostra como o tipo de câncer, a presença da infecção por HPV e a idade, de acordo com o gene analisado. Em relação ao *TLR4* foram elegíveis para o estudo 99 pacientes, das quais, 72 (72,8%) pertenciam ao grupo controle e 27 (27,2%) ao grupo caso. Ao analisar a idade, foi possível observar que a média foi de 42,5 anos (DP=  $\pm 14,2$ ), se sobressaindo no grupo caso mulheres na faixa etária entre 36 – 50 anos (51,9%) e no grupo controle  $\leq 35$  anos (36,1%). Foi utilizado o teste exato de Fisher, pois 25% das células apresentaram frequências esperadas menores que 5. O teste apresentou um  $p=0,12$ , indicando que não houve diferença significativa entre a faixa etária e os grupos caso e controle (Tabela 5).

As análises do gene *iNOS* foram realizadas em 120 amostras, sendo 38 (31,7%) pertencentes ao grupo câncer cervical e 82 (68,3%) ao grupo controle. A média de idade foi de 42,1 anos (DP=  $\pm 14,1$ ) e a faixa etária mais frequente foi de 36 a 50 anos (52,6%) no grupo caso e  $\leq 35$  anos (35,4%) no grupo controle. O carcinoma de células escamosas (in situ) (79%) foi o tipo histológico mais prevalente e todas as amostras do grupo casos foram HPV positivo. Os grupos de casos e controles não diferiram quanto a faixa etária ( $p=0,08$ ) (Tabela 5). A diferença no número amostral entre os polimorfismos do gene *TLR4* e *iNOS* ocorreu devido à falha na genotipagem de algumas amostras.

**Tabela 5 – Distribuição por faixa etária, infecção por HPV e tipo de câncer das pacientes dos grupos casos e controles para o gene *TLR4* e *iNOS*.**

VARIÁVEIS	<i>TLR4</i> (N=99)			<i>iNOS</i> -1173 (N=120)		
	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	<i>p</i>	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	<i>p</i>
<b>Faixa etária</b>						
≤35 anos	5 (18,5%)	26 (36,1%)	0,12	9 (23,7%)	29 (35,4%)	0,08
36 – 50 anos	14 (51,9%)	24 (33,3%)		20 (52,6%)	28 (34,1%)	
>50 anos	8 (29,6%)	17 (23,6%)		9 (23,7%)	18 (22%)	
Idade não informada	0 (0,0%)	5 (7,0%)		0 (0,0%)	7 (8,5%)	
<b>Infecção por HPV</b>						
HPV – Positivo	27 (100%)	0 (0,0%)		38 (100%)	0 (0,0%)	
HPV – Negativo	0 (0,0%)	72 (100%)		0 (0,0%)	82 (100%)	
<b>Tipo de câncer</b>						
Adenocarcinoma ( <i>in situ</i> )	1 (3,7%)	-		4 (10,5%)	-	
Carcinoma de células escamosas ( <i>in situ</i> )	23 (85,2%)	-		30 (79%)	-	
Carcinoma de células escamosas (invasivo)	3 (11,1%)	-		4 (10,5%)	-	

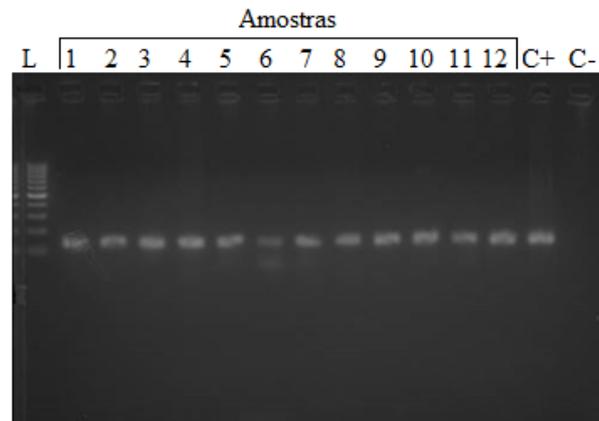
*p*: Valor de *p* referente ao teste exato de Fisher. 25% das células apresentaram frequências esperadas menores que 5.

Fonte: Dados da pesquisa (2022).

## 5.2 Detecção do HPV

Para detecção do HPV no grupo caso foram analisados 141 blocos de tecido parafinado do colo uterino, dos quais, 96 não amplificaram na PCR do controle interno e da detecção viral devido à degradação do material genético após o procedimento de extração do DNA. Todas as amostras desse grupo que amplificaram apresentaram HPV positivo e foram incluídas nesse estudo. Para composição do grupo controle, 82 mulheres foram submetidas ao exame de colpocitologia oncótica cervical e apresentaram resultado negativo para a infecção por HPV e citologia normal, estando assim elegíveis para compor esse grupo. As figuras 8 e 9 mostram os resultados visualizados em gel de agarose referentes a verificação de qualidade com amplificação do gene da  $\beta$ -actina e a técnica da nPCR utilizada para o diagnóstico molecular do HPV.

**Figura 8 - Gel de eletroforese da PCR com os primers  $\beta$ -actina humano para controle interno da detecção do HPV.**

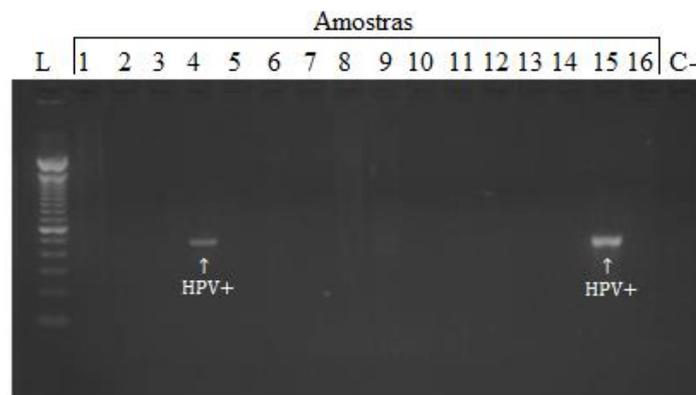


Fonte: Dados da pesquisa (2022).

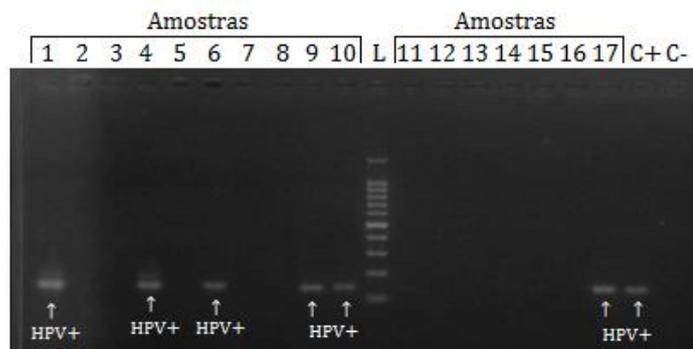
Legenda: L= Ladder (100pb); C+= Controle positivo; C-=Controle negativo.

**Figura 9 - Gel de eletroforese da PCR com primers MY09/11 e GP5+/6+ que anelam na região L1 do HPV para detecção viral.**

(A) Primers MY09/11



(B) Primers GP5+/6+



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

Legenda: L= Ladder (100pb); C+= Controle positivo; C-=Controle negativo.

### 5.3 Frequência alélica e genotípica do SNP 896 A>G no gene *TLR4*

As frequências alélicas e genotípicas do SNP *TLR4* 896 A>G estão distribuídas na Tabela 6. Ao analisar as frequências genotípicas foi possível observar que o genótipo ancestral A/A foi o mais frequente em ambos os grupos do estudo (CCU: 77,8%; Controles: 96%). O genótipo 896A/G apresentou uma baixa frequência no grupo controle (4%). As associações alélicas e genotípicas foram determinadas por meio dos valores de RC e p-valor (Tabela 6). Não foi possível realizar a comparação com todos os modelos genéticos devido à ausência do homocigoto raro (896G/G). As distribuições das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle foram significativas. No modelo codominante foi observado que o genótipo 896A/G foi significativamente mais frequente no grupo caso, sendo associado ao aumento do risco para o câncer do colo uterino ( $p=0,01$ ; RC com 95% IC=6,57 [1,51-28,56]). A comparação das frequências alélicas apresentou uma diferença significativa, indicando que o alelo G está associado ao aumento do risco de câncer cervical ( $p=0,01$ ; RC com 95% IC= 5,87 [1,41-24,40]). O poder amostral foi de 100% e a população estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p=0,63$ ).

**Tabela 6 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do SNP *TLR4* 896 A>G rs4986790 e suas associações com o câncer cervical.**

<i>TLR4</i> 896 A>G rs4986790	Controles	CCU	Controles versus CCU		EHW	GPower
			RC com 95% IC	<i>p</i>		
<b>Associação alélica</b>						
A	141 (98%)	48 (89%)	Referência			
G	3 (2%)	6 (11%)	<b>5,87 (1,41-24,40)</b>	<b>0,01</b>		
<b>Modelo genético</b>						
A/A	69 (96%)	21 (77,8%)	Referência			
<b>Codominante</b>	A/G	3 (4%)	6 (22,2%)	<b>6,57 (1,51-28,56)</b>	<b>0,01</b>	0,22 (0,63)
	G/G	0 (0,0%)	0 (0,0%)	NA (NA)		100%

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

CCU = Câncer do colo do útero; EHW = Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*; NA: Não avaliado.

$p^*$  = Valor de *p* para o EHW. Valores de  $p>0,05$  indicam aderência ao EHW.

#### 5.4 Frequência alélica e genotípica do SNP -1173 C>T no gene *iNOS*

A Tabela 7 apresenta as frequências alélicas e genotípicas referentes ao SNP *iNOS* -1173 C>T. O genótipo -1173C/C foi o mais frequente nos dois grupos (CCU: 97,4%; Controles: 97,6%) e genótipo raro -1173T/T não foi encontrado em nenhum dos grupos do estudo. Quanto à distribuição alélica, o alelo C foi o mais frequente em todos os grupos. A comparação das frequências alélicas e genotípicas do SNP *iNOS* -1173 C>T não demonstrou uma diferença significativa entre os grupos e o baixo poder amostral (5%) indica uma limitação. Foi observado que a distribuição das frequências genotípicas da população está de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p=0,88$ ).

**Tabela 7 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do SNP *iNOS* -1173 C>T rs9282799 e suas associações com o câncer cervical.**

<i>iNOS</i> -1173 C>T rs9282799		Controles	CCU	Controles versus CCU		EHW	<i>GPower</i>
		Nº (frequências)		RC com 95% IC	<i>p</i>	X <sup>2</sup> ( <i>p</i> *)	
<b>Associação alélica</b>							
	C	162 (98,8%)	75 (98,7%)	Referência			
	T	2 (1,2%)	1 (1,3%)	1,08 (0,09-12,09)	0,95		
<b>Modelo genético</b>							
	C/C	80 (97,6%)	37 (97,4%)	Referência			
<b>Codominante</b>	T/C	2 (2,4%)	1 (2,6%)	1,08 (0,09-12,30)	0,95	0,01 (0,88)	5,15%
	T/T	0 (0,0%)	0 (0,0%)	NA (NA)			

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

CCU = Câncer do colo do útero; EHW = Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*; NA= Não avaliado.

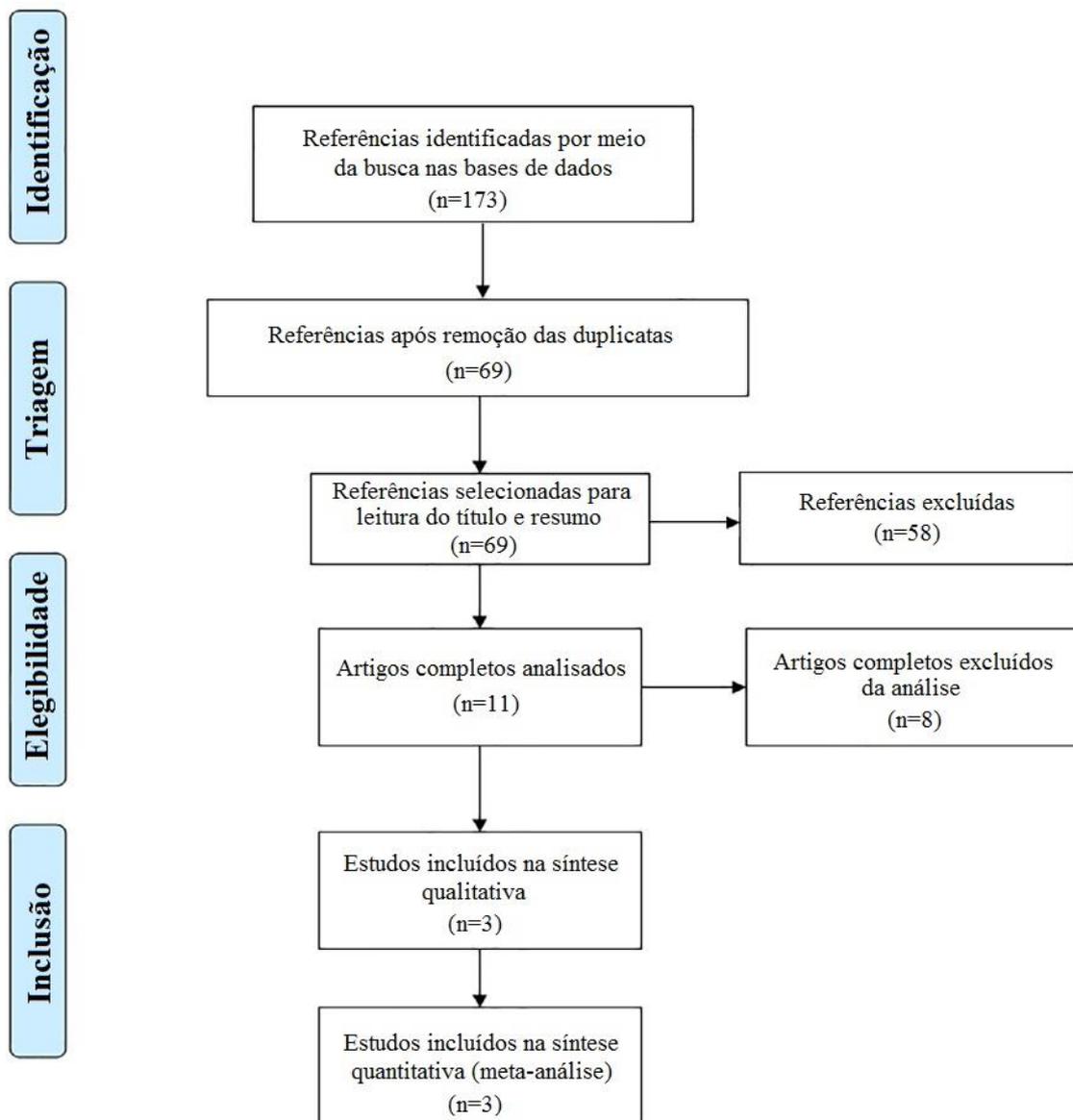
*p*\* = Valor de *p* para o EHW. Valores de  $p>0,05$  indicam aderência ao EHW.

#### 5.5 Meta-análise dos estudos de associação do SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) na susceptibilidade ao câncer cervical

Durante as buscas foram encontradas 173 referências, das quais 104 foram removidas por se tratar de duplicatas e 69 seguiram para leitura do título e resumo. Após essa etapa 11 artigos foram selecionados para leitura do texto completo, destes, 8 foram excluídos devido à falta de acesso ao texto na íntegra a um dos estudos, a comparação apenas com a carga viral e não com o genótipos e o CCU gerou a exclusão de um artigo e os demais por não avaliarem o polimorfismo *TLR4* 896 A>G (rs4986790). De modo final, 03 artigos foram incluídos na meta-

análise acerca da influência do polimorfismo *TLR4* 896 A>G (rs4986790) na susceptibilidade ao câncer cervical (PANDEY et al., 2009; ZIDI et al., 2016; PANDEY et al., 2019) (Figura 10).

**Figura 10 - Fluxograma da seleção dos artigos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.**



Fonte: Autor da pesquisa (2022).

A avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos está descrita na Tabela 8, onde dois estudos atingiram 6 pontos, sendo classificados como de qualidade moderada (PANDEY et al., 2019; PANDEY et al., 2009) e um estudo alcançou 7 pontos, sendo considerado de alta qualidade (ZIDI et al., 2016).

**Tabela 8 – Análise da qualidade dos estudos incluídos na meta-análise por meio da escala de *Newcastle-Ottawa* (NOS – Estudos caso-controle).**

<i>Newcastle-Ottawa</i> (NOS – Estudos caso-controle)	Estudos caso-controle (n=3)		
	PANDEY et al. (2009)	ZIDI et al. (2016)	PANDEY et al. (2019)
<b>Critérios de seleção</b>			
Definição adequada dos casos	0	1 (☆)	0
Representatividade dos casos	1 (☆)	1 (☆)	1 (☆)
Seleção dos controles	1 (☆)	1 (☆)	1 (☆)
Definição dos controles	1 (☆)	1 (☆)	1 (☆)
<b>Critérios de comparabilidade</b>			
Comparabilidade dos casos e controles baseado no desenho do estudo ou análise	1 (☆)	1 (☆)	1 (☆)
<b>Critérios de exposição</b>			
Determinação da exposição	1 (☆)	1 (☆)	1 (☆)
Mesmo método de determinação para casos e controles	1 (☆)	1 (☆)	1 (☆)
Taxa de não-resposta	0	0	0
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>6</b>

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

Os estudos incluídos foram realizados em países como a Índia (PANDEY et al., 2009; PANDEY et al., 2019) e a Tunísia (ZIDI et al., 2016). Em todos os trabalhos o diagnóstico do câncer do colo do útero foi realizado por meio de exame histopatológico. O período de publicação foi entre 2009 e 2019. A distribuição observada nos três artigos incluídos estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para o SNP *TLR4* 896A>G (Tabela 9).

**Tabela 9 - Caracterização dos estudos incluídos na meta-análise.**

Autores	Ano de publicação	País	Grupos	SNPs estudados	EHW
PANDEY et al.	2009	Índia	Câncer cervical vs. Controles	<i>TLR4</i> 896 A>G (rs4986790)	Sim
ZIDI et al.	2016	Tunísia	Câncer cervical vs. Controles	<i>TLR4</i> 896 A>G (rs4986790)	Sim
PANDEY et al.	2019	Índia	Câncer cervical vs. Controles	<i>TLR4</i> 896 A>G (rs4986790)	Sim

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

EHW = Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Foram metanalisados resultados provenientes de 03 estudos, com um total de 941 participantes divididas entre os grupos casos (n=390) e controles (n=551), com o objetivo de investigar a associação do polimorfismo *TLR4* 896A>G com a susceptibilidade ao câncer cervical (PANDEY et al., 2009; ZIDI et al., 2016; PANDEY et al., 2019). Ao analisar os dados da meta-análise não foram encontradas associações significativas (Tabela 10). Os gráficos de dispersão em Floresta (*forest plot*) e funil (*funnel plot*) constam no apêndice I.

**Tabela 10 – Meta-análise da associação entre o SNP *TLR4* 896 A>G e o câncer cervical.**

SNP	Comparações	Teste de associação			Modelo	Teste de heterogeneidade			Teste de Egger	
		OR (95% IC)	Z	Valor-p		$\chi^2$	Valor-p	I <sup>2</sup> (%)	Z	p
TLR4 896 A>G (rs4986790)	<b>Alelos</b>									
	G vs. A	1,42(0,79-2,54)	1,17	0,24	R	10,67	0,01	72	1,2720	0,2034
	<b>Modelo Codominante</b>									
	G/G vs. A/A	1,97 (0,84-4,63)	1,55	0,12	F	0,21	0,90	0	0,5363	0,5918
	A/G vs. A/A	1,29 (0,46-3,58)	0,49	0,63	R	21,13	<0,0001	86	0,1263	0,8995
	<b>Modelo Dominante</b>									
	A/G+G/G vs. A/A	1,44 (0,64-3,22)	0,88	0,38	R	16,06	0,001	81	0,3972	0,6912
	<b>Modelo Recessivo</b>									
	G/G vs. A/A+A/G	2,08 (0,88-4,89)	1,67	0,09	F	0,33	0,85	0	0,3324	0,7396

R: Modelo de efeitos aleatórios (*Random effects model*); F: Modelo de efeitos fixos (*Fixed effects model*); OR: Odds Ratio; Valores de p estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autor da pesquisa (2022).

## 6 DISCUSSÃO

Apesar de estar cientificamente comprovada a associação entre a infecção por HPV de alto risco e o câncer do colo uterino, outros fatores necessitam de investigação a fim de esclarecer a sua participação na carcinogênese (SZYMONOWICZ; CHEN, 2020; MARTEL et al., 2020; HIRTH, 2019; DOORBAR et al., 2012; STANLEY, 2010; LI et al., 2008; IARC, 2007; BERNARD, 2005; ZUR HAUSEN, 2002; STANLEY, 2001; ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 1996). Assim, é importante ressaltar que este é o primeiro estudo a investigar a associação dos polimorfismos dos genes *TRL4* 896 A>G (rs4986790) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) com o câncer do colo uterino na população de Alagoas.

No presente estudo, cerca de 50% das pacientes com câncer do colo uterino estavam na faixa etária de 36 – 50 anos, isto pode ser devido ao fato de que as lesões pré-cancerígenas demoram anos para evoluir para o câncer da cérvix uterina, atingindo assim em maioria mulheres com idade superior a 30 anos (MA; YANG, 2021). Em um estudo de coorte retrospectivo realizado no Brasil com 1.004 pacientes diagnosticadas com câncer do colo uterino foi observado que cerca de 70% das pacientes com CCU tinham mais de 40 anos de idade (ROZARIO et al., 2019). Resultados similares foram encontrados em outras pesquisas nacionais, onde observou-se a predominância de mulheres na faixa etária entre 40 a 59 anos (SILVA et al., 2018; MASCARELLO et al., 2012).

Isto pode estar relacionado às falhas no acesso aos serviços de saúde para rastreamento e diagnóstico do CCU (SOUZA et al., 2022; TOMASI et al., 2015), visto que o Ministério da Saúde recomenda a realização periódica do exame citopatológico dos 25 até os 64 anos, cujo intervalo para realização do exame é definido de acordo com os últimos resultados encontrados, com o intuito de identificar as lesões pré-cancerígenas prevenindo a evolução para o câncer do colo uterino (INCA, 2016).

Ao analisar a faixa etária em outros estudos realizados em países em desenvolvimento foi possível observar que na Índia a maioria das pacientes com câncer do colo do útero possuíam entre 45 e 54 anos (31,76%) (JAIN et al., 2017), na Etiópia 30,9% das mulheres com CCU tinha de 40 a 49 anos (KANTELHARDT et al., 2014) e no Nepal 33,3% possuía entre 50-60 anos (PARAJULI; DAWADI; KHADKA, 2020).

O tipo histológico mais frequente em nosso estudo foi o carcinoma de células escamosas (*in situ*) (81,8%), corroborando com os achados de estudos realizados nos estados de Pernambuco (85,19%) (SILVA et al., 2018), Espírito Santo (87,0%) (MASCARELLO et al., 2012), São Paulo (70,6%) (THULER; AGUIAR; BERGMANN, 2014) e de países como a

China (87,8%) (ZHANG et al., 2021), a Índia (88,10%) (JAIN et al., 2017) e a Venezuela (92,9%) (ALTUVE; MONSALVE; NOGUERA, 2014) que também registraram uma maior prevalência de carcinoma de células escamosas na população estudada. Esse tipo representa cerca de 80% dos casos de CCU (INCA, 2021b).

Devido à magnitude da sua incidência, morbidade e mortalidade, o câncer do colo do útero se configura como um importante problema de saúde pública (WHO, 2022). Assim, os fatores associados a regressão ou progressão para o CCU tem sido alvo de estudos há anos, entretanto, alguns fatores não estão totalmente esclarecidos, como os fatores genéticos, principalmente em países como o Brasil, etnicamente heterogêneo e miscigenado, apresentando assim uma grande variabilidade genética (LINS et al., 2010). Dessa forma, se faz necessária a realização de estudos nessa população que avaliem a associação entre fatores genéticos, como os polimorfismos e o câncer do colo do útero.

### **6.1 *TLR4 896 A>G***

A identificação de biomarcadores genéticos é de grande importância para conhecer os mecanismos envolvidos no câncer do colo uterino e auxiliar no manejo clínico das pacientes diagnosticadas com a doença. No presente estudo caso-controle, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na comparação das frequências alélicas e genotípicas, onde o alelo G ( $p=0,01$ ; RC com 95% IC=5,8 [1,4-24,4]) e o genótipo A/G foram associados ao aumento do risco de câncer cervical ( $p=0,01$ ; RC com 95% IC=6,5 [1,5-28,5]). Isso demonstra que ao comparar o genótipo ancestral A/A com o heterozigoto A/G a presença de um alelo G foi suficiente para aumentar o risco. Zidi et al. (2016) ao compararem cânceres em estágios iniciais com cânceres em estágios avançados identificaram que o alelo G e o genótipo combinado A/G+G/G estavam associados ao aumento do risco para estágios mais avançados de câncer do colo uterino.

Essa relação de risco está associada ao fato de que o *TLR4* é capaz de induzir tanto respostas inflamatórias quanto antivirais, ambas relacionadas ao processo de carcinogênese cervical (JUSTINO et al., 2019; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; SATOH; AKIRA, 2016; ZHOU et al., 2022; AGGARWAL et a., 2009). O *TLR4* atua no reconhecimento de patógenos, como o HPV, e ao sinalizar através do MyD88 ativa o fator nuclear kappa B (NFκB), induzindo assim uma resposta inflamatória e liberando produtos como citocinas pró-inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Entretanto, em alguns casos ocorre a persistência da infecção por HPV devido aos mecanismos que o vírus utiliza para escapar do sistema imunológico. Assim, esses mecanismos colaboram para que a infecção por HPV não seja acompanhada de inflamação (STANLEY, 2006). Segundo Nunes et al. (2018), o HPV de alto risco pode bloquear a ativação do NFκB e inibir a sinalização de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), além de ser capaz de comprometer tanto a imunidade inata quanto a ativação da resposta adaptativa.

Yang et al. (2017) apresentaram uma interessante contribuição acerca da interferência causada pelo HPV na expressão e na regulação das vias de sinalização dos receptores *Toll-like*, induzindo uma infecção persistente. Ainda que os mecanismos relacionados a eliminação viral não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a inflamação aguda é o principal meio utilizado pelo sistema imune inato para combater as infecções. Entretanto, alguns estudos identificaram que a inflamação crônica desempenha um importante papel no processo de carcinogênese cervical (AGGARWAL et al., 2009; SINGH et al., 2019; COUSSENS; WERB, 2002).

Devido à crescente evidência sugestiva do papel do *TLR4* na patogênese do câncer, polimorfismos genéticos dentro desse gene foram investigados por Nath et al. (2020) em um estudo realizado na Índia, onde foi identificada uma associação entre o polimorfismo do *TLR4* com o aumento da susceptibilidade à infecção por HPV de alto risco oncogênico (HPV16/18) e o carcinoma de células escamosas do colo do útero. Em mulheres chinesas foi identificado um aumento nos níveis de expressão de *TLR4* em tecidos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e de câncer cervical em comparação com o grupo controle (HASIMU et al., 2011). Em contrapartida, Aggarwal et al. (2015) realizaram um estudo do tipo caso-controle na Índia onde observaram uma diminuição na expressão de *TLR4* em mulheres com câncer cervical em comparação com mulheres saudáveis.

Moura et al. (2022) por meio de uma meta-análise e análise de bioinformática não encontraram associação entre o câncer do colo uterino e os polimorfismos *TLR4* +896A>G (rs4986790) e *TLR4* +7263G>C (rs11536889). No entanto, identificaram associações entre o CCU e os polimorfismos *TLR4* +1196C>T (rs4986791), *TLR4* -2604A>G (rs10759931) e *TLR4* +7764C>T (rs1927911) (MOURA et al., 2022). Zidi et al. (2014) ao avaliarem o papel do polimorfismo *TLR4* (Asp299Gly) na patogênese do câncer cervical em mulheres tunisianas, observaram uma associação entre o CCU, o genótipo A/A e o alelo A.

Apesar da capacidade dos SNPs de gerar uma desregulação da sinalização do *TLR4* capaz de causar um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, modulando assim o risco de inflamação crônica e câncer, os dados publicados a respeito da associação do

polimorfismo *TLR4* 896A>G com o câncer cervical ainda são controversos, visto que esses SNPs podem variar bastante entre diferentes populações (JING; LI; YUAN, 2012). Os resultados da meta-análise do polimorfismo *TLR4* 896A>G realizados neste trabalho não demonstraram associações significativas, divergindo dos resultados encontrados na população do agreste alagoano. Tal fato pode ser explicado devido à escassez de estudos de associação entre o SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) e o câncer cervical, assim como o baixo número amostral dos estudos incluídos na meta-análise, indicando assim uma limitação.

Vale ressaltar que as variantes polimórficas do receptor *Toll-like* 4 (*TLR4*) tem despertado interesse na pesquisa em relação à diversos tipos de cânceres, como o carcinoma gástrico (ZHOU et al., 2014; ZOU; WANG; FANG, 2013) e o câncer colorretal (SEMLALI et al., 2016). Além disso, também foram observados altos níveis de expressão do *TLR4* em câncer de cólon (CHUNG; KIM, 2016; HSU et al., 2011), pulmão (WANG et al., 2017), pâncreas (LANKI et al., 2018) e hepatocelular (HSIAO et al., 2015).

## 6.2 *iNOS* -1173 C>T

A óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*) é uma molécula inflamatória envolvida no câncer cervical mediado por inflamação (EBRAHIMI; SOLTANI; HASHEMY, 2018; DEIVENDRAN; MARZOOK; RADHAKRISHNA PILLAI, 2014). Entretanto, na análise geral da correlação entre o polimorfismo no gene *iNOS* e o câncer cervical, nenhuma associação foi encontrada na população do agreste alagoano. O genótipo raro -1173T/T não foi identificado em nenhum grupo e o heterozigoto -1173T/C apresentou uma baixa frequência nessa população. Os resultados encontrados são inconclusivos devido ao tamanho limitado da amostra, que apresentou um baixo poder amostral.

Apesar dessa limitação, os dados corroboram com os achados de uma meta-análise realizada por Jiao et al. (2015), onde foi analisada a relação entre polimorfismos do gene *iNOS* e o risco de câncer. Os resultados da análise demonstraram que não houve associação. Em um estudo do tipo caso-controle realizado com mulheres coreanas também não foi identificada uma associação significativa entre o polimorfismo da *iNOS* com o câncer do colo uterino (LEE et al., 2007). Apesar de ser um marcador de estresse nitrosativo e inflamação, De Marco et al. (2012) observaram uma diminuição nos níveis de expressão de *iNOS* em lesões displásicas e neoplásicas em comparação com os níveis encontrados em tecidos saudáveis.

Devido à sua influência os SNPs em genes da *iNOS* vem sendo estudados no contexto dos mais diversos tipos de câncer. Kaise et al. (2007) identificaram um aumento do risco de

carcinoma gástrico associado ao polimorfismo nesse gene na população japonesa. Ryk et al. (2015) observaram que os SNPs no gene dessa isoforma exercem influência no risco de câncer de próstata mais agressivo. Shen et al. (2007) ao investigarem o polimorfismo da óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*) e o risco de câncer de bexiga encontraram uma relação significativa com o aumento do risco de desenvolvimento desse tipo de carcinoma e também com o seu estágio clínico. Em um estudo realizado por Jorge et al. (2010) em uma população do sudeste brasileiro foi observada uma associação entre o polimorfismo *NOS2* -954 G/C e o câncer gástrico, entretanto, o SNP *NOS2* -1173 C/T não foi encontrado na amostra estudada.

## 7 CONCLUSÃO

- Na comparação das frequências alélicas e genótípicas do SNP *TLR4* 896 A>G (rs4986790) foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa, onde o alelo G (p=0,01; RC com 95% IC=5,87 [1,41-24,40]) e o genótipo A/G foram associados ao aumento do risco de câncer do colo uterino (p=0,01; RC com 95% IC=6,57 [1,51-28,56]).
- Não houve associação significativa entre o polimorfismo *iNOS* -1173C>T (rs9282799) e o câncer cervical na população do agreste alagoano.
- Na meta-análise com outras populações não foram encontradas associações significativas entre o polimorfismo *TLR4* 896 A>G e o câncer cervical.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados encontrados neste estudo contribuirão para o entendimento da patogênese do câncer do colo uterino e para a identificação de biomarcadores genéticos que poderão ser utilizados como métodos de prognóstico, diagnóstico precoce e novas estratégias terapêuticas.

São necessários novos estudos com um número amostral maior a fim de elucidar a influência do polimorfismo *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) no processo de carcinogênese cervical, visto que o número de estudos atuais é limitado.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 9ed. 2019. Elsevier Editora Ltda.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin Cancer Res**. 2009 Jan 15;15(2):425-30.

AGGARWAL, R.; MISRA, S.; GULERIA, C. et al. Characterization of Toll-like receptor transcriptome in squamous cell carcinoma of cervix: A case-control study. **Gynecol Oncol**. 2015 Aug; 138(2):358-62.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.

AL-HARBI, N. M.; BIN JUDIA, S. S.; MISHRA, K. N. et al. Genetic predisposition to cervical cancer and the association with XRCC1 and TGFB1 polymorphisms. **Int J Gynecol Cancer**. 2017; 27:1949–56.

ALTUVE, M. A.; MONSALVE, N.; NOGUERA, M. E. Incidencia de adenocarcinoma de cuello uterino en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. **Rev Obstet Ginecol Venez**, Caracas, v. 74, n. 3, p. 162-179, sept. 2014.

ARBOUR, N. C.; LORENZ, E.; SCHUTTE, B. C. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nat Genet**. 2000 Jun;25(2):187-91.

BARBER, R. C.; ARAGAKI, C. C.; RIVERA-CHAVEZ, F. A.; PURDUE, G. F.; HUNT, J. L.; HORTON, J. W. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. **J Med Genet**. 2004 Nov;41(11):808-13.

BELIGNI, M. V.; FATH, A.; BETHKE, P. C.; LAMATTINA, L.; JONES, R. L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiol**. 2002 Aug; 129(4): 1642-50.

BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**. 2005 Mar;32 Suppl 1:S1-6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/caderno\\_atencao\\_primaria\\_29\\_rastreamento.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_atencao_primaria_29_rastreamento.pdf) Acesso em: 10 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas e agravos não transmissíveis no Brasil 2021-2030. Brasília: Ministério da Saúde, 2021a. 118 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 84, de 15 de dezembro de 2021. Brasília: Ministério da Saúde, 2021b. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-84-de-15-de-dezembro-de-2021-367758071>

CAVALCANTI, G. M.; SOUSA, B. M. B.; PINHO, T. M. R. et al. Impacto da pandemia de COVID-19 no rastreamento do câncer de colo uterino em uma cidade do sul maranhense. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, e24011427161, 2022.

CARDOSO, M. F. S. Biomarcadores no câncer cervical: aspectos moleculares e computacionais. Recife, 2017. 121 p. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco.

CHELIMO, C.; WOULDES, T. A.; CAMERON, L. D.; ELWOOD, J. M. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect.* 2013 Mar; 66(3): 207-17.

CHEN, A. A.; GHEIT, T.; FRANCESCHI, S. et al. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. **J Virol.** 2015 Oct;89(20):10680-7.

CHUNG, Y. H.; KIM, D. Enhanced TLR4 Expression on Colon Cancer Cells After Chemotherapy Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition Through Phosphorylation of GSK3 $\beta$ . **Anticancer Res.** 2016 Jul; 36(7):3383-94.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature.** 2002 Dec 19-26; 420(6917): 860-7.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) (2022). Sistema de Informação do Câncer – SISCAN. Painel – Oncologia – Brasil. 2022. Disponível em:

[http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?PAINEL\\_ONCO/PAINEL\\_ONCOLOGIABR.def](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?PAINEL_ONCO/PAINEL_ONCOLOGIABR.def)  
Acesso em: 22 jun. 2022.

DEIVENDRAN, S.; MARZOOK, K. H.; RADHAKRISHNA PILLAI, M. The Role of Inflammation in Cervical Cancer. **Inflammation and Cancer.** 2014; 377–399.

DE MARCO, F.; BUCAJ, E.; FOPPOLI, C. et al. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. **PLoS One.** 2012;7(3):e34366.

DENG, N.; ZHOU, H.; FAN, H.; YUAN, Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. **Oncotarget.** 2017 Nov 7; 8(66): 110635-110649.

DENG, S.; YU, K.; ZHANG, B. et al. Toll-Like Receptor 4 Promotes NO Synthesis by Upregulating GCHI Expression under Oxidative Stress Conditions in Sheep Monocytes/Macrophages. **Oxid Med Cell Longev.** 2015; 2015: 359315.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology.** 2004 Jun 20;324(1):17-27.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525-41.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.

EBRAHIMI, S.; SOLTANI, A.; HASHEMY, S. I. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. **J Cell Biochem**. 2018 Nov 13.

FAUQUET, C. M.; MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. *Encyclopedia of Virology*. 2008: 9–23. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150148/> Acesso em: 18 jun. 2022.

FERNANDES, N. F. S. et al. Acesso ao exame citológico do colo do útero em região de saúde: mulheres invisíveis e corpos vulneráveis. **Cad. Saúde Pública**, 35 (10), 07 Out 2019.

GLOBOCAN 2020 - Home. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf> Acesso em: 09 mai. 2022.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. Introdução à Genética. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

HASIMU, A.; LI, G. L.; LI, Q. Z.; ZHANG, R. P.; GUO, X. Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV16 infection in Uighur women. **Chin. J. Cancer** 30 (5) (2011) 344–350.

HECHT, S. S. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. **Langenbecks Arch Surg**. 2006 Nov; 391(6):603-13.

HECHT, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nat Rev Cancer**. 2003 Oct;3(10):733-44. doi: 10.1038/nrc1190. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan; 4(1):84.

HIRTH, J. Disparities in HPV vaccination rates and HPV prevalence in the United States: a review of the literature. **Hum Vaccin Immunother**. 2019;15(1):146-155.

HSIAO, C. C. et al. Toll-like receptor-4 is a target for suppression of proliferation and chemoresistance in HepG2 hepatoblastoma cells. **Cancer Lett**. 2015 Nov 1;368(1): 144-152.

HSU, R. Y. et al. LPS-induced TLR4 signaling in human colorectal cancer cells increases beta1 integrin-mediated cell adhesion and liver metastasis. **Cancer Res**. 2011 Mar 1;71(5):1989-98.

HUGHES, M. N. Chemistry of nitric oxide and related species. **Methods Enzymol**. 2008; 436:3-19.

IARC. Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2007, v. 90. Disponível em:

[https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/2799/9c5cbdc5c9ae322a22b5026c9e594451149a763f.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/2799/9c5cbdc5c9ae322a22b5026c9e594451149a763f.pdf) Acesso em: 18 jun. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/en/node/1194> Acesso em: 10 jun. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Parâmetros técnicos para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Maria Beatriz Kneipp Dias; Caroline Madalena Ribeiro (organizadores). - Rio de Janeiro: Inca, 2019. 32 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/parametros-tecnicos-para-o-rastreamento-do-cancer-do-colo-do-utero> Acesso em: 10 jun. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016. 114p.: il. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/diretrizes-brasileiras-para-o-rastreamento-do-cancer-do-colo-do-utero> Acesso em: 11 jun. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> Acesso em: 09 mai. 2022.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/mortalidade#:~:text=No%20Brasil%2C%20a%20taxa%20de,2020%20\(INCA%2C%202020\)](https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/mortalidade#:~:text=No%20Brasil%2C%20a%20taxa%20de,2020%20(INCA%2C%202020).). Acesso em: 29 ago. 2022.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Nota Técnica – DIDEPRE/CONPREV/INCA. Rastreamento de câncer durante a pandemia de COVID-19. INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/notas-tecnicas/deteccao-precoce-de-cancer-durante-pandemia-de-covid-19> Acesso em: 20 jun. 2022.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Controle do câncer do colo do útero. Histórico das ações. Rio de Janeiro: INCA, 2021a. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/historico-das-acoes#:~:text=Neste%20mesmo%20ano%20foi%20institu%C3%ADdo,de%20exames%20citopatol%C3%B3gicos%20por%20ano](https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/historico-das-acoes#:~:text=Neste%20mesmo%20ano%20foi%20institu%C3%ADdo,de%20exames%20citopatol%C3%B3gicos%20por%20ano.). Acesso em: 30 ago. 2022.

INCA. Controle do câncer do colo do útero: Conceito e magnitude. INCA, 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>

INNERHOFER, V.; KOFLER, B.; RIECHELMANN, H. High-Risk-HPV-Infektionen im Kopf-Hals-Bereich – Welche Bedeutung hat das Sexualverhalten? [Sexual Behavior and High-Risk HPV Infection in the Head and Neck]. *Laryngorhinootologie*. 2020 Sep;99(9):647-657.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **Int J Cancer**. 2006 Sep 1;119(5):1108-24.

ISAKOVA, J.; VINNIKOV, D.; BUKUEV, N. et al. TP53 Codon 72 Polymorphism and Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer in Kyrgyz Women. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2019 Apr 29; 20(4): 1057-1062.

JAIN, A.; GANESH, B.; BOBDEY, S.C.; SATHWARA, J.A.; SAOBA, S. Sociodemographic and Clinical Profile of Cervical Cancer Patients Visiting in a Tertiary Care Hospital in India. **Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology**, v. 38, n. 3, p. 291–295, 2017.

JANEWAY, C. A. JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.

JIAO, J.; WU, J.; HUANG, D.; LIU, L. Lack of association of the iNOS gene polymorphism with risk of cancer: a systematic review and Meta-Analysis. **Sci Rep**. 2015 Sep 22; 5:9889.

JING, J. J.; LI, M.; YUAN, Y. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in cancer: a meta-analysis. **Gene**. 2012 May 15;499(2):237-42.

JORGE, Y. C.; DUARTE, M. C.; SILVA, A. E. Gastric cancer is associated with NOS2 - 954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. **BMC Gastroenterol**. 2010 Jun 17; 10:64.

JUSTINO, P. F. C.; FRANCO, A. X.; PONTIER-BRES, R. et al. Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. **Cytokine**. 2020 Jan; 125:154791.

KABELITZ, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. **Curr Opin Immunol**. 2007 Feb; 19(1): 39-45.

KAISE, M. et al. Inducible nitric oxide synthase gene promoter polymorphism is associated with increased gastric mRNA expression of inducible nitric oxide synthase and increased risk of gastric carcinoma. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. 2007 Feb; 19(2):139-45.

KOBAYASHI, A.; MIASKOWSKI, C.; WALLHAGEN, M.; SMITH-MCCUNE, K. Recent developments in understanding the immune response to human papilloma virus infection and cervical neoplasia. **Oncol Nurs Forum**. 2000 May;27(4):643-51.

KOCK, K. S.; RIGHETTO, A.; MACHADO, M. O. Vulnerabilidade social feminina e mortalidade por neoplasias da mama e colo do útero no Brasil. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 9, n. 2, (maio a agosto de 2020), p. 64-77.

KOLEK, M. J.; CARLQUIST, J. F.; MUHLESTEIN, J. B. et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation,

angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. **Am Heart J.** 2004 Dec;148(6):1034-40.

KANTELHARDT, E. J. et al. Cervical cancer in Ethiopia: survival of 1,059 patients who received oncologic therapy. **Oncologist.** 2014 Jul; 19(7):727-34.

KOSHIOL, J.; LINDSAY, L.; PIMENTA, J. M. et al Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **Am J Epidemiol.** 2008 Jul 15; 168(2): 123-37.

LANKI, M. A. et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 predict favorable prognosis in local pancreatic cancer. **Tumour Biol.** 2018 Sep; 40(9):1010428318801188.

LEE, T. S.; JEON, Y. T.; KIM, J. W. et al. Lack of association of the cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of cervical cancer in Korean population. **Ann N Y Acad Sci.** 2007 Jan; 1095:134-42.

LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J. Vaccination against human papillomaviruses shows great promise. **Lancet,** 2004; 364:1731-2.

LENSELINK, C. H. et al. Sexual behaviour and HPV infections in 18 to 29 year old women in the pre-vaccine era in the Netherlands. **PLoS One.** 2008; 3(11):e3743.

LI, W.; WANG, W.; SI, M. et al. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol.** 2008 Dec;134(12):1355-61.

LINS, T. C.; VIEIRA, R. G.; ABREU, B. S.; GRATTAPAGLIA, D.; PEREIRA, R. W. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **Am J Hum Biol.** 2010 Mar-Apr; 22(2):187-92.

MA, X.; YANG, M. The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer. **Am J Transl Res.** 2021 Sep 15;13(9):10830-10836.

MARQUES, C. L. T. Q.; BARRETO, C. L.; MORAES, V. L. L.; LIMA JUNIOR, N. *Oncologia: Uma abordagem multidisciplinar.* Recife: Carpe Diem Edições e Produções Ltda, 2015. 822 p.

MARTEL, C.; GEORGES, D.; BRAY, F.; FERLAY, J.; CLIFFORD, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **Lancet Glob Health.** 2020 Feb; 8(2):e180-e190.

MASCARELLO, K. C.; SILVA, N. F.; PISKE, M. T.; VIANA, K. C. G.; ZANDONADE, E.; AMORIM, M. H. C. Perfil Sociodemográfico e Clínico de Mulheres com Câncer do Colo do Útero Associado ao Estadiamento Inicial. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2012; 58(3): 417-426.

MI, Y. et al. Genetic variants in microRNA target sites of 37 selected cancer-related genes and the risk of cervical cancer. **PLoS ONE,** v. 9, n. 1, 2014.

- MOIR, D. et al. A comparison of mainstream and sidestream marijuana and tobacco cigarette smoke produced under two machine smoking conditions. **Chem Res Toxicol**. 2008 Feb; 21(2):494-502.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**. 1991 Jun; 43(2): 109-42.
- MOURA, E. L. et al. Polymorphisms in Toll-like receptors genes changes the host's immune response and is associated with cervical cancer. **Immunobiology**. 2022 Mar;227(2):152187.
- MUKHERJEE, S.; HUDA, S.; SINHA BABU, S. P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. **Scand J Immunol**. 2019 Jul; 90(1):e12771.
- MUNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M. et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **J Virol**. 2004 Nov; 78(21):11451-60.
- NATHA, N.; MISHRAB, P.; PANDAC, A. K.; MISHRAA, R. Polymorphisms and haplotypes of TLR4, TLR9 and CYP1A1 genes possibly interfere with high-risk human papillomavirus infection and cervical cancer susceptibility in Jharkhand, India. **Int Immunopharmacol**. 2020 Nov; 88:106925.
- NATPHOPSUK, S. et al. Risk factors for cervical cancer in northeastern Thailand: detailed analyses of sexual and smoking behavior. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2012; 13(11):5489-95.
- NUNES, R. A. L.; MORALE, M. G.; SILVA, G. Á. F.; VILLA, L. L.; TERMINI, L. Innate immunity and HPV: friends or foes. **Clinics (Sao Paulo)**. 2018 Oct 11;73(suppl 1):e549s.
- OLIVEIRA, M. M. H. N.; SILVA, A. A. M.; BRITO, L. M. O.; COIMBRA, L. C. Cobertura e fatores associados à não realização do exame preventivo de Papanicolaou em São Luís, Maranhão. **Rev. bras. epidemiol**. 9 (3), Set 2006.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Novas recomendações de rastreio e tratamento para prevenir o câncer do colo do útero. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/6-7-2021-novas-recomendacoes-rastreio-e-tratamento-para-prevenir-cancer-do-colo-do-uterio> Acesso em: 10 jun. 2022.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. HPV e câncer do colo do útero. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/hpv-e-cancer-do-colo-do-uterio> Acesso em: 15 jun. 2022.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Câncer. Folha informativa atualizada em outubro de 2020. OPAS, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer> Acesso em: 27 ago. 2022.
- PANDEY, N.; CHAUHAN, A.; JAIN, N. TLR4 Polymorphisms and Expression in Solid Cancers. **Mol Diagn Ther**. 2018 Dec; 22(6): 683-702.
- PANDEY, N.O.; CHAUHAN, A.V.; RAITHATHA, N. S. et al. Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility. **Sci Rep**. 2019.

- PANDEY, S.; MITTAL, R. D.; SRIVASTAVA, M. et al. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. **Gynecol Oncol**. 2009 Sep;114(3): 501-5.
- PARAJULI, G.; DAWADI, P.; KHADKA, S. Prevalence of Cervical Cancer among Cervical Biopsies in a Tertiary Care Center. **JNMA J Nepal Med Assoc**. 2020 Jul 31; 58(227):453-455.
- PAUTZ A.; ART, J.; HAHN, S.; NOWAG, S.; VOSS, C.; KLEINERT, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**. 2010 Sep 15;23(2):75-93.
- QIDWAI, T.; JAMAL, F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence. **Scand J Immunol**. 2010 Nov; 72(5): 375-87.
- RAFFLE, A. E. Challenges of implementing human papillomavirus (HPV) vaccination policy. **BMJ**. 2007 Aug 25; 335(7616): 375–377.
- ROY, P. S.; SAIKIA, B. J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian J Cancer**. 2016 Jul-Sep; 53(3): 441-442.
- ROZARIO, S.; SILVA, I. F.; KOIFMAN, R. J.; SILVA, I. F. Caracterização de mulheres com câncer cervical atendidas no Inca por tipo histológico. **Rev Saude Publica**. 2019; 53:88.
- RYK, C. et al. Polymorphisms In The Nitric-Oxide Synthase 2 Gene And Prostate Cancer Pathogenesis. **Redox Biol**. 2015 Aug; 5:419.
- SANTOS, A. M. Estudos Culturais da Paisagem: Canafístula Esplendor Cultural. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, v. 04, n. 28, 2016, pp. 111-129.
- SATOH, T.; AKIRA, S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. **Microbiol Spectr**. 2016 Dec; 4(6).
- SCHMITT, C.; HUMENY, A.; BECKER, C. M.; BRUNE, K.; PAHL, A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. **Clin Chem**. 2002 Oct;48(10):1661-7.
- SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiantes. Washington, D.C.: OPAS, 2004.
- SEMLALI, A. et al. Expression and Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 and Effect on NF- $\kappa$ B Mediated Inflammation in Colon Cancer Patients. **PLoS One**. 2016 Jan 15;11(1):e0146333.
- SEPÚLVEDA-CARRILLO, G. J.; GOLDENBERG, P. Conhecimentos e práticas de jovens sobre a infecção pelo papiloma vírus humano - uma questão re-atualizada. **Rev Colomb Obstet Ginecol**. Vol.65 no.2, Bogotá, Apr./June 2014.
- SHEN, C. H. et al. Inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism, cigarette smoking, and urothelial carcinoma risk. **Urology**. 2007 May; 69(5):1001-6.

SILVA, R. C. G.; SILVA, A. C. O.; PERES, A. L.; OLIVEIRA, S. R. Perfil de mulheres com câncer de colo do útero atendidas para tratamento em centro de oncologia. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.** 18 (4); Oct-Dec 2018.

SINGH, N.; BABY, D.; RAJGURU, J. P.; PATIL, P. B.; THAKKANAVAR, S. S.; PUJARI, V. B. Inflammation and cancer. **Ann Afr Med.** 2019 Jul-Sep;18(3):121-126.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Fundamentos de genética. 7ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SOUZA, G. R. M.; CARDOSO, A. M.; PÍCOLI, R. P.; MATTOS, I. E. Profile of cervical cancer screening in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil: an evaluative study, 2006-2018. **Epidemiol Serv Saude.** 2022 Aug 29;31(2):e20211179.

SOWJANYA, A. P. et al. Correlation of plasma nitrite/nitrate levels and inducible nitric oxide gene expression among women with cervical abnormalities and cancer. **Nitric Oxide.** 2016 Jan 30;52: 21-8.

SREEDEVI, A.; JAVED, R.; DINESH, A. Epidemiology of cervical cancer with special focus on India. **Int J Womens Health.** 2015 Apr 16; 7:405-14.

STABILE, S. A. B. et al. Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncológica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido. **Einstein.** 2012; 10 (4): 466-72.

STANLEY, M. A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** 2001 Oct;15(5): 663-76.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol.** 2010 May; 117(2 Suppl): S5-10.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine.** 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS.** 2010 Nov; 5(6):463-6.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Semin Cancer Biol.** 1999 Dec; 9(6): 379-86.

SZYMONOWICZ, K. A.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biol Med.** 2020 Nov 15; 17(4): 864–878.

TAY, S. K.; TAY, K. J. Passive cigarette smoking is a risk factor in cervical neoplasia. **Gynecol Oncol.** 2004 Apr; 93(1):116-20.

TEIXEIRA, J. C. et al. Organization of cervical cancer screening with DNA–HPV testing impact on early–stage cancer detection: a population–based demonstration study in a Brazilian city. **The Lancet Regional Health – Americas.** 2022; 5: 100084.

THULER, L. C. S.; AGUIAR, S. S.; BERGMANN, A. Determinantes do diagnóstico em estágio avançado do câncer do colo do útero no Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2014; 36 (6): 237-43.

TOMASI, E. et al. Estrutura e processo de trabalho na prevenção do câncer de colo de útero na Atenção Básica à Saúde no Brasil: Programa de Melhoria do Acesso e da Qualidade – PMAQ. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.** 15 (2), Apr-Jun 2015.

TSAI, H. T. et al. Lifetime cigarette smoke and second-hand smoke and cervical intraepithelial neoplasm--a community-based case-control study. **Gynecol Oncol.** 2007 Apr; 105(1):181-8.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biol.** 2015 Dec; 6:334-343.

VINOKUROVA, S.; WENTZENSEN, N.; KRAUS, I. et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. **Cancer Res.** 2008 Jan 1;68(1):307-13.

WANG, K.; WANG, J.; WEI, F. et al. Expression of TLR4 in Non-Small Cell Lung Cancer Is Associated with PD-L1 and Poor Prognosis in Patients Receiving Pneumonectomy. **Front Immunol.** 2017 Apr 21; 8:456.

WANG, N. et al. TNF-Alpha rs1800629 Polymorphism Is Not Associated with HPV Infection or Cervical Cancer in the Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

WARD, K. K.; BERENSON, A. B.; BREITKOPF, C. R. Passive smoke exposure and abnormal cervical cytology in a predominantly Hispanic population. **Am J Obstet Gynecol.** 2011 Mar; 204(3): 213.e1-6.

WHO. World Health Organization. Folha informativa - HPV e câncer do colo do útero. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5634:folha-informativa-hpv-e-cancer-do-colo-do-utero&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5634:folha-informativa-hpv-e-cancer-do-colo-do-utero&Itemid=839) Acesso em: 09 mai. 2022.

WRIGHT Jr, T. C.; SCHIFFMAN, M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. **N Engl J Med.** 2003;348(6):489-90.

YANG, X.; CHENG, Y.; LI, C. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review. **Signal Transduct Target Ther.** 2017 Nov 3; 2:17055.

YIN, F.; WANG, Y.; CHEN, N. et al. A novel trivalent HPV 16/18/58 vaccine with anti-HPV 16 and 18 neutralizing antibody responses comparable to those induced by the Gardasil quadrivalent vaccine in rhesus macaque model. **Papillomavirus Res.** 2017 Jun; 3:85-90.

YU, T.; FERBER, M. J.; CHEUNG, T. H.; CHUNG, T. K.; WONG, Y. F.; SMITH, DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. **Cancer Genet Cytogenet.** 2005 Apr 1;158(1):27-34.

YU, L.; WANG, L.; LI, M.; ZHONG, J.; WANG, Z.; CHEN, S. Expression of toll-like receptor 4 is down-regulated during progression of cervical neoplasia. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jul;59(7):1021-8.

YUAN, Y.; CAI, X.; SHEN, F.; MA, F. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. *Cancer Lett.* 2021 Jan 28; 497: 243-254.

ZHANG, X. R.; LI, Z. Q.; SUN, L. X.; LIU, P.; LI, Z. H. et al. Cohort Profile: Chinese Cervical Cancer Clinical Study. *Front Oncol.* 2021 Jun 18; 11:690275.

ZHANG, S.; XU, H.; ZHANG, L.; QIAO, Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chin J Cancer Res.* 2020 Dec 31; 32(6): 720-728.

ZHOU, Q. et al. Association between TLR4 (+896A/G and +1196C/T) polymorphisms and gastric cancer risk: an updated meta-analysis. *PLoS One.* 2014 Oct 7; 9(10):e109605.

ZHOU, Z. W.; LONG, H. Z.; XU, S. G. et al. Therapeutic Effects of Natural Products on Cervical Cancer: Based on Inflammatory Pathways. *Front Pharmacol.* 2022 May 13; 13: 899208.

ZOU, T. H.; WANG, Z. H.; FANG, J. Y. Positive association between Toll-like receptor 4 gene +896A/G polymorphism and susceptibility to gastric carcinogenesis: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013 Aug;34(4):2441-50.

ZIDI, S.; SGHAIER, I.; GAZOUANI, E.; MEZLINI, A.; YACOUBI-LOUESLATI, B. Evaluation of Toll-Like Receptors 2/3/4/9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Evolution. *Pathol Oncol Res.* 2016 Apr; 22(2): 323-30.

ZIDI, S. et al. Involvement of Toll-like receptors in cervical cancer susceptibility among Tunisian women. *Bull Cancer.* 2014 Oct; 101(10): E31-5.

ZINGARELLI, B. Nuclear factor- $\kappa$ B. *Critical Care Medicine.* v. 33, n. 12, p. s414-s416, 2005.

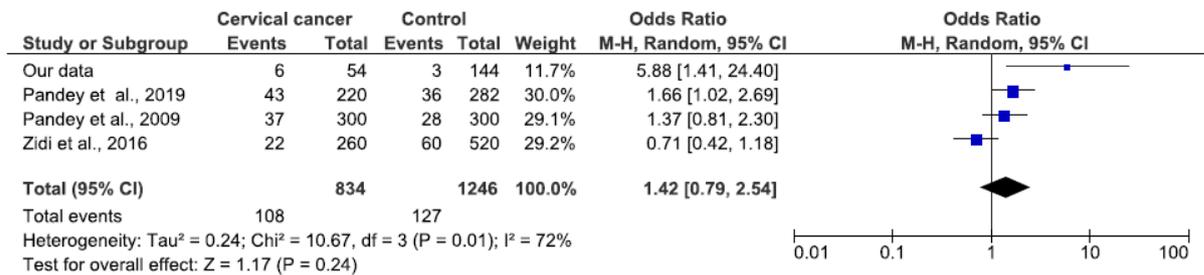
ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May; 2(5):342-50.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):690-8.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 9; 1288(2): F55-78.

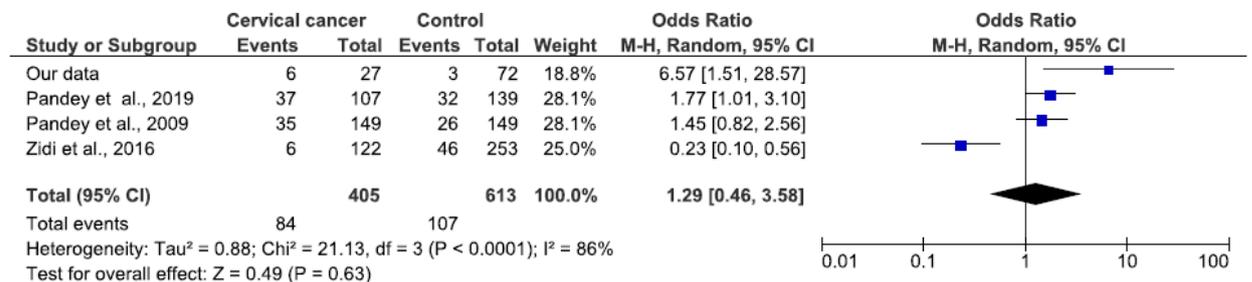
## APÊNDICE A – Gráficos de floresta e de funil da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629)

Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (G vs A).



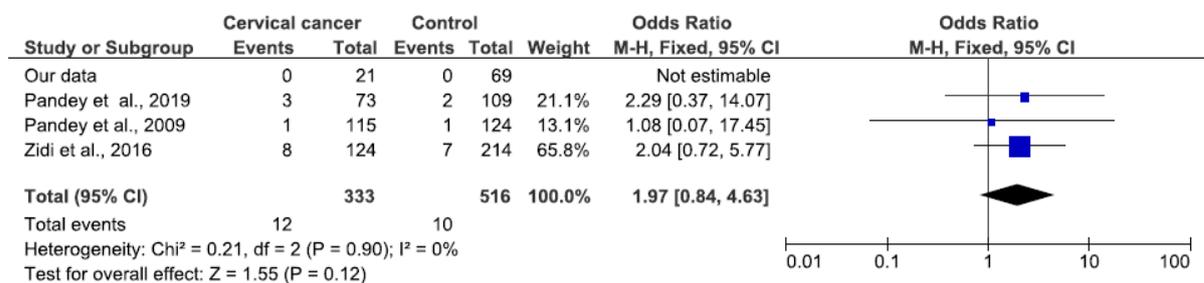
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos A/G vs A/A no modelo codominante).



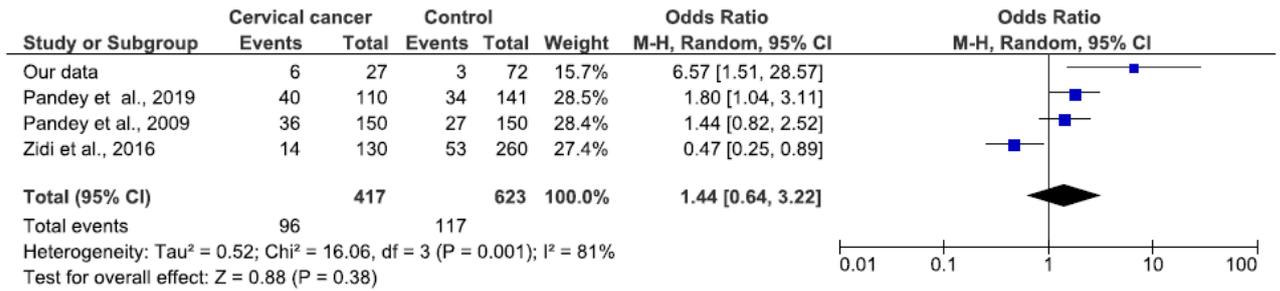
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos G/G vs A/A no modelo codominante).



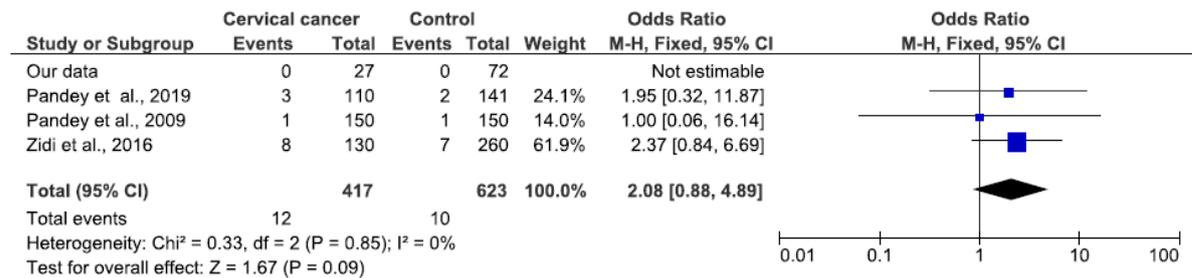
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos A/G+G/G vs A/A no modelo dominante).



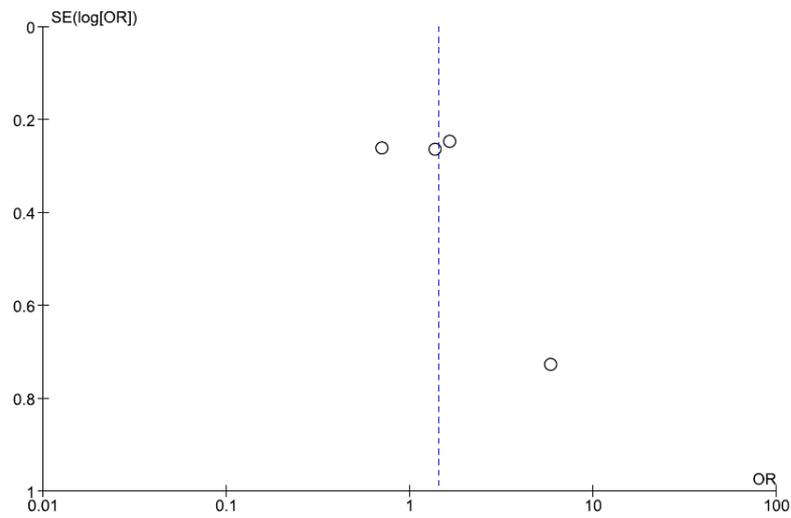
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de floresta da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos G/G vs A/A+A/G no modelo recessivo).



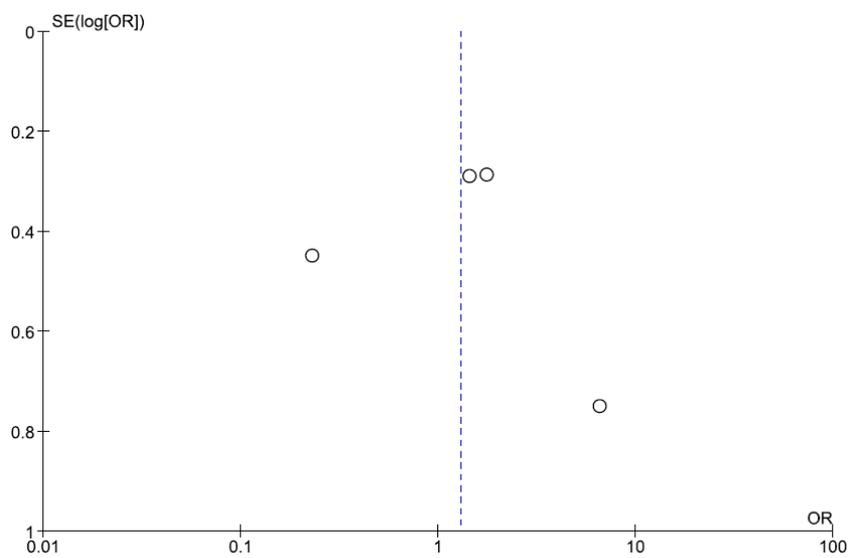
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (G vs A).



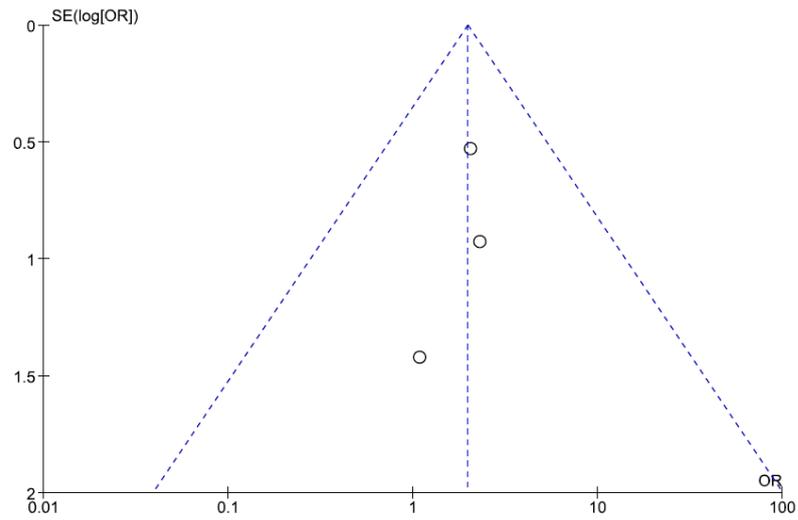
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos A/G vs A/A no modelo codominante).



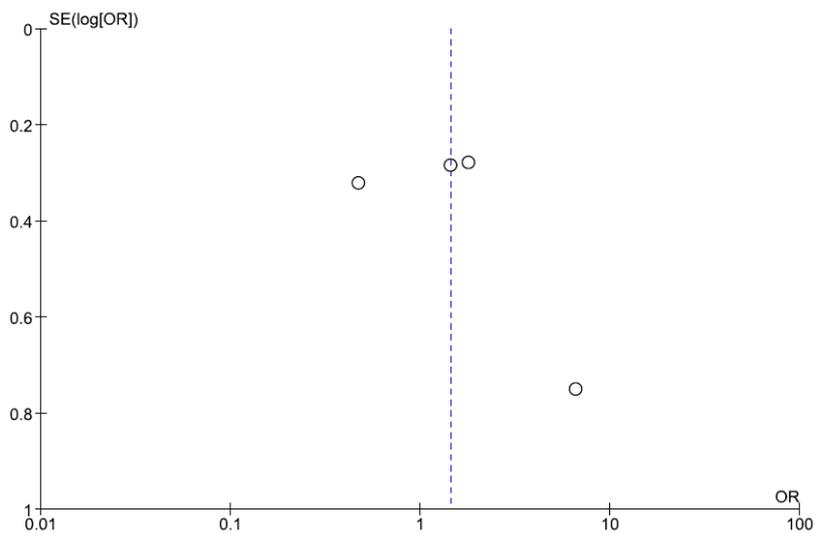
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos G/G vs A/A no modelo codominante).



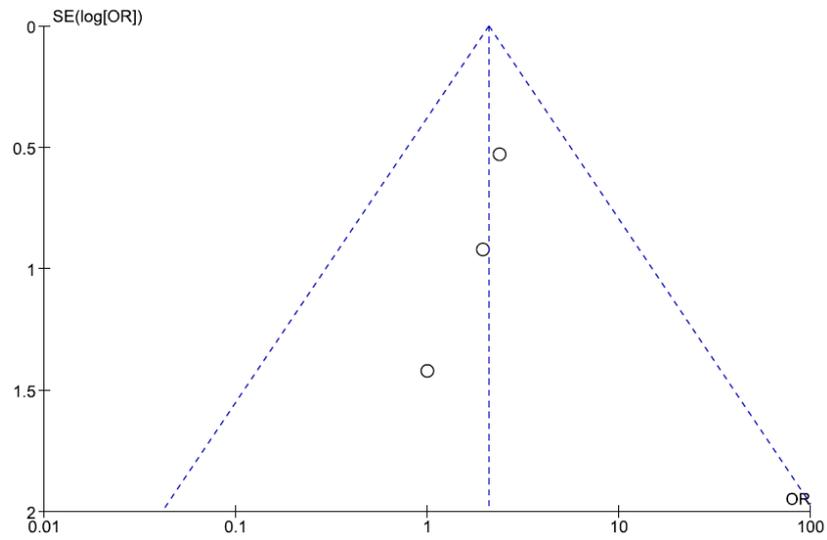
Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos A/G+G/G vs A/A no modelo dominante).



Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

Gráfico de funil da meta-análise do polimorfismo TLR4 896 A>G (rs1800629) na susceptibilidade ao câncer cervical (Genótipos G/G vs A/A+A/G no modelo recessivo).



Fonte: Autor da pesquisa, 2022.

## APÊNDICE B – Artigos publicados durante o mestrado

Immunobiology 227 (2022) 152187



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/imbio](http://www.elsevier.com/locate/imbio)



### Polymorphisms in Toll-like receptors genes changes the host's immune response and is associated with cervical cancer

Edilson Leite de Moura<sup>a,c,\*</sup>, Israel Faustino dos Santos<sup>a</sup>, Paulo Pedro de Freitas<sup>a</sup>, Denise Macedo da Silva<sup>a,c</sup>, Ana Caroline Melo dos Santos<sup>a,c</sup>, Abel Barbosa Lira Neto<sup>a</sup>, Aline Cristine Pereira e Silva<sup>a</sup>, Nirliane Ribeiro Barbosa<sup>a</sup>, Cristiane Araújo Nascimento<sup>a</sup>, Tatiane Luciano Balliano<sup>d</sup>, Carlos Alberto de Carvalho Fraga<sup>b</sup>, Karol Fireman de Farias<sup>a</sup>, Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Molecular Biology and Gene Expression (LABMEG), Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Brazil

<sup>b</sup> Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Brazil

<sup>c</sup> Post-graduation Program in Health Science, Institute of Biological Sciences and Health (ICBS), Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

<sup>d</sup> Crystallography Laboratory, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Immune response  
Toll-like receptors  
Polymorphisms  
Cytokines  
Cervical cancer

#### ABSTRACT

Polymorphisms in Toll-like receptors (*TLRs*) genes have been associated with cervical cancer, but some inconsistencies were found in the results. The present study aimed to investigate the role of polymorphisms in the *TLRs* genes in cervical cancer, through meta-analysis and bioinformatics analysis. Searches were performed in PubMed, Science Direct, Scopus and Web of science online databases until November 2020. For bioinformatics analysis, we used SNP2TFBS, Raptor-X, MUPRO, Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). The results of meta-analysis showed that the +1196T (rs4986791 *TLR4*), +7764T (rs1927911 *TLR4*), -1486C (rs187084 *TRL9*) +2848A (rs352140 *TRL9*) alleles carriers and -2604G/G (rs10759931 *TLR4*), -1237C/C (rs5743836 *TRL9*) genotypes were associated with an increased risk for cervical cancer. The bioinformatics analysis revealed that the -1237T>C (rs5743836) and -1486T>C (rs187084) polymorphisms can affect the transcription factors binding sites (RELA, NFKB1 and THAP1) in the *TLR9* gene, and the +2848G>A (rs352140) polymorphism seems to alter the structure and stability of *TLR4* protein. Additionally, using GEPIA, was observed a significantly high of IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$  expression in cervical cancer tissues compared to normal tissues. These finds indicate that polymorphisms in the *TLR4* and *TLR9* genes can affect intracellular signaling and, consequently, change the patterns of the immune response, leading to an increased risk for cervical cancer.

#### 1. Introduction

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women, with approximately 570 000 cases and 311 000 deaths registered annually around the world (World Health Organization, 2018). Human papillomavirus (HPV) infection has been identified as the main etiological agent in the development and progression of cervical neoplasms (WHO Fact Sheet, 2016). Persistent high-risk HPV infection is necessary, but not enough factor for the development of cervical cancer, because not all women with this infection developed the disease (Demir et al., 2012). Other factors besides HPV infection have been attributed to the

development of cervical cancer, including the host's immune system (Du et al., 2019; Torres-Poveda et al., 2016).

Toll-like receptors (TLRs) are pattern recognition receptors (PRR) that play a crucial role in the host's innate immune, expressed mainly by leukocytes (Akira and Takeda, 2004). In humans, there are 11 different TLRs, which are classified according to their location in the cell, such as transmembrane (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR11) that recognizes antigens in the extracellular environment, and endosomal (TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9) that recognizes antigens in the intracellular region (Cook et al., 2004; Lin et al., 2012). TLRs recognize to components of microbial cell walls/membranes or endogenous-tissue

\* Corresponding author at: Federal University of Alagoas (UFAL) – Campus Arapiraca, AL 115, Km 65, Bom Sucesso, City of Arapiraca-Alagoas, CEP:57300-970, Brazil.

E-mail address: [edilsonleite17@hotmail.com](mailto:edilsonleite17@hotmail.com) (E.L. Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152187>

Received 2 August 2021; Received in revised form 3 January 2022; Accepted 3 February 2022

Available online 7 February 2022

0171-2985/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.



## *TNF- $\alpha$* -308A>G and *IL-10*-819C>T polymorphisms as risk factors for cervical cancer: A case-control study, meta-analysis and trial sequential analysis

Edilson Leite de Moura<sup>a,d,\*</sup>, Denise Macedo da Silva<sup>a,d</sup>, Ana Caroline Melo dos Santos<sup>a,d</sup>, Adriely Ferreira da Silva<sup>a</sup>, Abel Barbosa Lira Neto<sup>a,d</sup>, Israel Faustino dos Santos<sup>a</sup>, Paulo Pedro de Freitas<sup>a</sup>, Ana Paula Fernandes Barbosa<sup>e</sup>, Aline Cristine Pereira e Silva<sup>a</sup>, Cristiane Araújo Nascimento<sup>a</sup>, Carlos Alberto de Carvalho Fraga<sup>b</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>c</sup>, Karol Fireman de Farias<sup>a</sup>, Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Molecular Biology and Gene Expression (LABMEG), Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Brazil

<sup>b</sup> Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>d</sup> Post-graduation Program in Health Science, Institute of Biological Sciences and Health (ICBS), Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

<sup>e</sup> Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Cytokine  
Polymorphism  
Cervical cancer  
Human papillomavirus

### ABSTRACT

Polymorphisms in the cytokine genes have been associated with immunological variations that lead to susceptibility to HPV infection and the development of cervical cancer. This study aims to evaluate the influence of *TNF- $\alpha$* -308G>A and *IL-10*-819C>T polymorphisms on cervical cancer susceptibility through a case-control study, meta-analysis and Trial Sequential Analysis (TSA). A case-control study including 45 cervical cancer patients and 179 healthy controls was conducted. *TNF- $\alpha$* -308G>A and *IL-10*-819C>T polymorphisms were analysed using real-time polymerase chain reaction (PCR real-time). For the meta-analysis, published articles were electronically searched through the databases PubMed, Science Direct, Scopus and Web of science. In the case-control study, the *IL-10*-819T carriers were associated with an increased risk of cervical cancer. While the *TNF- $\alpha$* -308G>A polymorphism was not associated with cervical cancer, but sample power was less than 80% (70%). The meta-analysis and TSA showed that both *TNF- $\alpha$* -308A (Overall, Asian, Caucasian and African analysis) and *IL-10*-819T (Overall and Asian analysis) carriers were associated with an increased risk of cervical cancer. In conclusion, the *IL-10*-819C>T and *TNF- $\alpha$* -308G>A polymorphisms may be an important genetic biomarker for identifying the risk of developing cervical cancer.

### 1. Introduction

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide, with approximately 570,000 cases in 2018, corresponding to 6.6% of all female cancers (World Health Organization, 2013). In Brazil, 16,370 new cases of cervical cancer were estimated for each year of the 2018–2019 biennium, with an incidence rate of 15.43 cases / 100,000 women (INCA, 2018).

Human papillomavirus (HPV) infection is the most important risk factor for cervical carcinogenesis (Bosch et al., 2002). However, only a

small proportion of HPV infected women develop cervical cancer (Barbisan et al., 2012). This suggests that other factors in combination with HPV infection may contribute to the development of cervical cancer (Kohaar et al., 2009). According to previous studies, the host's immune responses play an important role in the outcome of the disease. Several cytokines involved in modulation of host's immune response have been related for the progression of cervical lesions (Paradkar et al., 2014).

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) has an important mechanism in the control of HPV infection and tumor growth, such as the modulation of viral replication and apoptosis of malignant cell (Wajant, 2009).

\* Corresponding author at: Federal University of Alagoas (UFAL), Campus Arapiraca, AL 115, Km 65, Bom Sucesso, City of Arapiraca-Alagoas CEP:57300-970, Brazil.

E-mail address: [edilsonleite17@hotmail.com](mailto:edilsonleite17@hotmail.com) (E.L. Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.mgene.2021.100943>

Received 20 December 2020; Received in revised form 31 May 2021; Accepted 22 June 2021

Available online 25 June 2021

2214-5400/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Immunological Investigations

A Journal of Molecular and Cellular Immunology



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iimm20>

# Association of Polymorphisms in Cytokine genes with susceptibility to Precancerous Lesions and Cervical Cancer: A systematic review with meta-analysis

Edilson Leite de Moura , Ana Caroline Melo dos Santos , Denise Macedo da Silva , Bruna Brandão dos Santos , Diego de Siqueira Figueredo , Alexandre Wendell Araújo Moura , Adriely Ferreira da Silva , Ithallo Sathio Bessoni Tanabe , Eloiza Lopes de Lira Tanabe , Abel Barbosa Lira Neto , Aline Cristine Pereira e Silva , Carlos Alberto de Carvalho Fraga , José Luiz de Lima Filho , Karol Fireman de Farias & Elaine Virginia Martins de Souza

To cite this article: Edilson Leite de Moura , Ana Caroline Melo dos Santos , Denise Macedo da Silva , Bruna Brandão dos Santos , Diego de Siqueira Figueredo , Alexandre Wendell Araújo Moura , Adriely Ferreira da Silva , Ithallo Sathio Bessoni Tanabe , Eloiza Lopes de Lira Tanabe , Abel Barbosa Lira Neto , Aline Cristine Pereira e Silva , Carlos Alberto de Carvalho Fraga , José Luiz de Lima Filho , Karol Fireman de Farias & Elaine Virginia Martins de Souza (2020): Association of Polymorphisms in Cytokine genes with susceptibility to Precancerous Lesions and Cervical Cancer: A systematic review with meta-analysis, *Immunological Investigations*, DOI: [10.1080/08820139.2020.1778023](https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1778023)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1778023>



Published online: 30 Jun 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## REVIEW



## Association of Polymorphisms in Cytokine genes with susceptibility to Precancerous Lesions and Cervical Cancer: A systematic review with meta-analysis

Edilson Leite de Moura <sup>a,b</sup>, Ana Caroline Melo dos Santos <sup>a,b</sup>,  
 Denise Macedo da Silva <sup>a,b</sup>, Bruna Brandão dos Santos <sup>a,b</sup>,  
 Diego de Siqueira Figueredo <sup>a</sup>, Alexandre Wendell Araújo Moura <sup>a</sup>,  
 Adriely Ferreira da Silva <sup>a</sup>, Ithallo Sathio Bessoni Tanabe <sup>a,b</sup>,  
 Eloiza Lopes de Lira Tanabe <sup>a,b</sup>, Abel Barbosa Lira Neto <sup>a,b</sup>,  
 Aline Cristine Pereira e Silva <sup>a</sup>, Carlos Alberto de Carvalho Fraga <sup>a,c</sup>,  
 José Luiz de Lima Filho <sup>d</sup>, Karol Fireman de Farias <sup>a</sup>,  
 and Elaine Virginia Martins de Souza <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Molecular Biology and Gene Expression (LABMEG), Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Alagoas, Brazil; <sup>b</sup>Post-graduation Program in Health Science, Institute of Biological Sciences and Health (ICBS), Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>c</sup>Faculty of Medicine, Federal University of Alagoas (UFAL), Arapiraca, Alagoas, Brazil; <sup>d</sup>Laboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

**ABSTRACT**

**Objectives:** This study investigated the relationship between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes and the susceptibility to Squamous Intraepithelial Lesions (SIL), cervical cancer and HPV infection through a systematic review with meta-analysis. To verify the effect of SNPs, we also analyzed the transcription factor binding affinity using bioinformatics tools.

**Methods:** Seven electronic databases (MEDLINE, Scielo, BIREME, PubMed, Scopus, Web of Science and Science Direct) were searched for case-control studies.

**Results:** A total of 35 relevant case-control studies were meta-analyzed, including 7 cytokine genes and 15 SNPs. SNPs in *IL-17A* (rs2275913, rs3748067); *IL-17 F* (rs763780); *IL-12A* (rs568408); *IL-12B* (rs3212227); *TNFA* (rs1800629, rs361525); *IL-1B* (rs16944); *IL-6* (rs1800795); *IL-10* (rs1800896) genes were associated with increased risk for cervical cancer. No association was observed between meta-analyzed polymorphisms and SIL. Additional bioinformatics analysis suggested a possible transcriptional regulation pathway of the *TNFA* and *IL-10* genes through the MZF1 (*TNFA* -308 G > A and *IL-10* -1082A>G) and ZNF263 (*TNFA* -238 G > A) transcription factors binding.

**Conclusion:** Overall, 10 SNPs in cytokine genes were associated with increased risk for cervical cancer. Therefore, in our meta-analysis, these SNPs demonstrated to be potential biomarkers for predicting or identifying cases of high risk for SIL and cervical cancer.

**KEYWORDS**

SNP; cytokine genes; human Papillomavirus; cervical cancer

**CONTACT** Edilson Leite de Moura  [edilsonleite17@hotmail.com](mailto:edilsonleite17@hotmail.com)  Federal University of Alagoas (UFAL) – Campus Arapiraca, City of Arapiraca-Alagoas, CEP:57300-970, Brazil

 Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

## APÊNDICE C – Patente depositada durante o mestrado



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020003257-7 A2



(22) Data do Depósito: 17/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 24/08/2021

(54) **Título:** DISPOSITIVO GINECOLÓGICO COM COBERTURA A BASE DE EXTRATO DE STRYPHNODEDRON ADSTRINGENS ENRIQUECIDO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O TRATAMENTO DE LESÕES PRÉ CANCERÍGENAS DE COLO UTERINO E INFECÇÕES DO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR

(51) **Int. Cl.:** A61F 13/20; A61K 9/00; A61K 36/48; A61P 15/02.

(52) **CPC:** A61F 13/2051; A61K 9/0036; A61K 36/48; A61P 15/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.

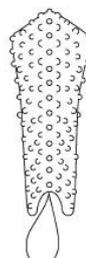
(72) **Inventor(es):** CRISTIANE ARAÚJO NASCIMENTO; KAROL FIREMAN DE FARIAS; ELAINE VIRGINIA MARTINS DE SOUZA FIGUEIREDO; GUILHERME BENJAMIN BRANDÃO PITTA; DENISE MACEDO DA SILVA; VALDEMIR DA CONCEIÇÃO; NIRLIANE RIBEIRO BARBOSA; ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS; TATIANE LUCIANO BALLIANO; JOÃO INÁCIO SOLETTI; SANNYELE ALCÂNTARA EMILIANO; SILVIA BEATRIZ BEGER UCHÔA; GABRIELA DA COSTA CARVALHO; MILENA ALVES DOS SANTOS; JOSEALDO TONHOLO; NATANAEL DE SOUZA; MANOEL ALVARO DE FREITAS LINS NETO.

(57) **Resumo:** DISPOSITIVO GINECOLÓGICO COM COBERTURA A BASE DE EXTRATO DE STRYPHNODEDRON ADSTRINGENS ENRIQUECIDO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O TRATAMENTO DE LESÕES PRÉ CANCERÍGENAS DE COLO UTERINO E INFECÇÕES DO TRATO GENITAL FEMININO INFERIOR. A presente patente refere-se a um dispositivo com cobertura ginecológica de uso interno à base de extrato alcoólico de Stryphnodendron adstringens enriquecido com a tecnologia da adição das nanopartículas de prata. Invento este, que tem como solução técnica um tratamento ginecológico, eficaz, seguro e de baixo custo, útil na terapêutica de lesões pré cancerígenas do colo uterino e canal vaginal, e infecções vaginais em geral, preferencialmente por HPV. Consequentemente a introdução desse invento como forma de tratamento irá reduzir o risco de infecção do sistema geniturinário e a evolução de lesões pré cancerígenas para o câncer, tornando-se uma solução inovadora e comercial na área de tecnologias da saúde e acessível a todas as mulheres.

FIGURA 1.1



FIGURA 1.2



## ANEXO A – PARECER SUBSTÂNCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS COM HPV EM AMOSTRAS CERVICAIS NAS PACIENTES ATENDIDAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE DO AGRESTE ALAGOANO.

**Pesquisador:** KAROL FIREMAN DE FARIAS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 31460/14.8.0003.0013

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Alagoas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 738.340

**Data da Relatoria:** 24/07/2014

#### Apresentação do Projeto:

Serão analisadas amostras de pacientes, mulheres, atendidas no SUS do agreste alagoano que forem realizar o exame Papanicolaou. As pacientes que irão participar do estudo serão aquelas encaminhadas e que forem espontaneamente para a realização do exame Papanicolaou e que consentirem participar da pesquisa após a assinatura do termo de consentimento e livre esclarecimento. O material biológico a ser coletado serão amostra de secreção vaginal e de sangue periférico, para tipagem HPV e sequenciamento genético, diagnóstico molecular em plataforma diagnóstica e PCR, atividade e expressão de enzima e proteína. A amostra coletada será encaminhada para o Laboratório de biologia molecular expressão gênica (LABMEG) no Campus Arapiraca – UFAL, onde serão realizados os procedimentos necessários para análise dos polimorfismos genéticos das pacientes, tipagem viral e onde ficarão armazenados as enzimas, proteínas e os DNAs extraídos.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

- Analisar polimorfismos em genes relacionados com HPV em amostras cervicais nas pacientes atendidas no Sistema Único de Saúde do Agreste Alagoano.

**Objetivo Secundário:**

**Endereço:** Campus A - D. Síndesi Costa Universidade

**Bairro:** Tabuleiro das Matias

**CEP:** 57.073-000

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1001

**Fax:** (82)3214-1708

**E-mail:** comitedeetica@ufal.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 739.340

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

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

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

**Benefícios:**

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

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



Continuação do Parecer: 739.340

466/12.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

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

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MACEIO, 05 de Agosto de 2014

---

**Assinado por:**  
**Deise Juliana Francisco**  
**(Coordenador)**

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

## **ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

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

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

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

A) Sua contribuição consiste na doação de sangue e/ou SWAB bucal (utilizando a escovinha com uma leve pressão na mucosa da boca), células epiteliais e/ou biopsia para diagnósticos laboratoriais a partir de amostras da região perineal, vulva, vagina e/ou colo do útero. A coleta de sangue não faz parte do procedimento padrão de exames ginecológicos implementados pelo Ministério da Saúde, sendo este um desconforto adicional. O estudo consistirá ainda em

entrevista semi-estruturada e acesso ao seu prontuário, arquivado na unidade de saúde em que ele esteja arquivado, município de Arapiraca - AL.

B) Neste projeto, sua identidade será totalmente preservada. Fica claro que você como participante não terá ganho ou perda financeira relacionada com a participação no projeto, e a qualquer momento pode desistir de colaborar da pesquisa.

C) Com a participação no projeto às informações geradas pelo diagnóstico serão informadas através da equipe do posto de saúde em que você foi atendida, e no caso de necessidade de tratamento será dado o encaminhamento devido.

C) Assim como num exame ginecológico periódico, existe apenas um desconforto no momento da observação do colo do útero, de onde será feita uma coleta. Os riscos relacionados à coleta de sangue, que não faz parte do exame ginecológico periódico, são: leve desconforto no momento da coleta, e possibilidade de surgimento de um pequeno trauma no local da coleta que desaparecerá após 24 ou 48 horas. Os riscos à minha saúde física e mental são mínimos. Eu terei como benefício ser informado (a) do resultado da minha contribuição e da pesquisa em geral.

D) As informações obtidas desta pesquisa serão publicadas em congressos, jornais e revistas científicas, bem como, veiculadas em meios de acesso do público em geral, sempre respeitando o sigilo dos participantes da pesquisa. Os produtos e serviços obtidos a partir desta pesquisa serão disponibilizados a toda a população, principalmente aos colaboradores do referido projeto.

E) O estudo se destina as mulheres atendidas nas unidades de saúde pública do município de Arapiraca - AL. Esse estudo começará em Maio 2014 e terminará em Maio de 2016.

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

Que, sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. Que as informações conseguidas através da minha participação no estudo não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto pelos responsáveis, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. **Que não haverá ressarcimento de despesas, caso eu apresente algum custo na realização desta pesquisa e de que eu não serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.**

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

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

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

Eu, \_\_\_\_\_

(nome da paciente)

portadora do RG \_\_\_\_\_, residente \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ fone: \_\_\_\_\_

aceito participar desta pesquisa.

**Nome da mãe:** \_\_\_\_\_.

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

Domicílio: \_\_\_\_\_ (rua, \_\_\_\_\_ praça, \_\_\_\_\_ conjunto)

\_\_\_\_\_ Bloco,nº \_\_\_\_\_

Complemento: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

CEP/cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Ponto de Referência: \_\_\_\_\_

**Endereço da responsável pela pesquisa:**

Sr.(a): Karol Fireman de Farias

Endereço: Rua São Cristovão, nº 302.

Bairro: Primavera, Cidade: Arapiraca-AL CEP: 57304-400

FONE: (82) 9620-6444 / 8174-8192

E-mail: karolfireman@hotmail.com

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

**Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:**

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

Arapiraca, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura da paciente**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do pesquisador**

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha 1

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha 2

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

## ANEXO C – Protocolo do kit comercial para extração de DNA



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

#### Materials to Be Supplied by the User

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

#### 1. Tissue Culture Cells

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

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

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

#### 2. Animal Tissue (Mouse Liver and Brain)

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

## ANEXO D – PROTOCOLO STREGA PARA ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA

TABLE 1. STREGA reporting recommendations, extended from STROBE Statement

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
<b>Title and Abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract.	
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found.	
<b>Introduction</b>			
<i>Background rationale</i>	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported.	
<i>Objectives</i>	3	State specific objectives, including any pre-specified hypotheses.	<b>State if the study is the first report of a genetic association, a replication effort, or both.</b>
<b>Methods</b>			
<i>Study design</i>	4	Present key elements of study design early in the paper.	
<i>Setting</i>	5	Describe the setting, locations and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection.	

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
<i>Participants</i>	6	(a) <b>Cohort study</b> – Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up.  <b>Case-control study</b> – Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls.  <b>Cross-sectional study</b> – Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants.	<b>Give information on the criteria and methods for selection of subsets of participants from a larger study, when relevant.</b>
		(b) <b>Cohort study</b> – For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed.  <b>Case-control study</b> – For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case.	
<i>Variables</i>	7	(a) Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable.	<b>(b) Clearly define genetic exposures (genetic variants) using a widely-used nomenclature system. Identify variables likely to be associated with population stratification (confounding by ethnic origin).</b>

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
Data sources measurement	8*	(a) For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group.	(b) Describe laboratory methods, including source and storage of DNA, genotyping methods and platforms (including the allele calling algorithm used, and its version), error rates and call rates. State the laboratory/centre where genotyping was done. Describe comparability of laboratory methods if there is more than one group. Specify whether genotypes were assigned using all of the data from the study simultaneously or in smaller batches.
Bias	9	(a) Describe any efforts to address potential sources of bias.	(b) For quantitative outcome variables, specify if any investigation of potential bias resulting from pharmacotherapy was undertaken. If relevant, describe the nature and magnitude of the potential bias, and explain what approach was used to deal

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
			with this.
Study size	10	Explain how the study size was arrived at.	
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen, and why.	If applicable, describe how effects of treatment were dealt with.
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding.  (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions.  (c) Explain how missing data were addressed.  (d) <b>Cohort study</b> – If applicable, explain how loss to follow-up was addressed.  <b>Case-control study</b> – If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed.  <b>Cross-sectional study</b> – If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy.	State software version used and options (or settings) chosen.

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
		(e) Describe any sensitivity analyses.	
			<i>(f) State whether Hardy-Weinberg equilibrium was considered and, if so, how.</i>
			<i>(g) Describe any methods used for inferring genotypes or haplotypes.</i>
			<i>(h) Describe any methods used to assess or address population stratification.</i>
			<i>(i) Describe any methods used to address multiple comparisons or to control risk of false positive findings.</i>
			<i>(j) Describe any methods used to address and correct for relatedness among subjects</i>
<b>Results</b>			

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
<i>Participants</i>	13*	(a) Report the numbers of individuals at each stage of the study – e.g., numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed.	<i>Report numbers of individuals in whom genotyping was attempted and numbers of individuals in whom genotyping was successful.</i>
		(b) Give reasons for non-participation at each stage.	
		(c) Consider use of a flow diagram.	
<i>Descriptive data</i>	14*	(a) Give characteristics of study participants (e.g., demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders.	<i>Consider giving information by genotype.</i>
		(b) Indicate the number of participants with missing data for each variable of interest.	
		(c) <b>Cohort study</b> – Summarize follow-up time, e.g. average and total amount.	

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
<i>Outcome data</i>	15 *	<b>Cohort study</b> -Report numbers of outcome events or summary measures over time.	<i>Report outcomes (phenotypes) for each genotype category over time</i>
		<b>Case-control study</b> – Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure.	<i>Report numbers in each genotype category</i>
		<b>Cross-sectional study</b> – Report numbers of outcome events or summary measures.	<i>Report outcomes (phenotypes) for each genotype category</i>
<i>Main results</i>	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (e.g., 95% confidence intervals). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included.	
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized.	
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period.	
			<i>(d) Report results of any adjustments for multiple</i>

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
			<i>comparisons.</i>
<i>Other analyses</i>	17	(a) Report other analyses done – e.g., analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses.	
			<i>(b) If numerous genetic exposures (genetic variants) were examined, summarize results from all analyses undertaken.</i>
			<i>(c) If detailed results are available elsewhere, state how they can be accessed.</i>
<b>Discussion</b>			
<i>Key results</i>	18	Summarize key results with reference to study objectives.	
<i>Limitations</i>	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias.	

Item	Item number	STROBE Guideline	Extension for Genetic Association Studies (STREGA)
<i>Interpretation</i>	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence.	
<i>Generalizability</i>	21	Discuss the generalizability (external validity) of the study results.	
<b>Other Information</b>			
<i>Funding</i>	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based.	

STREGA = STrengthening the REporting of Genetic Association studies; STROBE = STrengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology.

\* Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.