



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**IOLANDA MATIAS GOMES**

**EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1 E 5 NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E NA  
RESISTÊNCIA A QUIMIO E RADIOTERAPIA.**

**RECIFE**

**2021**

IOLANDA MATIAS GOMES

**EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1 E 5 NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E NA  
RESISTÊNCIA A QUIMIO E RADIOTERAPIA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

**Área de concentração:** Biologia Aplicada à Saúde

**Orientadora:** Dra. Danyelly Bruneska Gondim  
Martins

**RECIFE**

**2021**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Gomes, Iolanda Matias

Expressão das Sirtuinas 1 e 5 no câncer do colo de útero e na resistência a quimio e a radioterapia / Iolanda Matias Gomes. - 2021.

108 f. : il.

Orientadora: Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. I. Colo uterino – Câncer. II. Câncer – Quimioterapia. 3. Câncer – Radioterapia. I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (orientadora). II. Título.

616.99466

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-055-2022

IOLANDA MATIAS GOMES

**EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1 E 5 NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E NA  
RESISTÊNCIA A QUIMIO E RADIOTERAPIA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 29/10/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Examinador Interno)

Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Fabricio Souto Oliveira (Examinador Interno)

Centro Acadêmico do Agreste / Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia (Examinadora Externa)

Departamento de Biologia / Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. José Luiz Figueiredo (Examinador Externo)

IMIP / Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por se fazer vivo no amor em minha vida.

Em memória de meus pais Antônio Gomes e Josefa Matias Gomes por terem me educado na retidão e fé. E às minhas irmãs Ieda Gomes da Silva e Iara Matias Gomes de Andrade e irmão Ivaldo Matias Gomes, que reafirmam seu legado em suas vidas.

Agradeço a meu companheiro Lia Fook Shiam, e a Caio Matias Lia Fook e Helena Matias Lia Fook, marido e filhos, pelo zelo e amor demonstrados a mim todos os dias.

À minha orientadora Danyelly Bruneska Gondin Martins que aceitou o desafio de apresentar o mundo molecular a uma médica, inspirando o encantamento, e cumpriu com maestria esse desafio.

Aos colegas do Hospital das Clínicas, que dividem comigo a difícil missão de cuidar do paciente oncológico.

Aos meus colegas da pós-graduação do LIKA, em especial Joana Darc Rozendo dos Santos, por dividir comigo tantas angústias e incertezas, e pela parceria. E a Ananda Cristina Fernandes de Aguiar, pela contribuição essencial na reta final.

Aos funcionários do LIKA, em especial Fábio Costa, secretário da Pós-graduação, pela cordialidade e presteza.

Aos professores da Banca, pela disponibilidade e por dividirem comigo seu conhecimento.

Por fim, registro meus agradecimentos às pacientes atendidas no Ambulatório de Ginecologia Oncológica do HC/UFPE, que renovam sua confiança todos os dias em meus cuidados, e me inspiram a melhorar sempre.

Não adianta procurar a verdade nas coisas ou  
nas pessoas, a verdade está na natureza delas

## RESUMO

O câncer do Colo do Útero é o quarto tipo em incidência nas mulheres em todo mundo, sendo responsável por mais de 700.000 casos ao ano. Desses, cerca de metade resultaram em morte, sobretudo das mulheres que vivem em regiões com baixos índices de desenvolvimento humano. A incidência da doença piorou no cenário da Pandemia do COVID-19, a Organização Mundial da Saúde então, em novembro de 2020, passa a considerar esse tumor como um problema de saúde pública mundial, e lança estratégias para sua eliminação nas populações alvos até 2030. Neste enfrentamento, reduzir mortes de quem já está com a doença é um desafio urgente. Uma das causas dessas mortes é a falha do tratamento, notadamente a existência de tumores radorresistentes. Diferentes moléculas podem estar envolvidas nesta resistência, sendo algumas delas parte da regulação epigenética da célula. As sirtuínas são uma família de enzimas que atuam em diversos processos celulares, como ocorre na apoptose. Sua participação na tumorigênese chama atenção por serem apontadas como alvos moleculares terapêuticos. Este trabalho teve por objetivo estudar a radorresistência através das alterações moleculares, com foco no papel das SIRT1 e SIRT5 neste processo. Amostras de tecido tumoral, obtidas de pacientes tratadas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, de 2018 e 2019, foram coletadas e avaliadas antes de serem submetidas à radioterapia associada à quimioterapia como tratamento exclusivo. Durante esse tempo foi observado e registrado os casos cujo tratamento foi ineficaz, a presença de fatores de mau prognóstico conhecidos e a expressão das sirtuínas nas amostras tumorais. Os achados reforçam o potencial das SIRT1 e SIRT5 como marcador de prognóstico, em especial da SIRT1.

**Palavras-chave:** Câncer do Colo do Útero; Radioterapia; Sirtuínas; Quimioradioresistencia; Fatores de prognóstico

## ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth type in women worldwide, accounting for more than 700,000 cases per year. Of these, about half will die from the disease, especially women who live in regions with low development rates. After the aggravation of this situation in the COVID-19 Pandemic scenario, the World Health Organization, in November 2020, began to consider this tumor as a global public health problem and launched strategies for its elimination in these populations by 2030. Coping with reducing deaths for those who already have the disease is an urgent challenge. One of the causes of these deaths is treatment failure, notably the existence of radioresistant tumors. Different molecules may be involved in this resistance, some of which are part of the epigenetic regulation of the cell. Sirtuins are a family of enzymes that act in various cellular processes, such as apoptosis. Their participation in tumorigenesis draws attention as they are identified as a potential therapeutic molecular target. This work aimed to study radioresistance through molecular alterations, focusing on the role of SIRT1 and SIRT5 in this process. It was collected and evaluated before undergoing radiotherapy associated with chemotherapy as the only treatment. During this time, the cases whose treatment was ineffective, the presence of known poor prognostic factors, and sirtuins' expression in the tumor samples were observed and recorded. The findings reinforce the potential of SIRT1 and SIRT5 as a prognostic marker, especially SIRT1.

**Keywords:** Cervical Cancer; Radiotherapy; Sirtuins; Chemoradioresistance; Prognostic factors

## LISTA DE FIGURAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -  | Incidência de Câncer de Colo do Útero (Câncer Cervical) no mundo.....                                                                                                                                                                                                | 18 |
| Figura 2 -  | Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*.....                                                                                                                                            | 18 |
| Figura 3 -  | Agentes causadores de câncer genital feminino e seu grau de evidência. Fonte: IARC Monographs.iarc.org. ....                                                                                                                                                         | 20 |
| Figura 4 -  | Curso da infecção do HPV na mulher, conforme a faixa etária. Adaptado de Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer in WHO.org .....                                                                                                                             | 20 |
| Figura 5 -  | Formação do aparelho genital feminino. Fonte: Adaptado de LARSEN'S HUMAN EMBRYOLOGY, 5TH EDITION, Figura 16-19, página 639.....                                                                                                                                      | 23 |
| Figura 6 -  | Posição de JEC conforme a fase reprodutiva da mulher. Fonte: Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer. - IARC 2017. ....                                                                                                                                       | 24 |
| Figura 7 -  | Colo normal, padrão, com JEC no OCE. Seu canal endocervical está dilatado e demonstra a passagem de muco característico do período ovulatório. Fonte: Adaptado do Manual de PTGI e Colposcopia, Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2010, pág 15..... | 25 |
| Figura 8 -  | Epitélios de revestimento do Colo do Útero. Fonte: Adaptado de Cervical Cancer Treatment - Patient Version in National Cancer Institute-NCI, <a href="http://cancer.org">http.cancer.org</a> .....                                                                   | 26 |
| Figura 9 -  | Colo do útero normal, e com lesão HPV induzida, Lesão pré-invasiva e Invasora. Um correspondente evolutivo Colposcópico, Citológico e Histológico. Fonte: Adaptado do Histology and Cytopathology of the Uterine Cervix. Digital Atlas IARC Lyon FR, 2004. ....      | 27 |
| Figura 10 - | Magnitude da Infecção viral como uma das maiores causas de câncer na atualidade, em ambos os sexos, por Continentes. Em vermelho, os tumores causados pelo HPV. Fonte: Globocan - Cancer attributable to Infections, 2021.....                                       | 29 |
| Figura 11 - | Propagação habitual do Câncer do Colo do Útero, por contiguidade. Imagens obtidas do Site da FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia ....                                                                                                        | 38 |
| Figura 12 - | Família das Sirtuínas. Marcadas com pontos marrons as Sirtuínas encontradas nos humanos. As sirtuínas e sua localização nas células. Adaptado de Zhao,2019 .....                                                                                                     | 43 |

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - | Prognósticos baseados na sobrevida por registro de câncer de colo do útero (2009-2015). Fonte: American Cancer Society - Cervical Cancer - 5-year relative survival rates for cervical cancer - American Cancer Society - <a href="http://www.cancer.org">www.cancer.org</a> . Acesso em: 06 Jan. .... | 31 |
| Tabela 2 - | Os quatro estádios do Câncer do Colo de Útero e seus subgrupos, utilizados como referências de tratamentos, e manejo de prognóstico, além de uniformizar observação temporal. FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia. Revisado em 2018. ....                                      | 36 |
| Tabela 3 - | Evolução temporal do papel das Sirtuínas na carcinogênese do câncer do Colo do Útero. Principais autores, achados e técnicas utilizados. ....                                                                                                                                                          | 47 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|          |                                                                                                                            |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPV      | Human papillomavirus                                                                                                       |
| CCU      | Câncer do Colo do Útero                                                                                                    |
| Pap Test | Teste de Papanicolaou ou citologia oncótica cérvico vaginal, teste de triagem populacional de câncer do colo do Útero      |
| IDH      | Índice de Desenvolvimento Humano                                                                                           |
| INCA     | Instituto Nacional de Combate ao Câncer                                                                                    |
| COVID    | Coronavirus Disease                                                                                                        |
| SIRT1    | Sirtuína 1                                                                                                                 |
| SIRT5    | Sirtuína 5                                                                                                                 |
| OMS      | Organização Mundial de Saúde                                                                                               |
| Gy       | <i>Grey</i> refere-se a unidade padrão de Radiação, é a quantidade de energia radionizante absorvida por unidade de massa. |
| cGy      | <i>Centigrey</i> refere-se a um centésimo da unidade padrão de Radioterapia.                                               |
| DNA      | Deoxyribonucleic Acid                                                                                                      |
| IARC     | International Agency for Research on Cancer                                                                                |
| JEC      | Junção Escamo-celular                                                                                                      |
| HAM      | Hormonio Anti-Mülleriano                                                                                                   |
| NIC      | Neoplasia Intra-cervical                                                                                                   |
| OCE      | Orifício Cervical Externo                                                                                                  |
| ILV      | Invasão Linfo-vascular                                                                                                     |
| NAD      | Nicotinamide Adenina Dinucleotídeo                                                                                         |

|          |                                                                                                                                                 |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| P53      | Gene P53. Proteína fabricada pela própria célula com função primordial na apoptose, chamada de “guardião do Genoma”, tem peso molecular 53 kDa. |
| WHO      | World Health Organization                                                                                                                       |
| E7       | Oncoproteína do HPV envolvida na desregulação do P53                                                                                            |
| E6       | Oncoproteína do HPV envolvida na desregulação do P53                                                                                            |
| SiHa     | Cultura de células de câncer Escamoso cervical de humana comercializada pela ATCC®                                                              |
| HeLa     | Henrietta Lacks cells derivadas de Adenocarcinoma cervical comercializada pela ATCC®                                                            |
| Ras      | RAt Sarcoma vírus, família de genes que codificam proteínas que podem causar câncer. Os mais conhecidos são o HRAS e o KRAS                     |
| miR1385p | Micro RNA envolvido na resposta ao dano tecidual e codificação do reparo                                                                        |
| FIGO     | Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia                                                                                            |
| RNA      | Ribonucleic acid                                                                                                                                |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                             |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                           | <b>14</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS                                                                                   | 16        |
| 1.1.1    | Geral                                                                                       | 16        |
| 1.1.2    | Específicos                                                                                 | 16        |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b>                                                                        | <b>17</b> |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                | <b>18</b> |
| 3.1      | Epidemiologia do Câncer de Colo do Útero                                                    | 18        |
| 3.2      | Câncer de Colo de Útero                                                                     | 19        |
| 3.2.1    | Papiloma Vírus Humano (HPV)                                                                 | 19        |
| 3.2.2    | Colo Do Útero – Origens, Relações Anatômicas E Histologia                                   | 21        |
| 3.3      | Fatores de Risco Conhecidos no Câncer do Colo Do Útero                                      | 26        |
| 3.4      | Desenvolvimento de Displasias e CCU                                                         | 28        |
| 3.5      | Tipos Histológicos                                                                          | 30        |
| 3.6      | Estadiamento Do Câncer Do Colo Do Útero                                                     | 30        |
| 3.7      | Tratamento do Câncer do Colo do Útero                                                       | 37        |
| 3.8      | Seguimento Pós-Tratamento.                                                                  | 39        |
| 3.9      | Prognóstico                                                                                 | 40        |
| 3.10     | Falhas no Tratamento                                                                        | 41        |
| 3.11     | Epigenética no Câncer do Colo Do Útero                                                      | 42        |
| 3.11.1   | As Sirtuínas                                                                                | 42        |
| 3.11.2   | Sirtuinas no CCU                                                                            | 44        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                                                          | <b>50</b> |
| 4.1      | População de Estudo                                                                         | 50        |
| 4.2      | Coleta de Amostras                                                                          | 50        |
| 4.3      | Tratamento da amostra                                                                       | 50        |
| 4.4      | Análise de expressão gênica                                                                 | 51        |
| 4.5      | Análise estatística                                                                         | 52        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>                                                                           | <b>53</b> |
| 5.1      | ARTIGO 1 - SIRT1 and SIRT5 can be involved in chemoradiotherapy response in cervical cancer | 53        |

|     |                                                                                                                   |            |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2 | ARTIGO 2 - Epigenetics and Oxidative Stress Pathways as Modulators to Treatment Response in Cervical Cancer ----- | 67         |
| 6   | <b>CONCLUSÕES -----</b>                                                                                           | <b>93</b>  |
|     | <b>REFERÊNCIAS -----</b>                                                                                          | <b>94</b>  |
|     | <b>APÊNDICE A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP -----</b>                                                          | <b>100</b> |
|     | <b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO --</b>                                                   | <b>101</b> |
|     | <b>APÊNDICE C - FICHA DE COLETA DE DADOS -----</b>                                                                | <b>106</b> |
|     | <b>APÊNDICE D - RELAÇÃO DOS MAIS DIVERSOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE TUMORES QUE OCORREM NO COLO DO ÚTERO -----</b>    | <b>107</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O Câncer do Colo do Útero (CCU) é um dos cânceres com maior letalidade atualmente, sendo a quarta causa de câncer na mulher em todo mundo (BRAY F, 2018) e é a terceira causa de morte por câncer em mulheres de países com baixos índices de desenvolvimento humano, onde se concentram cerca de 85-90% de todos os casos deste câncer (ARBYN et al., 2020). Pode-se dizer assim, que o CCU tem uma relação epidemiológica com pobreza e a falta de acesso a recursos de diagnóstico precoce e tratamento. A subnotificação dos casos pode ser uma dificuldade adicional no conhecimento dessa estimativa, dada as limitações econômicas desses países.

Este tumor, também chamado de câncer cervical, é causado pela infecção persistente do Papilomavírus Humano - HPV, especificamente os HPVs de alto risco, ou HPVs oncogênicos. A infecção genital por esse vírus é muito frequente e na maioria das vezes não causa doença. Em alguns casos, ocorrem alterações celulares que podem evoluir para o câncer. Essas alterações são descobertas facilmente no exame preventivo, um teste realizado a partir do esfregaço de células celulares e corado pela técnica de Papanicolaou ou Pap test (MORENO-ACOSTA et al., 2017). As lesões causadas pelo HPV são curáveis na quase totalidade dos casos (INCA, 2020).

Com a Pandemia de COVID19 que assolou o mundo a partir de 2019, houve impacto em toda cadeia de prevenção e tratamento dos cânceres, excepcionalmente no câncer do colo do útero, de forma que em novembro de 2020, a Organização Mundial de Saúde passou a considerar o combate ao CCU como emergência de saúde pública no mundo, considerando que a estimativa de novos casos para 2020 passou de 511.000 para cerca de 700.000 novos casos, e de 311.000 mortes para cerca de 500.000 (WHO, 2020)

O CCU é preocupação de saúde pública no mundo e tem uma distribuição geopolítica bem definida, atingindo mulheres de países com muito baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). A mortalidade no CCU é duas vezes maior na mulher negra, mesmo em países desenvolvidos (BENARD *et al.*, 2017), seja por fatores genéticos ou por habitar em países pobres como os da África Setentrional (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

Trata-se de doença curável quando diagnosticada nos seus estádios iniciais, mas cerca de 1/3 das mulheres com CCU morrerão da doença, seja porque não acessaram o tratamento ou por apresentarem tumor resistentes a radioterapia ou quimioterapia, principais modalidades de tratamento da doença invasiva (FOWLER, 2021).

A biologia molecular tem empreendido esforços no sentido de selecionar pacientes com tumores potencialmente resistentes ao tratamento. Proteínas envolvidas no processo da resistência ao tratamento poderiam determinar previamente, e assim oferecermos alternativas de tratamento a essas mulheres. Neste cenário, as Sirtuínas aparecem como potenciais marcadores patogênicos, de prognóstico, de progressão, de radiorresistência. Seu papel não está claro na carcinogênese.

A SIRT1 é um membro da família de histona desacetilases de classe III (HDACs). Ela está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, tais como metabolismo, neurogênese e sobrevivência celular, já vem sendo associada a diversos tipos de câncer (CHEN; YUAN; SU, 2013).

Outra sirtuina observada na resistência à quimioterapia em tumores ginecológicos é a SIRT5. No hepatocarcinoma por exemplo, é envolvida na proliferação celular e invasão, fazendo dela um potencial alvo terapêutico (SUN et al., 2019; CHANG et al., 2017).

Considerando os conceitos e informações acima expostos, o presente trabalho tem o objetivo de analisar a expressão dos genes *SIRT1* e *SIRT5* em lesões cervicais e câncer de colo de útero, além de observar se existe alguma alteração molecular em pacientes resistentes ao tratamento e a correlação da expressão desses genes com os dados clínicos das pacientes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

Investigar a expressão dos genes SIRT1 e SIRT5 em lesões cervicais e câncer de colo de útero, determinando possíveis alterações moleculares associadas a resistência ao tratamento e correlacionar com variáveis epidemiológicas e anatomopatológicas.

### 1.1.2 Específicos

- Analisar a expressão das Sirtuínas 1 e 5 em amostras teciduais de tumores de pacientes com câncer de colo de útero e nos tecidos de pacientes com lesões cervicais (precursoras).
- Correlacionar a expressão destes genes com os diferentes tipos de lesão cervical e câncer e suas características clínicas.
- Determinar a relação entre a expressão destes genes nos tecidos de das amostras teciduais.
- Determinar a expressão destes genes nos tecidos neoplásicos.
- Observar a expressão das Sirtuínas nos tumores radiorresistentes.

## 2 JUSTIFICATIVA

Com a especial atenção da Organização Mundial da Saúde (OMS) ao CCU como problema de saúde pública no mundo, foram elaboradas metas que objetivando o aumento da cobertura vacinal, ampliação do rastreamento de lesões pré-malignas, e tratamento de lesões pré-invasivas e invasivas (BRAY *et al.*, 2018).

Com o aumento dessa cobertura vacinal contra o HPV, estimado para 2030, o impacto na mortalidade é de apenas 0,1%. Ampliando o rastreamento e o tratamento das lesões pré-invasivas e invasivas, essa redução chegaria a  $34 \pm 2\%$ .

De acordo com a OMS há, atualmente, cerca de 500.0000 mulheres com CCU, sendo que mais de metade delas irão a óbito pela doença. Parte dessas mortes se deve a resistência adquirida pelo tumor ao tratamento. Estudar a expressão de genes envolvidos na radiorresistencia no câncer do colo uterino se torna caminho necessário nesse conhecimento.

A clientela atendida no Hospital das Clínicas/UFPE, localizado numa região brasileira onde há uma incidência das mais altas do país e do mundo do CCU, pode contribuir com a melhoria no manejo dessa doença.

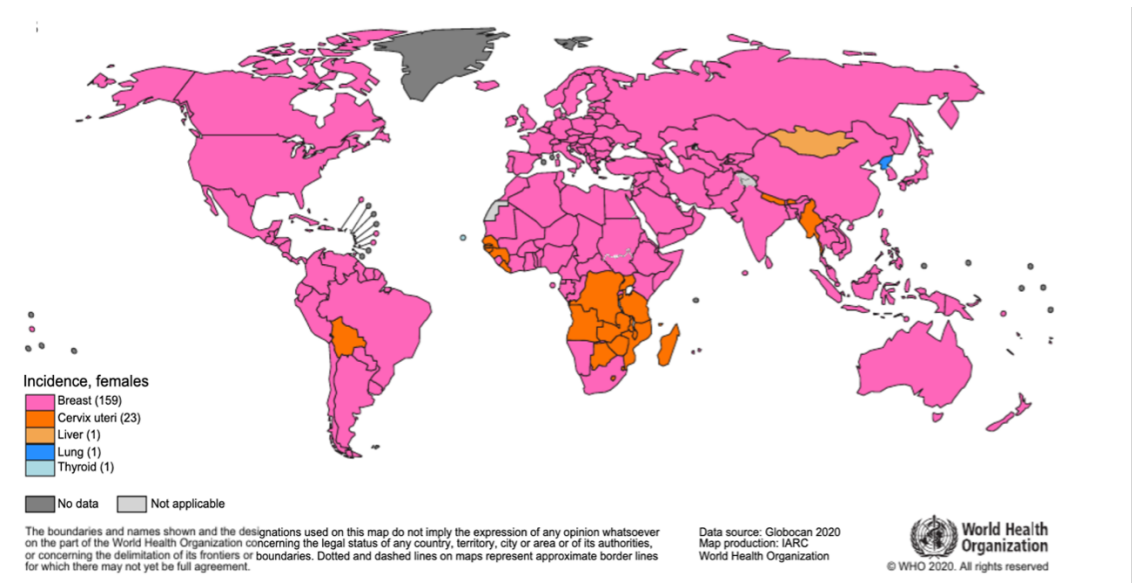
Não há pesquisas dessa natureza voltadas para essa população. Sabemos que as diferenças raciais, portanto, genéticas, implicam em comportamentos diferentes de mesmo tipo histológico. A população do Nordeste brasileiro apresenta uma heterogeneidade fenotípica, que traz características do índio nativo das Américas, do negro, e do europeu.

Observamos que a individualização da terapêutica na oncologia moderna já é uma realidade. Para isso, o conhecimento prognóstico dos mais diversos tipos de cânceres nas variadas populações pode definir um tratamento mais eficaz e até a cura num futuro não tão distante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epidemiologia do Câncer de Colo do Útero

Antes da Pandemia de COVID a *Global Cancer Statistics* estima que em todo o mundo, haverá cerca de 604.000 novos casos de câncer de colo de útero e 311.000 mortes em todo o mundo em 2020. Os dois cânceres mais diagnosticados em mulheres são: o câncer de mama (159 países) e o câncer cervical em 23 dos 26 países restantes (Sung, Hyun, et al., 2021) (**Figura 1**). No Brasil, estima-se 16.590 casos novos e mais de 3000 novos casos de câncer de colo de útero para o de Pernambuco (**Figura 2**) (INCA, 2021).



**Figura 1.** Incidência de Câncer de Colo do Útero (Câncer Cervical) no mundo.

| Localização primária        | Casos  | %     | Homens | Mulheres | Localização primária        | Casos  | %     |
|-----------------------------|--------|-------|--------|----------|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata                    | 20.570 | 40,7% |        |          | Mama feminina               | 13.190 | 27,3% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 3.120  | 6,2%  |        |          | Colo do útero               | 5.250  | 10,9% |
| Estômago                    | 3.000  | 5,9%  |        |          | Cólon e Reto                | 3.220  | 6,7%  |
| Cólon e Reto                | 2.540  | 5,0%  |        |          | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 2.640  | 5,5%  |
| Cavidade Oral               | 2.180  | 4,3%  |        |          | Glândula Tireoide           | 2.360  | 4,9%  |
| Esôfago                     | 1.580  | 3,1%  |        |          | Estômago                    | 2.090  | 4,3%  |
| Leucemias                   | 1.430  | 2,8%  |        |          | Ovário                      | 1.690  | 3,5%  |
| Laringe                     | 1.420  | 2,8%  |        |          | Corpo do útero              | 1.520  | 3,1%  |
| Sistema Nervoso Central     | 1.340  | 2,7%  |        |          | Sistema Nervoso Central     | 1.260  | 2,6%  |
| Linfoma não Hodgkin         | 1.120  | 2,2%  |        |          | Leucemias                   | 1.210  | 2,5%  |

\* Números arredondados para múltiplos de 10

**Figura 2.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma\*.

## 3.2 Câncer de Colo de Útero

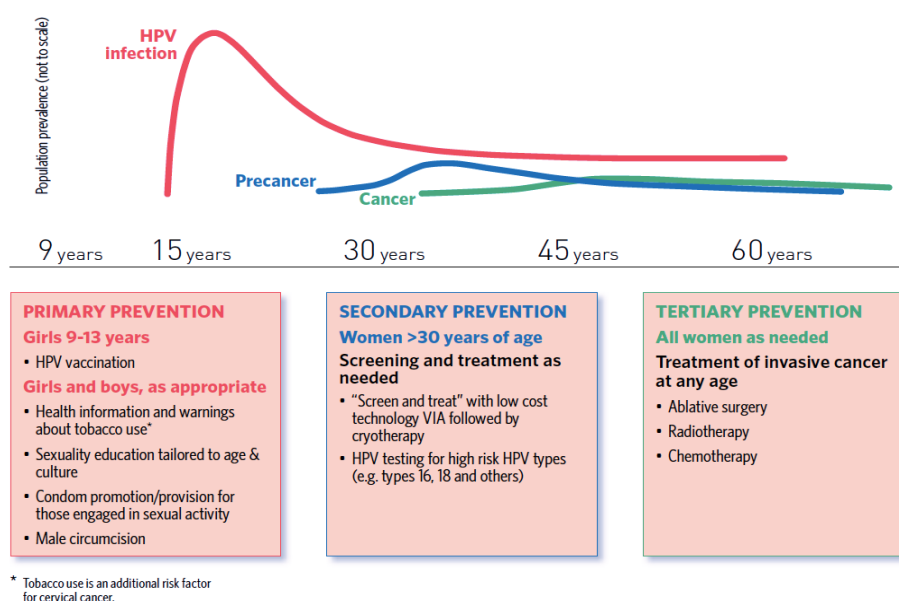
### 3.2.1 Papiloma Vírus Humano (HPV)

O papilomavírus humano (HPV) é uma vasta família de vírus, que convive com os humanos sem lhe trazer danos, em sua maioria. São patógenos classificados por genótipo, que têm duas fitas de DNA, com oito genes e uma base não codificada (CAMARA, GNNL, 2003). Há cerca de 150 subtipos de HPV conhecidos, sendo que 14 deles considerados cancerígenos que são os chamados HPVs de Alto Risco (IARC, 2020) (**Figura 3**).

O HPV é transmitido entre pessoas através do contato físico, pele/pele e pele/mucosa, via sexual. A maioria das pessoas é infectada logo após o início da atividade sexual com parceiro portador, mas a infecção pelos HPVs oncogênicos podem progredir até lesões pré-invasivas e estas, se não tratadas, evoluem para câncer (**Figura 4**). A regressão espontânea pode levar cerca de 2 anos. Os subtipos 16 e 18 são responsáveis por 70% dos CCU (WHO.INT.ORG, 2020).

| List of classifications by cancer sites with <i>sufficient</i> or <i>limited</i> evidence in humans, IARC Monographs Volumes 1–129 <sup>a</sup> |                                                                                                                                                                                                                      |                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Cancer site                                                                                                                                     | Carcinogenic agents with <i>sufficient</i> evidence in humans                                                                                                                                                        | Agents with <i>limited</i> evidence in humans                            |
|                                                                                                                                                 | X-radiation, gamma-radiation                                                                                                                                                                                         | Polychlorinated biphenyls<br>Tobacco smoking                             |
| Vulva                                                                                                                                           | Human papillomavirus type 16                                                                                                                                                                                         | Human immunodeficiency virus type 1<br>Human papillomavirus types 18, 33 |
| Vagina                                                                                                                                          | Diethylstilbestrol (exposure in utero)<br>Human papillomavirus type 16                                                                                                                                               | Human immunodeficiency virus type 1                                      |
| Uterine cervix                                                                                                                                  | Diethylstilbestrol (exposure in utero)<br>Estrogen–progestogen contraceptives<br>Human immunodeficiency virus type 1<br>Human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59<br>Tobacco smoking | Human papillomavirus types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82                |
| Endometrium                                                                                                                                     | Estrogen menopausal therapy<br>Estrogen–progestogen menopausal therapy<br>Tamoxifen                                                                                                                                  | Diethylstilbestrol                                                       |
| Ovary                                                                                                                                           | Asbestos (all forms)<br>Estrogen menopausal therapy<br>Tobacco smoking                                                                                                                                               | Talc-based body powder (perineal use)<br>X-radiation, gamma-radiation    |

**Figura 3.** Agentes causadores de câncer genital feminino e seu grau de evidência. Fonte: IARC Monographs.iarc.org



**Figura 4.** Curso da infecção do HPV na mulher, conforme a faixa etária. Adaptado de Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer in WHO.org

### 3.2.2 Colo Do Útero – Origens, Relações Anatômicas E Histologia

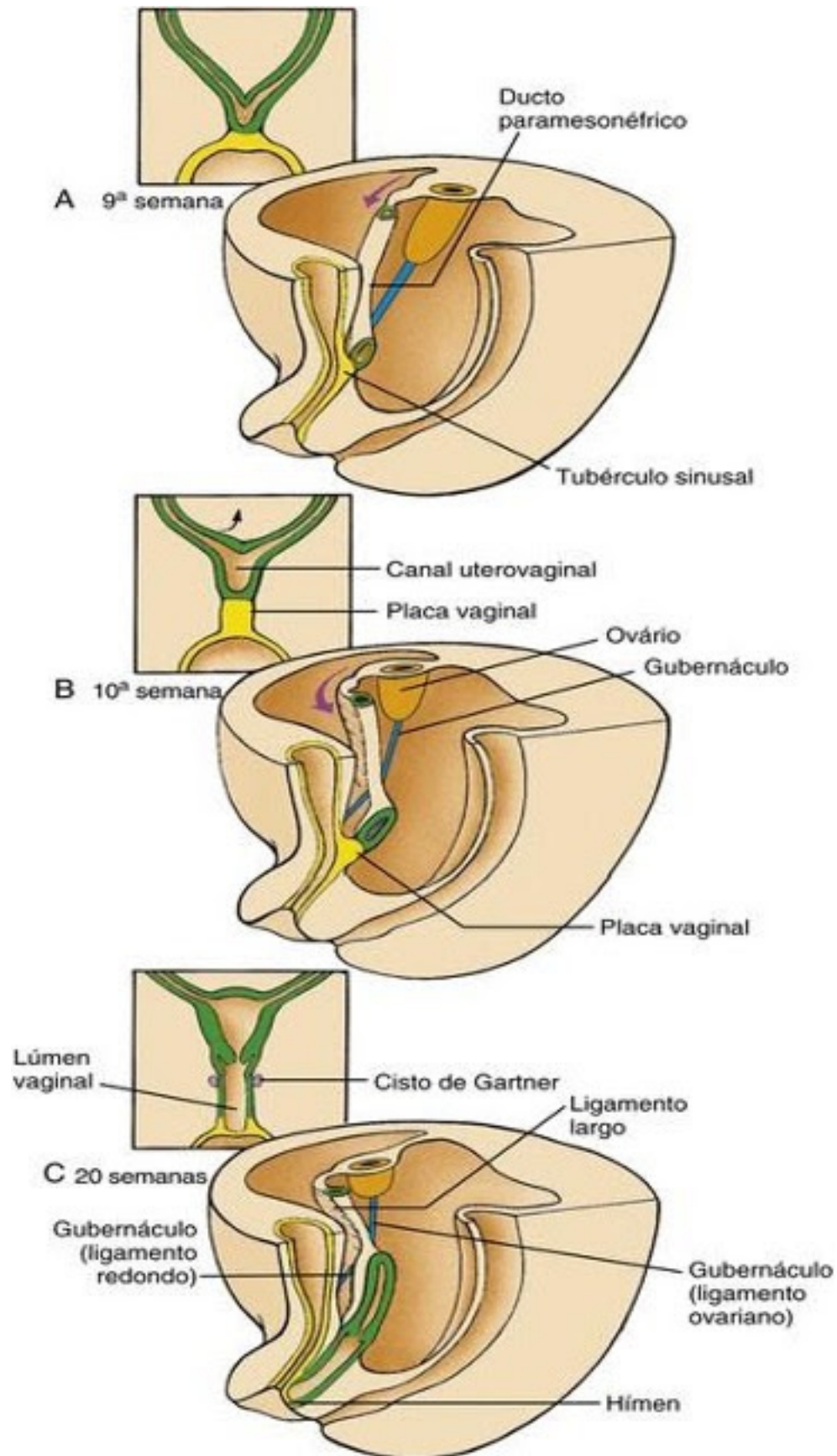
Localizado profundamente na vagina, o colo de útero está em seu fórnice e é geralmente voltado para sua parede posterior. Ele tem função reprodutiva, uma vez que é passagem obrigatória do espermatozóide em direção à cavidade uterina. O colo uterino é o portio, que garante a separação do ambiente da cavidade uterina com a vagina, preservando o interior do útero durante a gravidez. Sua função é essencial pois vela a passagem de conteúdo vaginal para o ambiente fetal garantindo assim a integridade das membranas amnióticas (CHUNG, K. ,2012).

Anatomicamente, o colo do útero tem relação com a bexiga urinária anteriormente, a ampola retal posteriormente, é contíguo com o corpo uterino cranialmente, e inferiormente, com o canal vaginal. Ele é cercado por ligamentos que lhes dão sustentação e mobilidade necessárias às suas funções de abertura e fechamento controlados, que garante a separação do meio vaginal com a cavidade uterina. Desprovido de sensibilidade a dor, possibilitando sua dilatação à passagem do conceito no parto, pode ser atingido por ferimento e até necrose, sem causar dor à mulher, mas também favorece amostragem por biópsia, ou tratamentos com cauterizações, sem necessitar anestesia (BHATLA *et al.*, 2018)

O colo do útero convive com a biota vaginal dispersa em meio mucoso, de pH ácido. Esse meio é composto por bactérias, fungos e, por vezes, vírus. A flora normal tem predomínio dos lactobacilos na mulher jovem no menacme. A porção externa do colo uterino é recoberta por epitélio pavimentoso que termina na entrada do canal cervical, e a partir de então, é revestido por epitélio glandular (PARKER, S, 2016). A localização da junção desses dois epitélios de revestimento, denominada Junção Escamo-colunar (JEC) vive em constante renovação celular, representada pelo epitélio metaplásico, em resposta às variações de pH advindas do meio vaginal, ao período do ciclo menstrual ou mesmo a fase reprodutiva da mulher. Sua localização e constante proliferação é sede de adaptação viral, fazendo do colo um alvo para doenças proliferativas como as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais ou NICs (SELLORS, 2004).

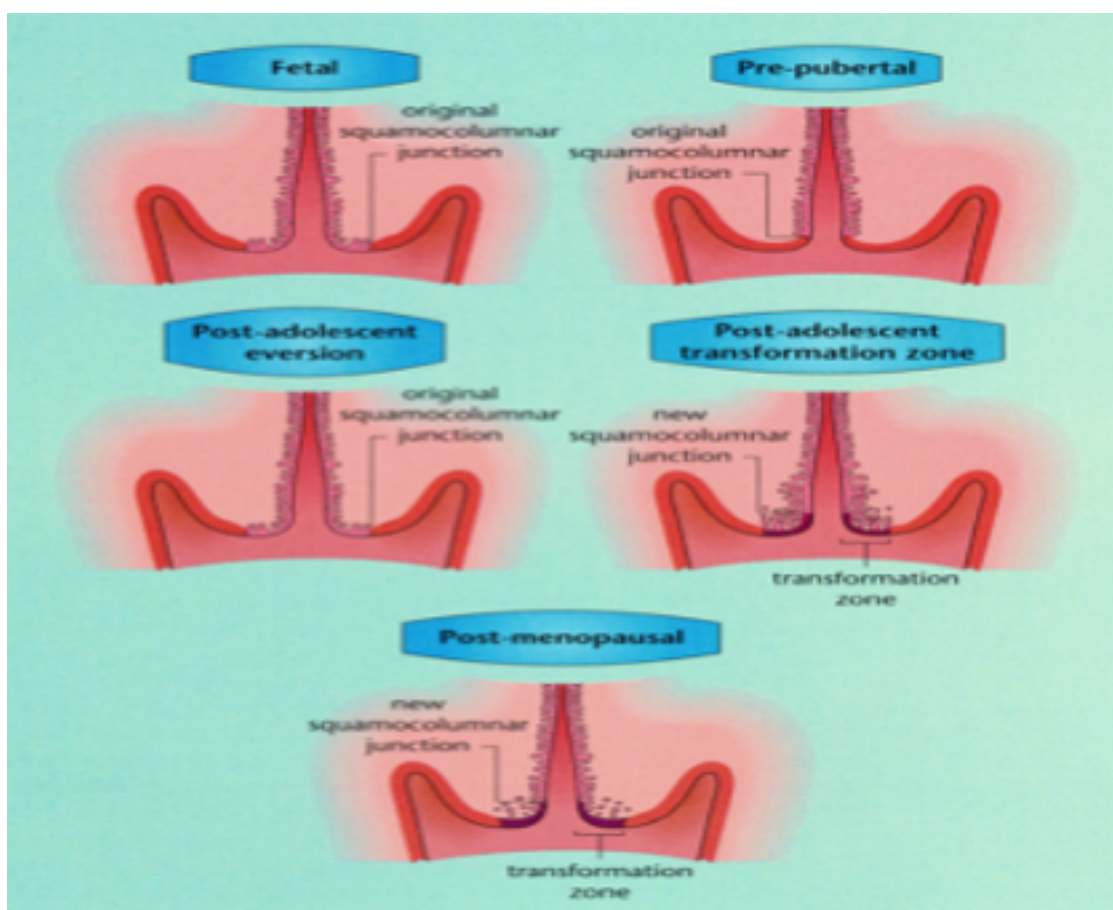
O corpo e colo uterinos, 1/3 superior da vagina, e tubas têm sua origem comum, nos tubos Mülleriano ou Paramesonéfricos (**Figura 5**). Esse processo se dá a partir da 6ª semana do desenvolvimento intrauterino, e se completa no final do primeiro trimestre. Essa diferenciação se dá na ausência do gene SRY do cromossomo Y, em fetos do sexo feminino, e mediante o estímulo estrogênico, bem como a ausência do Hormônio

Antimülleriano (HAM) e da Testosterona e constitui uma estrutura ainda em canalização ao nascimento (SCHOENWOLF,2016). O restante da vagina tem origem na placa vaginal.



**Figura 5.** Formação do aparelho genital feminino. Fonte: Adaptado de LARSEN'S HUMAN EMBRYOLOGY, 5TH EDITION, Figura 16-19, página 639.

Ao nascimento, o colo do útero é bastante rudimentar, com uma canalização em direção à cavidade uterina ainda incompleta. Nesse tempo, é quase totalmente recoberto por tecido glandular. O epitélio se aprimora durante a primeira infância, constituindo o tecido glandular caliciforme ciliado, em monocamada, ao mesmo tempo em que se retrai em direção ao canal cervical, enquanto é substituído pelo epitélio pavimentoso escamoso, no revestimento externo do colo uterino, tecido este que fará contato direto com o meio vaginal no colo maduro. Este processo é lento e contínuo, e depende da maturação ovariana com sua produção estrogênica (LARSEN, 2016). Na adolescência, este epitélio glandular está menos exposto, mas ainda é comum a presença de ectrópio (**Figura 6**), que é a visualização de tecido glandular na exocérvice.



**Figura 6.** Posição de JEC conforme a fase reprodutiva da mulher. Fonte: Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer. - IARC 2017.

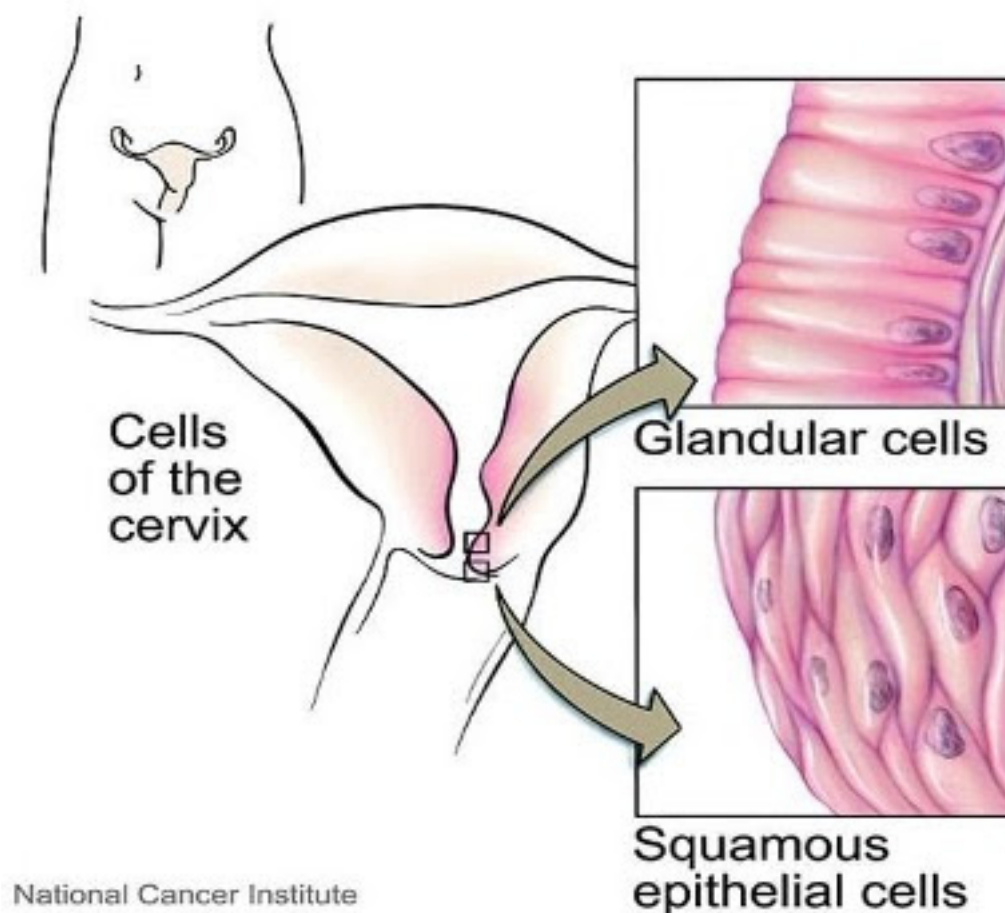
Na mulher adulta, acima de 20 anos, temos um colo maduro (**Figura 7**), onde a Junção Escamo-Colunar (JEC) começa a se igualar ao Orifício Cervical Externo (OCE)

(SELLORS, 2004). Diz-se assim, em exame colposcópico, que a JEC é 0, ou seja, se encontra no limite do OCE. A JEC é composta por células imaturas, metaplásicas, que representam a transição dos tecidos de revestimento do colo uterino, epitélio escamoso de revestimento externo (exocérvice) e o epitélio glandular que reveste o canal cervical. O epitélio glandular de revestimento do canal cervical, é contíguo com o endométrio, que reveste a cavidade uterina (GROSS,1988).



**Figura 7.** Colo normal, padrão, com JEC no OCE. Seu canal endocervical está dilatado e demonstra a passagem de muco característico do período ovulatório. Fonte: Adaptado do Manual de PTGI e Colposcopia, Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2010, pág 15

A transição do tecido glandular para o escamoso (JEC) é bem conhecida, mas a transição do tecido glandular ciliado, de revestimento do canal cervical (**Figura 8**), para o tecido glandular que reveste a cavidade uterina, não é bem conhecida. Diferente da primeira, o endométrio é um tecido de várias camadas, células não ciliadas, e renovável em pelo menos dois terços de sua espessura a cada menstruação.



**Figura 8.** Epitélios de revestimento do Colo do Útero. Fonte: Adaptado de Cervical Cancer Treatment - Patient Version in National Cancer Institute-NCI, <http://cancer.org>.

O entendimento da fisiologia desses tecidos é base para a compreensão da patogenia das doenças proliferativas do Colo do Útero.

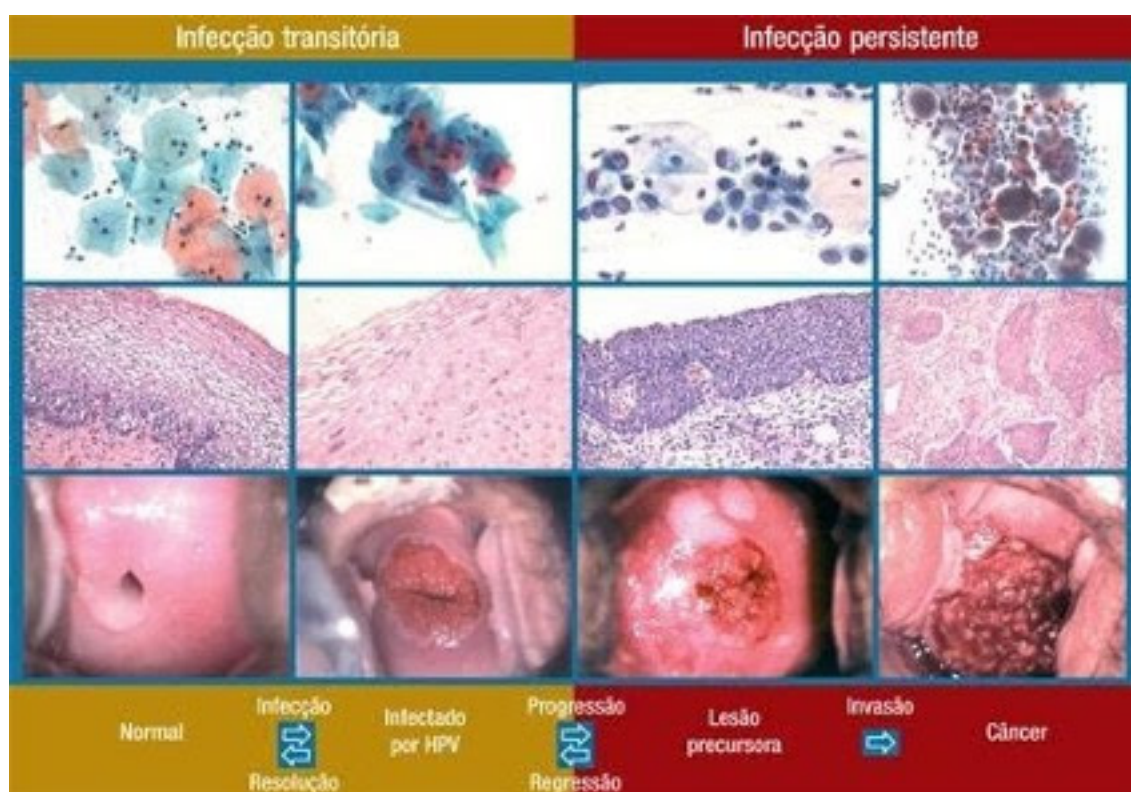
### 3.3 Fatores de Risco Conhecidos no Câncer do Colo Do Útero

Fatores associados ao hábito de vida e ocorrência de infecção pelo Papilomavírus Humanos estão associados ao risco de uma mulher desenvolver câncer do Colo do Útero durante sua vida (CHAN *et al.*, 2019). De todos os fatores conhecidos, a infecção pelo HPV é reportada como o mais importante, pois estima-se que 80% das mulheres sexualmente ativas terão contato com HPV ao longo de suas vidas (CHESSON *et al.*, 2014). Os Papilomavírus Humanos podem ser divididos pelo tropismo histológico, sendo que os de tropismo mucoso podem ser de baixo ou alto risco oncogênico (LETO *et al.*,

2011). Há mecanismos moleculares bem definidos na carcinogênese pelo HPV, como as proteínas E6 e E7 (ALLISON; JIANG; MILNER, 2009; VEO *et al.*, 2015).

Estes fatores de risco são: infecção pelo Papilomavírus Humano; Início precoce ou antes dos 18 anos da atividade sexual; multiplicidade de parceiros; parceiro portador de HPV ou que tenha múltiplas parceiras; tabagismo; portadoras de imunodeficiência; usuárias de imunossupressores; portadoras de doenças autoimunes; infecção por Clamídia; uso prolongado de contraceptivo oral; mulheres que têm 3 ou mais gestações; primeira gestação antes dos 20 anos de idade; baixo status socioeconômico; dieta pobre em frutas e vegetais (GONZALEZ, B, 2007).

Além dos fatores de risco conhecidos, sabe-se que a idade pode fazer diferença na evolução da infecção do HPV para câncer. Mulheres abaixo de 20 anos têm pouca chance de apresentar CCU (SASLOW *et al.*, 2012), enquanto na população de 20-30 anos o teste de Papanicolaou ou Pap Test, tem uma boa indicação como rastreio populacional (MOYER, 2012). A história natural do CCU inicia com a proliferação da infecção para lesões pré-invasivas, as Neoplasia Intraepiteliais Cervicais (NICs) (**Figura 9**).



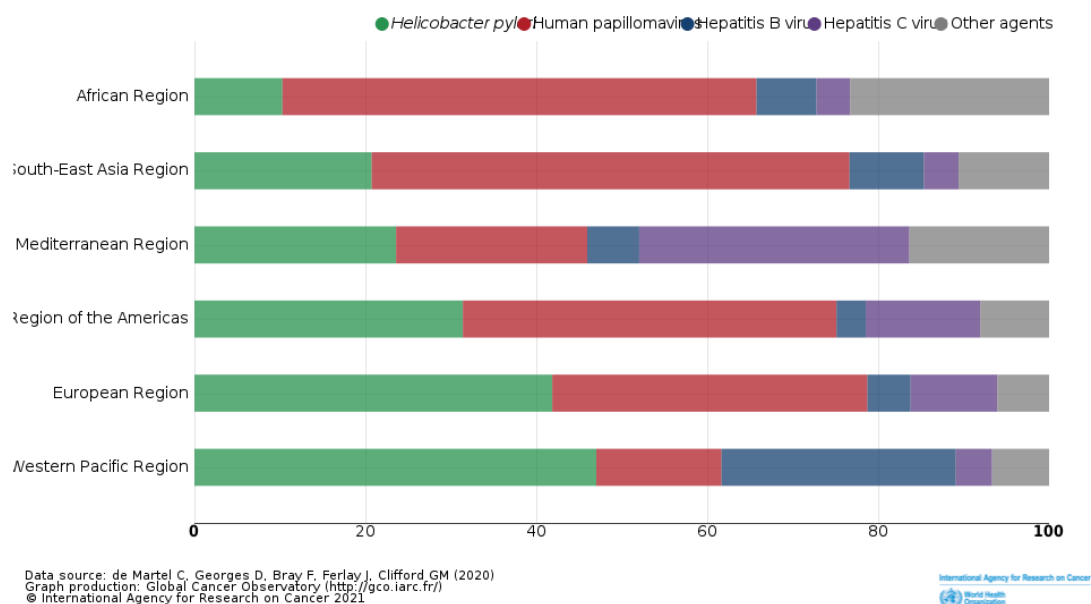
**Figura 9.** Colo do útero normal, e com lesão HPV induzida, Lesão pré-invasiva e Invasora. Um correspondente evolutivo Colposcópico, Citológico e Histológico. Fonte: Adaptado do Histology and Cytopathology of the Uterine Cervix. Digital Atlas IARC Lyon FR, 2004.

A duração e evolução dessas lesões pré-invasivas é lenta, podendo chegar a mais de 10 anos (ZEFERINO *et al.*, 1998). Quanto mais cedo se inicia a atividade sexual, menos preparado está o colo a se defender das agressões, pois o epitélio glandular que o recobre na pré-púbere e adolescente parece não ter a mesma resistência que o tecido pavimentoso escamoso maduro (CHAN *et al.*, 2019). Em mulheres com menos de 30 anos observa-se, frequentemente, regressão espontânea das infecções pelo vírus (WHO, 2021). Assim, há muitas evidências que recomendam rastreio do CCU com teste de HPV a cada 5 anos, em mulheres a partir dos 30 anos, até os 65 anos. O HPV teste pode ser detectado através de uma amostra da secreção que recobre o colo do útero, submetida a uma hibridização molecular. Ele detecta habitualmente a presença de HPV de alto risco. A adoção desta medida otimiza ainda mais a busca por mulheres propensas à progressão das NICs para carcinoma invasivo (MOYER, 2012). No entanto, o custo deste teste pode ser um fator limitante em países de economia precária. No Brasil, por exemplo, o rastreamento de portadoras de HPV de alto risco não foi incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS).

### 3.4 Desenvolvimento de Displasias e CCU

Quinze a vinte por cento de todos os cânceres conhecidos são causados por agentes virais, incluindo os HPVs (WENTZENSEN *et al.*, 2017). Eles são responsáveis por infecções locais, multifocais e multicêntricas, de forma que, progredindo para câncer, pode acarretar doença multicêntrica. Alguns estudos demonstram a concomitância do CCU com câncer de canal anal (**Figura 10**).

A infecção pelo HPV é fundamental na patogênese do CCU, mas há uma gama de fatores de risco já bem conhecidos envolvidos na sua gênese. Esses fatores podem se associar para atuar na carcinogênese. No entanto, a obesidade tem figurado como um fator independente promotor do câncer, e também é capaz de se associar a outros fatores e potencializá-los (VEO *et al.*, 2015). Sobre o prognóstico do CCU, os ácidos graxos podem estar envolvidos no desenvolvimento de metástases. Assim, pode-se dizer que a obesidade pode não só promover, mas piora o prognóstico dos cânceres (AVGERINOS *et al.*, 2019).



**Figura 10.** Magnitude da Infecção viral como uma das maiores causas de câncer na atualidade, em ambos os sexos, por Continentes. Em vermelho, os tumores causados pelo HPV. Fonte: Globocan - Cancer attributable to Infections, 2021.

Os HPVs estão envolvidos em modificações gênicas, e contrariamente ao que ocorre com as mutações genéticas, essas modificações são reversíveis (SHANG *et al.*, 2018). Isso traz luz à possibilidade de cura, oferecendo uma chance de terapia epigenética para o câncer. No câncer do colo do útero, há uma clara correspondência da evolução por persistência da lesão causada pelo HPV e seu correspondente visual obtido no exame especular, parte da propedêutica num exame ginecológico rotineiro. A displasia segue a partir da JEC para o epitélio escamoso (exocérvice) ou glandular (canal cervical), conforme o tropismo do tipo do HPV responsável por aquela infecção. Quando a infecção consegue violar a lâmina basal ou lâmina própria do epitélio, atingindo o estroma cervical ocorre a diferenciação para carcinoma *in situ*. A partir daí, se não tratado, passamos a observar um carcinoma invasivo (LUTZ GISSMANN, 2006).

Sobre a forma de progressão, teremos os tumores que se crescem para além do exocérvice, na direção da vagina, obtendo uma forma dita exofítica, caracterizada por ter uma base estreita de infiltração. O tumor exofítico pode atingir proporções importantes e causar hemorragias vultosas, e anemia grave resultante. Há, ao contrário, tumores que crescem predominantemente de forma endofítica, para dentro da estrutura do colo, preservando ao máximo a parte exocérvice, mesmo que avolumando o colo em seu tamanho. O tumor endofítico, pode confundir facilmente um colposcopista pois mesmo já

avançado, mantém a aparência externa de um colo normal. Ainda existem tipos que são a mistura dessas tendências de crescimentos, apresentando componente endofítico e exofítico. Além destes, podem se apresentar na forma de úlcera, ou polipóide (SASLOW *et al.*, 2012; SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2004).

### 3.5 Tipos Histológicos

Há cerca de 72 tipos de câncer do colo uterino bem estabelecidos (Anexo IV). Destes, o Carcinoma Escamoso, ou escamocelular, que provém do epitélio superficial escamoso é o mais predominante (80%). Já o Adenocarcinoma, provindo do tecido glandular caliciforme do canal cervical, é o mais frequente originário do epitélio glandular (HO *et al.*, 2006). Para este último, considera-se uma proposta de classificação baseado no padrão histológico pois, apesar de pouco frequente, apresenta uma tendência a fazer metástases precoce, ou seja, quando o tumor no colo ainda não passa de 2cm no maior diâmetro. Diferentemente do tipo escamoso, que cresce por contiguidade (GONZALEZ B, 2007) o adenocarcinoma tem uma tendência a avançar via linfática.

### 3.6 Estadiamento Do Câncer Do Colo Do Útero

Independentemente do tipo do câncer, o estadiamento é feito considerando o órgão anatômico, agrupados por status prognóstico. Quanto maior o tumor e mais envolver órgãos adjacentes e sistemas, menor a chance de sobrevida (**Tabela 1**). Assim, há uma sequência evolutiva que determina, por ocasião do diagnóstico, um prognóstico de sobrevida baseado neste estadiamento.

| <b>Estádio</b>               | <b>5 anos de sobrevida</b> |
|------------------------------|----------------------------|
| Localizado                   | 92%                        |
| Regional                     | 56%                        |
| Com doença à distância       | 17%                        |
| Todos os estádios combinados | 66%                        |

**Tabela 1.** Prognósticos baseados na sobrevida por registro de câncer de colo do útero (2009-2015). Fonte: American Cancer Society - Cervical Cancer - 5-year relative survival rates for cervical cancer - American Cancer Society - [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Acesso em: 06 Jan

O Estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - FIGO, que pode ser visto na **Tabela 2**, abaixo, contempla os estágios do estadiamento:

| ESTADIAMENTO<br>FIGO |     | DESCRIÇÃO                                                                                                                                                                            |
|----------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I                    |     | <b>As células cancerígenas cresceram da superfície do colo do útero para os tecidos mais profundos. O tumor não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.</b> |
|                      | IA  | Existe uma quantidade muito pequena de doença que pode ser visualizada apenas sob um microscópio. O tumor não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.       |
|                      | IA1 | O tumor só pode ser visualizado sob um microscópio e tem menos de 3 mm de profundidade, não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                         |
|                      | IA2 | O tumor só pode ser visualizado com microscópio, tem entre 3 e 5 mm de profundidade, não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                            |

|  |     |                                                                                                                                                                                                  |
|--|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | IB  | Isso inclui o tumor em estágio I, que se espalhou até 5 mm, mas ainda está limitado ao colo do útero. Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                       |
|  | IB1 | O tumor tem entre 5 mm e 2 cm de tamanho, mas não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                                               |
|  | IB2 | O tumor tem entre 2 e 4 cm de tamanho, mas não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                                                  |
|  | IB3 | O tumor tem pelo menos 4 cm de tamanho e está limitado ao colo do útero. Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                    |
|  |     | <b>O tumor cresceu além do colo do útero e do útero, mas não invadiu as paredes da pelve ou a parte inferior da vagina. Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.</b> |

|    |      |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| II | IIA  | O tumor cresceu além do colo do útero e do útero, mas não se espalhou para os tecidos próximos ao colo do útero (parametria). Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                                        |
|    | IIA1 | O tumor não é maior que 4 cm. Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                                                                                                                                        |
|    | IIA2 | O tumor tem 4 cm ou mais. Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                                                                                                                                            |
|    | IIB  | O tumor cresceu além do colo do útero e se espalhou para os tecidos próximos ao colo do útero (os paramétricos). Não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                                                     |
|    |      | <b>O tumor invadiu a parte inferior da vagina ou as paredes da pelve. Pode estar bloqueando os ureteres (tubos que transportam a urina dos rins para a bexiga). Pode (ou não) ter se espalhado para os linfonodos próximos, mas não se disseminou para outros órgãos.</b> |

|     |      |                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| III | IIIA | O tumor se espalhou para a parte inferior da vagina, mas não para as paredes da pelve. Mas não se espalhou para os linfonodos próximos, nem para outros órgãos.                                                            |
|     | IIIB | O tumor cresceu nas paredes da pelve e/ou está bloqueando um ou ambos os ureteres, causando problemas nos rins (hidronefrose). Mas não se espalhou para os linfonodos próximos, nem se espalhou para outros órgãos.        |
|     | IIIC | O tumor pode ser de qualquer tamanho. Os exames de imagem ou uma biópsia mostram que se espalhou para os linfonodos pélvicos próximos (IIIC1) ou linfonodos para-aórticos (IIIC2). Mas não se espalhou para outros órgãos. |
| IV  |      | <b>O tumor invadiu a bexiga ou reto ou se disseminou para outros órgãos, como pulmões ou ossos.</b>                                                                                                                        |
|     | IVA  | O câncer se espalhou para a bexiga ou reto ou está crescendo além da pelve.                                                                                                                                                |

|  |     |                                                                                                           |
|--|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | IVB | O tumor se espalhou para outros órgãos além da área pélvica, como linfonodos distantes, pulmões ou ossos. |
|--|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Tabela 2.** Os quatro estádios do Câncer do Colo de Útero e seus subgrupos, utilizados como referências de tratamentos, e manejo de prognóstico, além de uniformizar observação temporal. FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia. Revisado em 2018.

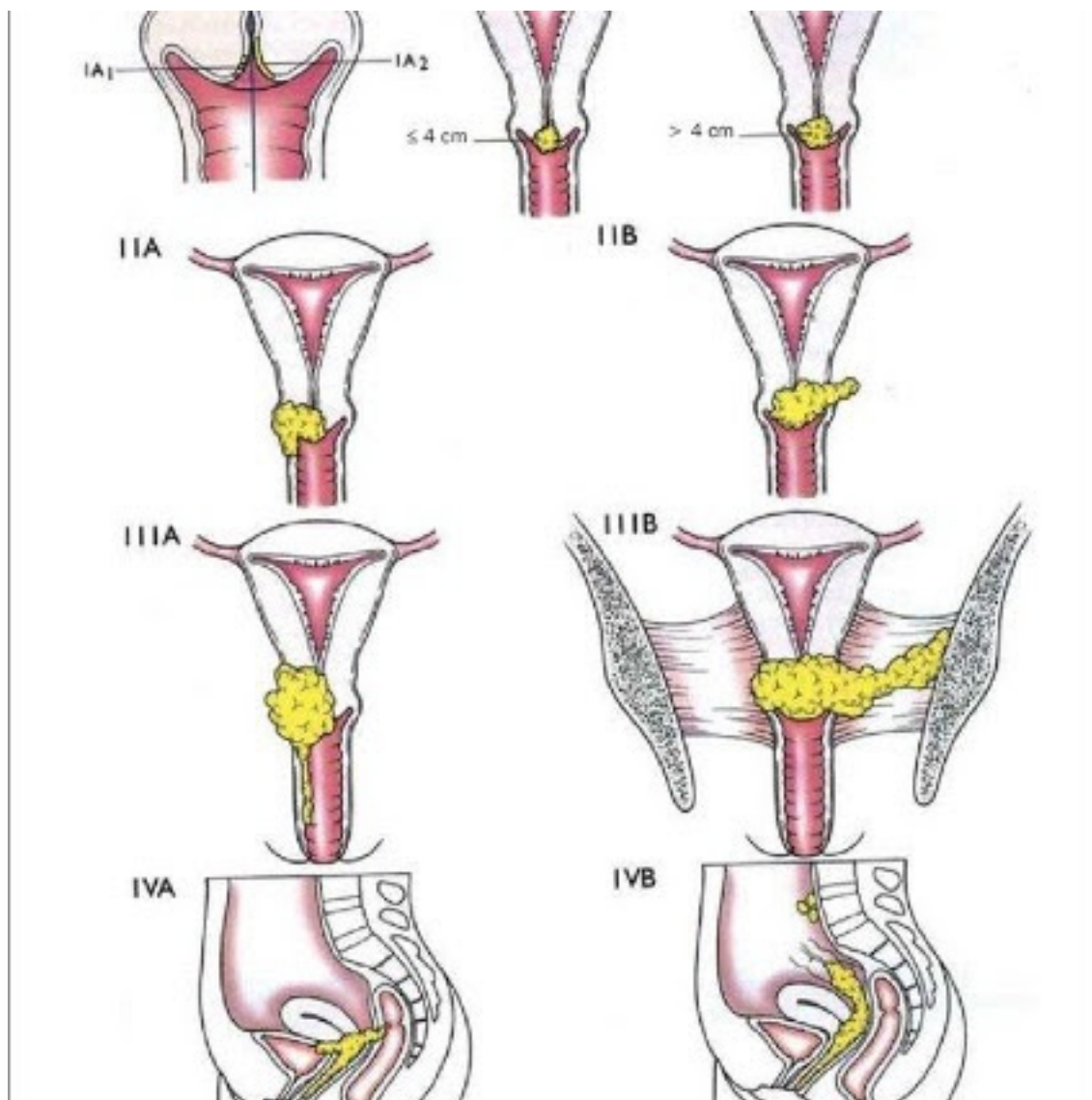
O Estadiamento do CCU é clínico, realizado por médico especialista. O exame ginecológico é elementar para o estadiamento dos tumores invasivos, macroscópicos. Esse estadiamento clínico define a gravidade e a modalidade de tratamento. Com ajuda do espéculo de Collins, realiza-se a inspeção visual, complementada pelo toque vaginal bidigital, seguida de toque retal. O exame dá uma estimativa bastante precisa do volume, infiltração vaginal, da extensão da doença para os paramétrios, a bexiga e o reto. Afasta-se já neste exame a viabilidade do tratamento cirúrgico.

Para avaliação do comprometimento linfonodal pélvico, da cadeia para-aórtica e doença visceral à distância, como fígado, e pulmões - locais comuns de metástases no CCU - é necessário a utilização de Tomografia e Ressonância Magnética (ABU-RUSTUM *et al.*, 2020), conforme a necessidade clínica e sintomatologia da paciente no momento do diagnóstico.

### 3.7 Tratamento do Câncer do Colo do Útero

Nos estádios iniciais da doença, onde o tumor está apenas infiltrando o colo uterino, ou é microscópico, detectado apenas pela biópsia, e em especial na mulher no menacme, com desejo de prole ou sem prole definida, o tratamento pode ser feito através de uma Traquelectomia ou Conização do Colo do Útero (ABU-RUSTUM *et al.*, 2020).

Após este período, e se constatado a presença de doença extensiva para a vagina, ou mesmo, presença da doença extensa para o paramétrio (**Figura 11**), são indicadas as cirurgias radicais, como a cirurgia de Wertheim-Meigs (ZANINI *et al.*, 2020) isso se elegível para cirurgia ao exame inicial de estadiamento.



**Figura 11.** Propagação habitual do Câncer do Colo do Útero, por contiguidade. Imagens obtidas do Site da FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia.

Para as doenças volumosas, acima de 4 cm no maior diâmetro, a radioterapia é a primeira opção de tratamento (ABU-RUSTUM *et al.*, 2020). A dose total de Radioterapia é fracionada em 25-28 partes, para controle do dano actínico. Num total ao final de 5.040 cGy. O tratamento é complementado por Braquiterapia, radioterapia por via vaginal, com 40-70 cGy semanal, em 3 a 4 sessões. Esse tratamento pode ter ligeiras variações conforme a tolerância da paciente, mas é o que atualmente é oferecido nos mais diversos centros de tratamento no mundo (COLOMBO, N. *et al.*, 2012). A partir de 1999 associa-se à radioterapia uma dose sensibilizante com derivado de Platina, cisplatina ou Carboplatina (ROMA *et al.*, 2015) semanal.

### 3.8 Seguimento Pós-Tratamento

Após completado o tratamento, a paciente deve ser acompanhada por, pelo menos, 5 anos (COLOMBO, N. *et al.*, 2012) visando identificar atividade da doença o mais precocemente e tratar. Mas não há consenso sobre como deve ser feito esse seguimento (ZANINI *et al.*, 2020). A vigilância armada, ou seja, acompanhada de imagens de alta resolução como Ressonância Magnética é recurso caro e pouco disponível em locais de economia precária.

No primeiro ano após o tratamento é recomendado que a paciente seja examinada a cada 3 meses com ou sem a realização complementar do teste de citologia oncológica do esfregaço vaginal, pois há poucas evidências de que a citologia nessa fase contribua para o diagnóstico da recorrência da doença (COLOMBO, N. *et al.*, 2012). Nos primeiros dois anos a paciente deve ser seguida trimestral ou semestralmente. Isso visa rastrear e tratar sem prejuízo de tempo, as falhas do tratamento, e assim oferecer resgate de tratamento, melhorando as chances de cura da paciente (VIEIRA *et al.*, 2009).

Essas falhas podem ser precoces, quando se identifica doença residual durante exame físico locorregional, até o final do 3º mês de após o término do tratamento, ou por achado de imagem de controle, como Ressonância ou Tomografia. A falha no tratamento pode ser, além desse tempo, quando identificada como uma volta do surgimento do tumor após 6 meses de findado o tratamento. Temos assim a doença residual no primeiro caso, e a doença recidivada no segundo, mas ambas apresentações de uma doença que é radioquimiorresistente (BHATLA *et al.*, 2018). Cerca de  $\frac{3}{4}$  das falhas no tratamento ocorrem nos primeiros dois anos de seguimento (PARVEEN *et al.*, 2006). As recidivas vaginais são particularmente agressivas, associadas a uma taxa de sobrevida de 26% (ELEJE, G. U. *et al.*, 2019).

A resistência do tumor ao tratamento pode ser intrínseca, prévia ao tratamento, ou adquirida no curso do tratamento como uma resposta adaptativa à agressão do tratamento (HOLOHAN, 2013)

O grau de estadiamento clínico no CCU é um dos primeiros fatores de prognóstico (QIN *et al.*, 2014a). Assim, quanto mais avançado, mais extenso ou volumoso, mais difícil de tratar e de curar. O volume tumoral parece estar diretamente envolvido no resultado do tratamento e na perspectiva de cura. Mas mesmo tumores volumosos, localmente avançados, quando radiosensíveis, têm cura total. Sendo assim, o tratamento com Radioterapia associado a quimioterapia de indução é curável para 2/3 das pacientes, mesmo

para tumores avançados. Outros, por sua vez, suplantam a ação da radiação, com ou sem a associação da quimioterapia sensibilizante (VITHANA *et al.*, 2021).

### 3.9 Prognóstico

A idade média da mulher ao diagnóstico do CCU é de 53 anos (RASHMI *et al.*, 2018). Dados de incidência e mortalidade são deficitários, tendo em vista a escassez de registros confiáveis, sobretudo por tratar-se ser doença prevalente em países com baixos índices de desenvolvimento (ROMA *et al.*, 2015). Sabe-se que a situação econômica de um país impacta diretamente no risco de morrer da doença (PARVEEN *et al.*, 2006) pois implica no status nutricional da população e também no acesso aos recursos de assistência à saúde.

O estadiamento é o fator de prognóstico mais importante, ou seja, quanto mais avançada e abrangente a doença, menor é a chance de cura. Algumas variantes histológicas, mesmo tumores pouco volumosos ao diagnóstico, podem ter uma alta agressividade (JUNG *et al.*, 2017), independente do tipo histológicos. O padrão histológico de adenocarcinomas endocervicais, baseado no seu padrão arquitetural, aumenta a chance de ter metástases precoces (ROMA *et al.*, 2015).

Em pacientes tratadas inicialmente com cirurgia, nos tumores elegíveis por estadiamento, a presença de invasão linfática e vascular, invasão linfovascular (ILV), também é um preditor de agressividade (ROMA *et al.*, 2015), de forma que nessas pacientes, se prevê a adjuvância com radioterapia para melhor controle locorregional da doença.

No entanto, sobreviver ao câncer do colo uterino depende, em grande parte, do estágio da doença ao diagnóstico, mas o acesso aos recursos do tratamento tem papel na sobrevida. Em países de baixo acesso aos recursos de tratamento, essa taxa de sobrevida global (SG) em 5 anos pode chegar a 38,62% (SHRESTHA *et al.*, 2018). A taxa de anemia, o uso de substâncias e a associação com doenças de base não controladas pioram essa sobrevida (WASSIE *et al.*, 2019).

O grau de diferenciação celular, o subtipo tumoral, o status linfonodal, e a idade ao diagnóstico influenciam na sobrevida (WASSIE *et al.*, 2019), e outros fatores como grupos étnicos (YANG, J. *et al.*, 2019). Não há ainda como saber qual o valor prognóstico individual desses fatores, uma vez que costumam se somar na população estudada. Há fatores de prognóstico de sobrevida que podem predizer a recorrência no CCU, esses fatores

prognósticos associados com o estado dos sintomas, o local da recidiva e a modalidade do tratamento (WOJTYLA; JANIK-KONCEWICZ; LA VECCHIA, 2020) ajudam a prever o prognóstico.

### 3.10 Falhas no Tratamento

A doença localmente avançada tem como tratamento padrão a radioterapia associada à quimioterapia de indução, radiosensibilizante. Ocorrendo a recidiva da doença, ou por ocasião da constatação da doença residual, há proposta de tratamento cirúrgico. Essa é chamada de cirurgia de resgate, que apesar de não ter impacto na sobrevida global, tem na qualidade de vida. A utilização desse recurso de tratamento sem impacto na sobrevida, desestimula sua indicação nos tumores avançados (SHI *et al.*, 2018).

A radioresistência é, sem dúvida, uma das principais causas das falhas de tratamento, e, portanto, das mortes atribuídas ao CCU. Dessa forma, o conhecimento do fenótipo da radioresistência é fundamental no combate à doença. Muitos fatores têm sido associados a radiorresistência, que envolvem efeitos sobre a apoptose, hipóxia e temperatura na radioterapia, ciclo-oxigenase e angiogênese (YOSHIDA *et al.*, 2018). Fatores diferenciados de crescimento do endotélio vascular podem ser responsáveis por este comportamento do tumor, onde a super expressão de VEGF foi constatada em tumores de mau prognóstico (MABUCHI *et al.*, 2010). Estudos com células tronco do câncer cervical conseguiram resultados com radiosensibilização através da regulação positiva do Fator de Transcrição AP-1 com a curcumina (TYAGI *et al.*, 2017).

Tumores com metabolismo glicolítico mais intenso são associados à quimioradioresistência (QIN *et al.*, 2014b), de forma que a inibição da glicólise e do metabolismo redox podem ser uma alternativa para reduzir essa resistência ao tratamento (SCHWARZ *et al.*, 2012) e assim melhorar as chances de cura completa da doença.

### 3.11 Epigenética no Câncer do Colo do Útero

O desvendamento do código genético, que teve seu grande impacto com o Projeto Genoma Humano, muito se tem avançado no conhecimento de doenças, bem como seu manejo terapêutico, e até na criação de drogas biológicas.

A Epigenética surge como um ramo da Biologia que estuda os fenômenos na cromatina, ou seja, estuda as interações entre os genes, sua expressão e supressão, que refletem alterações na sequência do DNA, e por fim o que ocorre na divisão celular. Assim, a epigenética observa modificações adquiridas nos genes. Segundo Berger (BERGER *et al.*, 2009) pode-se denominar caráter epigenético quando o fenótipo é alterado por tais mudanças.

Nas últimas duas décadas a epigenética tem observado a atividade de enzimas e manipulação de reparo de genes, que se traduz em medicamentos capazes de tratar doenças graves como o câncer. Um exemplo disso é o desenvolvimento e utilização das drogas de alvo molecular, que utilizam proteínas que impedem sequências de eventos, impedindo a proliferação de células tumorais. Essa terapia traz um nível de precisão e individualização dos tratamentos, que é foco de estudos no mundo todo, como alternativa à cura de cânceres até então sem tratamento ou refratários aos tratamentos conhecidos (MANZO-MERINO *et al.*, 2014).

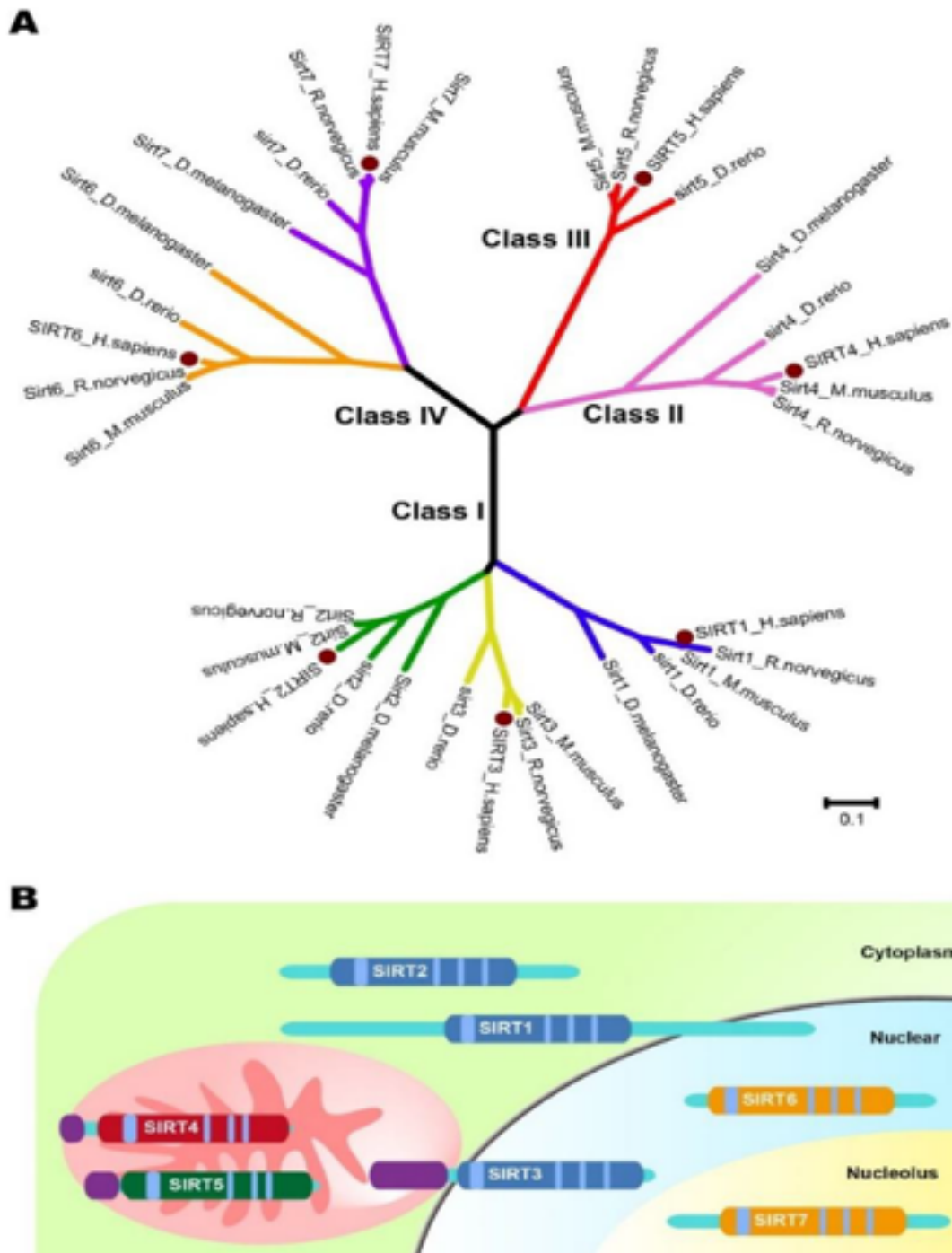
O avanço da Epigenética vai além do tratamento, podendo também contribuir no diagnóstico das doenças, na medida em que se estuda marcadores genéticos que tenham potencial no diagnóstico e prognóstico de muitos tumores. Isso pode ser possível devido à natureza viral de muitas causas cânceres.

#### 3.11.1 As Sirtuínas

As Sirtuínas (SIRTs) são uma família de enzimas que processam a desacetilação das Histonas, presentes em muitos organismos vivos. Nos mamíferos é conhecida uma família de sete sirtuínas, tendo o dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD<sup>+</sup>) como cofator essencial, e pertencentes às Classes de I a IV das sirtuínas conhecidas. Sua localização nas células determina sua função metabólica (**Figura 12**).

Conhecer as diversas funções das sirtuínas é um desafio no estudo da epigenética. A importância de seu papel nas doenças degenerativas e proliferativas são reconhecidos. Essas funções variam conforme seu local na célula, mas também variam conforme o tipo

do tumor (ZHAO, E. *et al.*, 2019) na carcinogênese, seja como um agente pró-tumor, seja como pró-apoptótico.



**Figura 12.** Família das Sirtuínas. Marcadas com pontos marrons as Sirtuínas encontradas nos humanos. As sirtuínas e sua localização nas células. Adaptado de Zhao,2019.

### 3.11.2 Sirtuinas no CCU

O câncer do colo do útero, por ser doença proliferativa HPV dependente, é alvo de grande interesse da epigenética. A evolução dos achados que impactaram o conhecimento do papel das sirtuinas na carcinogênese do CCU, participação de proteínas oncogênicas do HPV, em conjunto com sirtuinas, inibindo P53, portanto inibindo a apoptose, caminho conhecido nessa carcinogênese, podem ser vistos reunidos na Tabela 2.

Induzir a morte da célula tumoral é um caminho considerado para o tratamento de câncer. Assim, em artigo publicado em 2006 (QIAO *et al.*, 2006) os autores mensuraram a indução do apoptose em espécime de células HeLa pelo N-dimethyl-clarithromycin por via mitocondrial. Verificou-se que a SRT1 também tinha sua expressão anti-apoptótica desregulada, ao mesmo tempo em que havia um incremento na expressão do P53.

| <b>MATERIAL BIOLÓGICO</b>                  | <b>METODOLOGIA</b>                                   | <b>FENÔMENO OBSERVADO</b>                                     | <b>ACHADOS</b>                                                                                         | <b>REFERÊNCIA</b> |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| HeLa                                       | Western blot                                         | Indução da Apoptose                                           | O aumento do P53 e Diminuição da SIRT1                                                                 | Quiao AM, 2006    |
| SiHa, CaSki com HPV 16                     | Immunoblot, Rt-PCR                                   | Comportamento das proteínas E6 e E7                           | Provável efeito antiapoptótico da SIRT1 sobre proteínas E7. Indução a apoptose pela depleção de SIRT1. | Allison SJ, 2009  |
| Produto de biópsia (N101) fixada em formol | Imunohistoquímica                                    | Expressão das SIRTs em NICs, câncer in situ e câncer invasivo | O aumento das SIRTs corresponde a progressão das NICs                                                  | Velez-Perez, 2017 |
| C33a                                       | Edição gênica com CRISPR/Cas9 para extração de SIRT1 | Alta na replicação do HPV                                     | Removendo SIRT1 aumenta a replicação viral (HPV 16)                                                    | Das D, 2017       |

|                                                                    |                                                              |                                            |                                                                        |                  |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|
| SiHa, CaSki, e HeLa                                                | Western blot, Rt-PCR, Imunohistoquímica e Imunofluorescência | Quimiorresistência do câncer cervical      | Aumento de SIRT1 possivelmente regulando a quimiorresistência induzida | Chen H, 2017     |
| HeLa, HepG2, Exsomas e RNA exossomal                               | Rt-qPCR e Western blot                                       | Transferência de Quimiorresistência        | Papel da SIRT1 na quimissensibilidade mediado por miR-106a/b           | Raji GR, 2017    |
| Células HeLa, RhoGDI $\alpha$ , K52-acetilado, E. coli BL21 (DE3). | Microscopia Eletrônica                                       | Bloqueio da proliferação celular           | o AcK52 de RhoGDI é fortemente desacetilado pela Sirt2                 | Kuhlmann N, 2017 |
| Cultivo de células HeLa e controle CPH059                          | Western blot                                                 | Efeito do Vosaroxin como agente anticâncer | SIRT3 como via de ação citotóxica da Vosaroxina                        | Zhao XL, 2018    |
| Espécimes de Câncer Cervical, HeLa                                 | Rt-PCR e Western Blot                                        | Função do miR138-5p no Câncer Cervical     | Indução de apoptose via SIRT1                                          | Ou L, 2018       |
| Cultura de HeLa e Sila                                             | qPCR, Western blots e Imunofluorescência                     | Quimiorresistência no câncer cervical      | O bloqueio da SIRT1 diminui a expressão de MRP                         | Xia X, 2018      |

|                                                                    |                                       |                                                        |                                                                       |                 |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|
| HeLa, SiHa, LC31, LC311, Beclin-1, Desacetilase SIRT3, Proline7.   | Western Blot                          | Propriedades antineoplásicas da Metformina +Nelfinavir | Aumento de SIRT3/mROS na autofagia celular tumoral                    | Xia C, 2019     |
| HeLa, Amostras de Câncer Cervical, NICs e Amostras cervical normal | Imunohistoquímica                     | Expressão da SIRT2, Bloqueio da proliferação celular   | Bloquear SIRT2 inibe a proliferação celular no Câncer Cervical        | Chen J, 2019    |
| HeLa, SeHa, HepG2, MCF-7, HCC, Ratos Nude                          | qRT-PCR                               | Inibição de proliferação celular pelo Piruvato         | Piruvato reprime cells de CC e Pulmão pela via NAD <sup>+</sup> SIRT1 | Ma R, 2020      |
| SiHa, C33a                                                         | qRT-PCR, Microscopia de Fluorescência | SIRT3 na síntese lipídica no Câncer Cervical           | Regulação de ácidos graxos em células de Câncer Cervical pela SIRT3   | Xu LX, 2020     |
| HeLa, EX-527                                                       | Fluorescência, RT-PCR, Western Blot   | Papel da SIRT1 na tumorigênese                         | Novos Tiocianatos inibiram SIRT1                                      | Wössner N, 2020 |

**Tabela 3.** Evolução temporal do papel das Sirtuínas na carcinogênese do câncer do Colo do Útero. Principais autores, achados e técnicas utilizados.

Um estudo que observou as proteínas E7 do HPV 16, concluiu que essas proteínas são responsáveis pela sobrevivência de células do câncer cervical em espécimes SiHa, demonstram que a SIRT1 medeia a elevação das proteínas E7 neste espécime. Por outro lado, o silenciamento da E7 regula para baixo a SIRT1, causando acentuada concentração de P53. Ficou estabelecido que a SIRT1 é uma via pró-tumorigênese independente do P53. Assim, os autores seguiram mostrando que níveis elevados de SIRT1 reduzem a capacidade pró-apoptótica do P53 por meio de sua desacetilação. A partir deste trabalho a SIRT1 ganha um protagonismo como via pro-tumorigênese através da proteína E7 (ALLISON; JIANG; MILNER, 2009).

A expressão da SIRT1 também é vista em um estudo que demonstra, uma correspondência da expressão da SIRT1, conforme o grau de agressividade das displasias induzidas por HPV na cérvix uterina. Os autores apontam para um possível potencial dessa sirtuína como marcador de progressão de lesões do colo uterino para câncer, especificamente como marcador de replicação do HPV 16. Assim, concluem que silenciar a SIRT1 pode-se evitar a progressão deste tumor (VELEZ-PEREZ *et al.*, 2017).

Outro estudo experimental, realizado *in vivo* e *in vitro*, investigou o papel da SIRT1 na replicação do HPV 16, e demonstraram que ela faz parte deste complexo, além de poder regulá-lo. Os autores também chamam atenção para o potencial papel terapêutico da SIRT1 no tratamento de doenças causadas pelo HPV 16, reforçando ainda mais o protagonismo desta sirtuína no câncer cervical (DAS, D. *et al.*, 2017).

A quimioterapia é uma das formas de tratamento do câncer do colo uterino, e a Doxorubicina, droga frequentemente usada em associação com derivados de platina. A quimiorresistência é uma das causas de falhas desse tratamento e consequente óbito dos pacientes. Chen H. *et al* estudando a quimiorresistência induzida por catecolaminas em células de CCU, demonstram que o knockdown da SIRT1 bloqueia os efeitos da acetilação do P53 induzidos pela Doxorubicina. Assim, a SIRT1 também pode ser alvo a fim induzir de quimiorresistência, utilizando exomas de células de câncer quimiorresistente, autores induziram quimiorresistência em células HeLa (RAJI *et al.*, 2017).

Além da SIRT1, as SIRT2 e 3 também podem ser alvos terapêuticos promissores. A SIRT2, conforme demonstrou Kuhlmann, N. *et al* em 2017, pode interferir na proliferação celular ao desacetilar a proteína Rho do complexo de proteínas Ras, conhecido oncogene. No caso da SIRT3, em estudo (ZHAO, E. *et al.*, 2019) sobre o efeito

citotóxico do Vosaroxin, um quimioterápico derivado das quinolonas, concluiu-se que uma via de atuação é através do knockdown desta Sirtuína.

Em 2018, Ou L *et al* , estudando o papel dos miRNAs na carcinogênese do CCU reafirmam o potencial terapêutico da SIRT1 ao verificar que a superexpressão do miR 138-5p reduziu a proliferação em células neste tumor ao reduzir a atividade da SIRT1. No entanto os autores trabalham com amostras pareadas de tecido tumoral de paciente ainda sem tratamento, com amostras da cérvix normal, não estando claro na descrição metodológica como essas amostras foram obtidas, visto que os graus avançados (FIGO – IIb, IIIa) indicam a destruição da cérvix pelo tumor.

Neste mesmo ano Xia X. *et al*, estudando a quimiorresistência no câncer cervical, demonstraram que a concentração de SIRT1 é maior nas amostras tumorais quimioresistentes e que seu bloqueio diminui as MRP (multidrug resistance- associated proteins).

Uma via natural de combate à tumorigênese é o estímulo da autofagia celular. Nesse processo, os autores investigam se a indução da autofagia de células tumorais no câncer cervical induzidos por drogas retrovirais e a Metformina, verificaram uma via de facilitação desse processo através da SIRT3 (XIAO *et al.*, 2020). A SIRT2, que é expressa conforme a proliferação de células tumorais se regulada para baixo, bloqueia a proliferação celular. Mas por vias ainda pouco conhecidas (CHEN, G.;2020).

Reiteradamente, a SIRT3 é apontada também como um potencial alvo terapêutico. Assim foi em trabalho experimental onde os autores demonstram o papel dessa proteína na regulação da síntese de ácidos graxos, principal fonte de energia do câncer (Efeito Warburg) e que tem papel fundamental no crescimento, surgimento de metástases e resistência ao tratamento (XU *et al.*, 2020).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 População de Estudo

Elaboramos um estudo que propõe acompanhar mulheres com diagnóstico de lesão do colo do útero, com indicação de biópsia, virgem de tratamento, no Hospital das Clínicas/UFPE, no Ambulatório de Tumores Ginecológicos. Seguimos com aprovação de parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, conforme Anexo I. A amostra desse estudo foi composta por demanda espontânea, de mulheres que procuram o Serviço de Tumores Ginecológicos com indicação de biópsia ou já com hipótese diagnóstica CCU. A mulher com requisito para participação no estudo foi convidada a colaborar, explicando a necessidade de retirar a amostra, sendo apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO II) para concordância na participação, mediante assinatura. O registro dos dados clínicos realizado em formulário próprio, identificado sequencialmente por ordem numérica, e preenchido com dados de identificação da paciente, dados clínicos relacionados à patologia, antecedentes, presença de doenças crônicas, e o estadiamento, bem como seguimento clínico (ANEXO III).

### 4.2 Coleta de Amostras

A amostragem de espécimes dos tumores foi composta por biópsia com Pinça de Faure para Biópsia, que é capaz de obter 1cm<sup>3</sup> de tecido, a fim de padronizar a quantidade de tecido amostral. Após a coleta, o espécime conservado em Trizol (Invitrogen, USA) para garantia de preservação do RNA. Coletado e conservado, o material foi encaminhado ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA para processamento e análise. Na sequência, após a biópsia da lesão suspeita, uma amostra de sangue também é obtida, coletando 2 ml de sangue periférico em frasco coletor contendo 2 ml de RNA Later.

### 4.3 Tratamento da amostra

O RNA genômico foi extraído do tecido fresco seguindo o protocolo do Trizol (Invitrogen, USA). Fragmentos de 50–100 mg tecido, que foram mantidos em 1 mL de TRIzol, foram centrifugados por 5 minutos a 12.000× 4°C. Após a centrifugação, o material foi incubado por 5 minutos para a dissociação de complexo de nucleoproteínas, e posteriormente foi adicionado 200µL de clorofórmio para lise celular. O material foi incubado por 2–3 minutos e então centrifugado por 15 minutos a 12,000×g a 4°C. A fase aquosa superior contendo o RNA

foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado 500µL de isopropanol. O material foi incubado por 10 minutos e centrifugado a 12.000×g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1ml de álcool 75%, e centrifugado por 5 minutos a 7.500×g a 4°C. O sobrenadante foi descartado, seco e ressuspensionado com 50 µL de água ultrapura. O material resultante foi armazenado a -80°C até a análise, quando foi quantificado em NanoDrop ND-1000 (NanoDroptecnologias; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com o kit QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, USA), utilizando 2µL de gDNA Wipeout Buffer, 7x mais 12µL da amostra de RNA, incubar a 42°C por 2 minutos e imediatamente após a incubação, colocar o mix no gelo. Na segunda etapa utilizamos 1µL de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4µL de Quantiscript RT Buffer, 5x, 1µL de RT primer mix e 14µL da mistura de RNA e gDNA Wipeout Buffer 7x. As condições de ciclagem para a segunda etapa foram: 42°C por 15 minutos, 95°C por 3 minutos. A etapa de ciclagem foi realizada no Applied Biosystems™ Veriti™. Todas as amostras de cDNA foram quantificadas em NanoDrop® – 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) antes de serem realizadas as análises da qPCR (PCR quantitativo).

#### 4.4 Análise de expressão gênica

A análise por PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOne Plus™ (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados foram fabricados e fornecidos pela IDT (Integrated DNA Technologies) são eles *SIRT1* (*Hs.PT.58.40790669*) e *SIRT5* (*Hs.PT.58.38597405*). Os *primers* do gene de referência (beta-actina) foram sintetizados pela Exxtend, a partir das sequências fornecidas (*Fw*: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3' e *Rv*: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'). Para a reação de qPCR dos genes alvo foi utilizado o kit SyBr® Green Master Mix (Promega, USA) com volume final da reação de 10µL, contendo: 5µL de SYBR, 0,1µL do *primer*, 0,1µL de CXR (Carboxy-X-Rhodamine), 3,8µL de água e 1µL de cDNA (100ng). Para a análise do gene de referência β-actina, foi utilizado o volume final da reação de 10µL: 5µL de SYBR, 0,1µL do *primer forward* e 0,1µL do *primer reverse*, 0,1µL de CXR, 3,7µL de água e 1µL de cDNA (100ng). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. A curva de *melting* foi realizada no final da reação em um estágio de 60-95°C.

As curvas de dissociação foram geradas para garantir que apenas um produto foi amplificado (*melting curve*). A expressão gênica foi analisada através dos valores de  $\Delta C_t$  ( $C_{t\text{ alvo}} - C_{t\text{ } \beta\text{-actina}}$ ), no qual valores mais altos indicam menor expressão gênica.

#### 4.5 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste exato de Fisher foi utilizado para dados categóricos e, Mann-Whitney foi utilizado para dados numéricos. O nível de significância de todos os testes foi definido em  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ARTIGO 1 - SIRT1 and SIRT5 can be involved in chemoradiotherapy response in cervical cancer

#### Capítulo 1

Cancer Genetics. ISSN: 2210-7762

Qualis Capes B2

Impact Factor: 2.762

Status: Submetido

#### **SIRT1 and SIRT5 can be involved in chemoradiotherapy response in cervical cancer**

Iolanda Matias Gomes<sup>1,#</sup>, ORCID 0000-0002-1048-7292

Ananda Cristina Fernandes de Aguiar<sup>2,#</sup>, ORCID 0000-0002-8441-9786

Maria Luíza Silva de Moura<sup>2</sup>,

Andrea Amâncio Pires de Carvalho Silva<sup>1</sup>, ORCID 0000-0003-4512-5272

Penélope Rodrigues Araújo<sup>1</sup>, ORCID 0000.0001.5074.1518

José Luiz de Lima Filho<sup>2,3</sup>, ORCID 0000-0003-0897-7775

Danyelly Bruneska Gondim Martins<sup>2,3,\*</sup> ORCID 0000-0002-6005-7864

#### Filiation

1 Clinical Hospital - Federal University of Pernambuco - Recife - PE, Brazil

2 Laboratory Keizo Asami of Immunopathology - Federal University of Pernambuco - Recife - PE, Brazil

3 Biochemistry Department - Federal University of Pernambuco - Recife - PE, Brazil

# both authors contributed equally

\*Correspondence: Danyelly Bruneska Gondim Martins

[bruneska@prospecmol.org](mailto:bruneska@prospecmol.org)

Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol), Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

## Abstract

Cervical cancer is a worldwide health problem, and to achieve a good treatment outcome it is necessary to understand better about the role of molecules in chemoradiotherapy resistance. Epigenetic modifications in the neoplastic cells can change the response to the chemoradiotherapy, and the sirtuins can be involved in the therapy outcome. They have a role in stress response, cell survival, aging and carcinogenesis through deacetylation of various substrates. Therefore, we investigated gene expression of SIRT1 and SIRT5 in cervical cancer patients, naive for chemoradiotherapy. A total of 40 patients were enrolled in this study, of which 84.21% underwent chemoradiotherapy. SIRT1 mRNA expression was related to aging, while SIRT5 was significant in tumour grade among CRT-sensitive patients. Our findings highlight the importance of evaluating SIRT1 and SIRT5 expression in cervical cancer, once they can be involved in chemoradiotherapy response.

**Keywords:** Cervical Cancer, SIRT1, SIRT5, chemotherapy, radiotherapy

## INTRODUCTION

Cervical cancer is a potentially lethal disease and is the fourth most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women, with an estimated 604,000 new cases and 342,000 deaths worldwide in 2020 [1]. Human papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer, starting with a sexually transmitted infection. The HPV high-risk genotypes are associated with precancerous or cancerous lesions [2], but vaccination was proven to reduce the cervical cancer incidence [3].

The annual cost for treating a cervical cancer patient can vary according to the state health system and incidence. In Brazil, from the societal perspective, the estimated total costs of the prevention and treatment of cervical cancer amounted to USD \$1,321,683,034 taking account procedures, visits, transportation and productivity losses [4]. The mortality is higher in white women living in Southeast and Northeast, aged between 50 and 59 years old [5].

Concomitant platinum-based chemotherapy and radiotherapy (CRT) has been the standard treatment of locally advanced cervical cancer since 1999 [6], although a great

percentage relapse. CRT-resistance was already observed at a high rate of 40 to 60%, and the molecular implications of this mechanism need to be evaluated [7–9].

The epigenetic behavior of some proteins seems to show the possibility of a tumor's resistance to treatment. The sirtuins molecules are part of this scenario, representing a family of NAD<sup>+</sup> dependent deacetylase. Although they were primarily correlated with aging, sirtuins regulate different types of cancer-relevant mechanisms, such as the Warburg effect, angiogenesis, autophagy, genome stability, oxidative stress and others [10,11].

Among the seven sirtuins, sirtuin 1 (SIRT1) has a highlight for being a cytoplasmic deacetylase that has a role in most cancers, both acts as cell protector and as cancer promoter [12]. It also plays a critical role in cancer drug resistance by decreasing drug penetration, allowing proliferation and antiapoptotic survival advantages to cancer cells, facilitating acquireance of resistance through genetic mutations, promoting the survival of cancer stem cells, and changing the tumor microenvironment for resistance [13].

On the other hand, the mitochondrial SIRT5 is involved in the urea cycle, glycolysis,  $\beta$ -oxidation or ketogenesis. This sirtuin has been implicated in some cancers such as non-small cell lung, hepatocellular carcinoma, colorectal carcinoma and breast cancer [14]. SIRT5 can also contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer [15].

Regardless, the role of these two sirtuins is not well understood in cervical cancer and CRT-resistance. In this work, we evaluated the gene expression of SIRT1 and SIRT5 in cervical samples from patients naive for chemoradiotherapy.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

This cross-sectional cohort study, conducted with 40 women attended at the Hospital das Clínicas - UFPE, aged between 19 and 79 years, diagnosed with cervical lesion, with indication for biopsy and treatment-free. Neoplastic tissue samples were obtained during the surgical procedure. Factors such as age, alcoholism, smoking, parity, chemotherapy, obesity and others were categorized in a binary way. Clinical data were collected from patients' medical records.

### **Chemoradiotherapy conditions**

Patients with neoplastic tissue greater than 4 cm underwent chemoradiotherapy. The patient receives a weekly dose of external radiation, and chemotherapy with an infusion of Cisplatin - 40mg/m<sup>2</sup> (per body area). Afterwards, the patient receives a weekly dose of 180

cGy radiation via the vaginal route, a Brachytherapy in 3 to 4 sessions, depending on the patient's tolerance.

### **Patient's sample collection and processing**

After characterizing the patients, tumor tissue samples were collected and kept in Trizol (Invitrogen, USA) for RNA preservation, kept refrigerated at -80°C. Total RNA was extracted from fresh tissue following the Trizol protocol (Invitrogen, USA). The eluted material was stored at -80°C until analysis, when it was quantified in NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). cDNA synthesis was obtained with QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, USA), and quantified on NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

### **Analysis of gene expression**

Real-time PCR analysis was performed on the StepOne Plus™ equipment (Applied Biosystems), using SIRT1 (Hs.PT.58.40790669) and SIRT5 (Hs.PT.58.38597405), supplied by IDT (Integrated DNA Technologies). Beta-actin gene was used as reference (Fw 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3' and Rv 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'). The qPCR assay was performed using the SyBr® Green Master Mix kit (Promega, USA). The dissociation curves were generated at the end of the reaction to ensure assay specificity. Gene expression was analyzed using the values of  $\Delta Ct$ .

### **Statistical analysis**

Analyzes were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Fisher's exact test and Test T paired were used for categorical data and Mann-Whitney was used for numerical data. The significance level of all tests was defined as  $p$ -value < 0.05.

## **RESULTS**

### **Clinicopathological characterization**

A total of 40 patients were enrolled in this study, 82.50% had undergone treatment with chemotherapy and radiotherapy. Among all patients, the mean age was 47 years, varying from 27 years to 79 years (**Table 1**). The majority of patients were aged over 40 years and had pregnancy history. This pattern is well-established once, although HPV infection has an

incidence peak between 15 and 25 years, women aged 50-70 years show worse prognostic to disease stage, histology, race and treatment response compared to women aged 20-49 years [16]. A high pregnancy rate was already proposed as a risk factor for cervical cancer, in a multicenter cohort [17]. Regarding smoking, there is a relationship with HPV infection, contributing to the development of cervical cancer [18]. However, this factor was poorly represented in our study group with only 22.50% smokers. Although we found 30% of the patients reported alcohol intake, it was not significant as observed in a study carried out in India in which history of alcohol intake was considered a risk factor for the development of cervical cancer [19]. Regarding comorbidities, 5% of the patients had diabetes mellitus, while 15% had arterial hypertension.

Regarding body mass index (BMI), most of SCC's patients (37.5%) showed BMI values of 18.5 to 24.9, indicating health weight. Although a study conducted in the United States showed women that the rate of development of cervical cancer increased with increasing BMI [19], the majority of the patients in our study showed normal BMI. Cervical tumor cell signaling through the PI3K / AKT pathway was already showed to be distinct in obese and non-obese patients. This difference was associated with the response to simultaneous standard-of-care chemoradiation [20], but it was not investigated in our study group.

Of the total recruited, ten patients did not follow the hospital attendance due to different events. Seven patients (17.5%) showed CRT-resistance, while 23 patients (57.5%) were successfully treated, grouped as CRT-sensitivity. This resistance rate is in the ranges of 8–26%, of which 89–99% showed relapse within 5 years [21].

### **SIRT1 and SIRT5 gene expression in cervical cancer**

Sirtuins are involved in aging and aging-related diseases through different pathways of signaling, such as cancer [22]. SIRT1 mRNA expression was observed in 87.5% (35/40) patients. Regarding SIRT5, 67.5% (27/40) showed mRNA expression, and 5% (2/40) showed inconsistent expression data. Our analysis showed no correlation between the studied sirtuins and BMI, contraceptive use, tobacco use, alcohol use, diabetes mellitus or hypertension. The SIRT1 mRNA expression profile according to aging showed to be decreased in elderly group (**Figure 1A**); while SIRT5 mRNA expression showed a slight increase according to aging, but without significance (**Figure 1B**). The SIRT1 mRNA expression was similar among histological grades, but slightly different between grades 2 and 3 for SIRT5 mRNA expression, but without significance ( $p=0.0730$ ). In many cancers, SIRT1 expression is associated with higher tumor stage [23]. It was also observed in both preneoplastic squamous intraepithelial

lesions and squamous cell carcinoma (SCC), using IHC analysis in Indian and American patients [24,25]. In CRC patients, SIRT5 expression was associated with tumor size, lymph node metastasis, and tumor stage, but not related to histological grade or distant metastasis [26].

The singular analysis of SIRT1 and SIRT5 mRNA expression did not show significance in CRT response. Although the patient's age showed no correlation with SIRT1 mRNA expression, we observed a reduced expression according to aging in the CRT-sensitivity group, but without significance (**Figure 1C**). It indicates that beyond the SIRT1 correlation with aging, it may be also affecting the CRT efficiency in cervical cancer. SIRT1 was shown to be involved in the immune system modulation and cisplatin response [27,28]. It is able to regulate the function of IL-17 producing CD4 T helper cells, by modulating the activity of the Th17 [29], cells that would promote CRT-resistance in cervical cells through the AKT signaling pathway [30].

By another hand, among the few patients that showed SIRT5 mRNA expression we observed a trend of positive correlation with aging in the CRT-resistance group (**Figure 1D**), but without significance. It suggests that SIRT5 levels could also be involved in cervical cancer treatment efficiency in elderly, but this profile needs to be evaluated in a larger study group. In ovarian cancer, SIRT5 was already related to cisplatin resistance, through suppression of cisplatin-induced DNA damage in a ROS-dependent manner [15]. In colorectal cancer cells, it promotes glutamine anabolic metabolism and inhibits cellular antioxidant response, being associated with proliferation and survival [26]. Although little is known about the role of SIRT5 mRNA expression in cervical cancer cells, its expression and behaviour could be similar to observed in other related tissues.

Smoking habits showed no effect in SIRT1 or SIRT5 mRNA expression when therapy response was evaluated. However, SIRT5 mRNA expression showed to be related to histological grade in the CRT-sensitive group (**Figure 1E**). The study of SIRT5 in other gynecological cancers did not show correlation between SIRT5 and histological grade. However, upregulation was notably associated with favorable overall survival in ovarian serous cancer, but not in patients with endometrioid cancer [31].

Our results should be interpreted as a highlight of the importance of evaluating the role of sirtuins in chemoradiotherapy in cervical cancer. Despite the limited number of patients, our findings indicate these molecules as potential modulators in cervical cancer treatment, combined with the patient's aging. Further studies should elucidate the sirtuins profile along the cancer treatment and determine the impact in cellular response.

### **Ethics declarations**

This study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki regarding ethical principles for medical research involving human subjects. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco - Plataforma Brasil (Ministry of Health) CAAE: 35626514.5.0000.5208.

### **Conflict of interest**

The authors have no conflict of interest to disclose regarding this manuscript.

### **Author contributions**

IMG, PRA and AAPCS contributed to sample collection and data acquisition. MLSM and ACFA performed experimental work and analyses. IMG and ACFA contributed to data analysis and manuscript editing. DBGM and JLLF designed the study, contributed to analysis and interpretation of the results, manuscript final edition approval. All authors read and approved the final manuscript.

### **Financial support**

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Ciência de Pernambuco.

### **REFERENCES**

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.<https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342–50. <https://doi.org/10.1038/nrc798>.
- [3] Lei J, Ploner A, Elfström KM, Wang J, Roth A, Fang F, et al. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2020;383:1340–8.<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917338>.

- [4] Novaes H, Itria A, Silva G, Sartori A, Rama C, Soárez P. Annual national direct and indirect cost estimates of the prevention and treatment of cervical cancer in Brazil. *Clinics* 2015;70:289–95. [https://doi.org/10.6061/clinics/2015\(04\)12](https://doi.org/10.6061/clinics/2015(04)12).
- [5] Dantas DB, da Luz Costa T, Alves da Silva AS, de Campos Gomes F, de Melo-Neto JS. Mortality from cervical cancer in Brazil: an ecological epidemiologic study of a 22-year analysis. *Ecancermedicalscience* 2020;14:1–12. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1064>.
- [6] Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy and Chemotherapy for Locally Advanced Cervical Cancer. *N Engl J Med* 1999;340:1144–53. <https://doi.org/10.1056/NEJM199904153401502>.
- [7] Topuz S, Kaban A, Küçük S, Salihoglu Y. Is Surgical Treatment an Option for Locally Advanced Cervical Cancer in the Presence of Central Residual Tumor after Chemoradiotherapy? *Rev Bras Ginecol e Obstet* 2020;42:35–42. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1701459>.
- [8] Gupta S, Maheshwari A, Parab P, Mahantshetty U, Hawaldar R, Sastri S, et al. Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Radical Surgery Versus Concomitant Chemotherapy and Radiotherapy in Patients With Stage IB2, IIA, or IIB Squamous Cervical Cancer: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* 2018;36:1548–55. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.9985>.
- [9] Vale C, Tierney JF, Stewart LA, Brady M, Dinshaw K, Jakobsen A, et al. Reducing Uncertainties About the Effects of Chemoradiotherapy for Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data From 18 Randomized Trials. *J Clin Oncol* 2008;26:5802–12. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.4368>.
- [10] Costa-Machado LF, Fernandez-Marcos PJ. The sirtuin family in cancer. *Cell Cycle* 2019;18:2164–96. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1634953>.
- [11] Guarente L. The Many Faces of Sirtuins: Sirtuins and the Warburg effect. *Nat Med* 2014;20:24–5. <https://doi.org/10.1038/nm.3438>.
- [12] Lin Z, Fang D. The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes Cancer* 2013;4:97–104. <https://doi.org/10.1177/1947601912475079>.

- [13] Wang Z, Chen WY. Emerging Roles of SIRT1 in Cancer Drug Resistance. *Genes and Cancer* 2013;4:82–90. <https://doi.org/10.1177/1947601912473826>.
- [14] Zhao E, Hou J, Ke X, Abbas MN, Kausar S, Zhang L, et al. The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 2019;11:1949.<https://doi.org/10.3390/cancers11121949>.
- [15] Sun X, Wang S, Gai J, Guan J, Li J, Li Y, et al. SIRT5 Promotes Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer by Suppressing DNA Damage in a ROS-Dependent Manner via Regulation of the Nrf2/HO-1 Pathway. *Front Oncol* 2019;9:1–16.<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00754>.
- [16] Quinn BA, Deng X, Colton A, Bandyopadhyay D, Carter JS, Fields EC. Increasing age predicts poor cervical cancer prognosis with subsequent effect on treatment and overall survival. *Brachytherapy* 2019;18:29–37.<https://doi.org/10.1016/j.brachy.2018.08.016>.
- [17] Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1093–101. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08151-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08151-5).
- [18] Nagelhout G, Ebisch RM, Van Der Hel O, Meerkerk G-J, Magnée T, De Bruijn T, et al. Is smoking an independent risk factor for developing cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer? A systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2021;21:781–94. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1888719>.
- [19] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>.
- [20] Grigsby P, Elhammali A, Ruiz F, Markovina S, McLellan MD, Miller CA, et al. Clinical outcomes and differential effects of PI3K pathway mutation in obese versus non-obese patients with cervical cancer. *Oncotarget* 2018;9:4061–73.<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23664>.
- [21] Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: A systematic review. *Gynecol Oncol* 2009;114:528–35. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.06.001>.

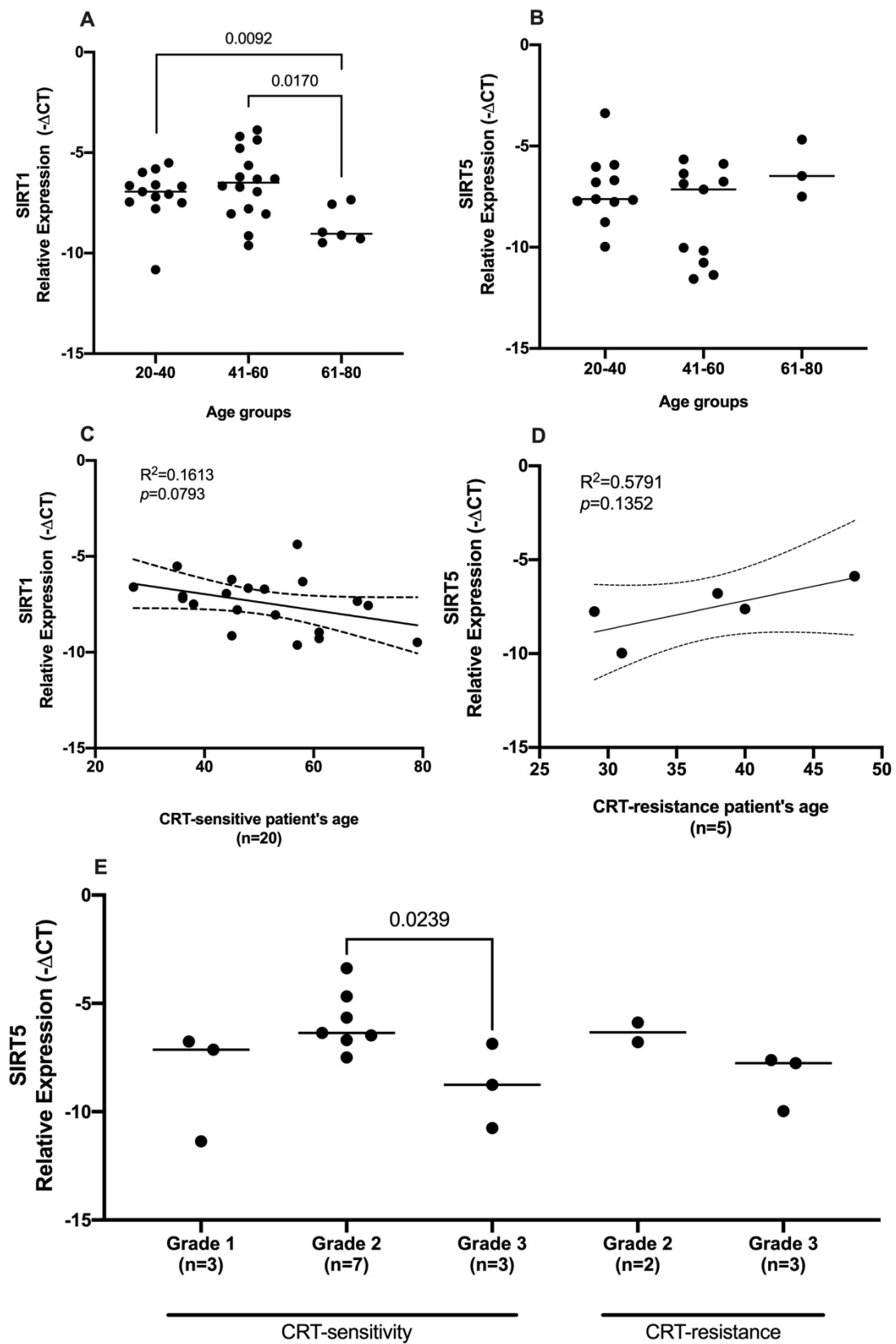
- [22] Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:608–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3985>.
- [23] Sun M, Du M, Zhang W, Xiong S, Gong X, Lei P, et al. Survival and Clinicopathological Significance of SIRT1 Expression in Cancers: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00121>.
- [24] Singh S, Kumar PU, Thakur S, Kiran S, Sen B, Sharma S, et al. Expression/localization patterns of sirtuins (SIRT1, SIRT2, and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. *Tumor Biol* 2015;36:6159–71. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3300-y>.
- [25] Velez-Perez A, Wang XI, Li M, Zhang S. SIRT1 overexpression in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2017;59:102–7. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.09.019>.
- [26] Wang Y-Q, Wang H-L, Xu J, Tan J, Fu L-N, Wang J-L, et al. Sirtuin5 contributes to colorectal carcinogenesis by enhancing glutaminolysis in a deglutarylation-dependent manner. *Nat Commun* 2018;9:545. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02951-4>.
- [27] Liang X, Finkel T, Shen D, Yin J, Aszalos A, Gottesman MM. SIRT1 Contributes in Part to Cisplatin Resistance in Cancer Cells by Altering Mitochondrial Metabolism. *Mol Cancer Res* 2008;6:1499–506. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2130>.
- [28] Mourits VP, Helder LS, Matzaraki V, Koeken VACM, Groh L, de Bree LCJ, et al. The role of sirtuin 1 on the induction of trained immunity. *Cell Immunol* 2021;366:104393. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104393>.
- [29] Lim HW, Kang SG, Ryu JK, Schilling B, Fei M, Lee IS, et al. SIRT1 deacetylates ROR $\gamma$ t and enhances Th17 cell generation. *J Exp Med* 2015;212:607–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20132378>.
- [30] Theobald L, Stroeder R, Melchior P, Iordache II, Tänzer T, Port M, et al. Chemoradiotherapy-induced increase in Th17 cell frequency in cervical cancer patients is associated with therapy resistance and early relapse. *Mol Oncol* 2021:1–19. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13095>.

- [31] He Q, Chen K, Ye R, Dai N, Guo P, Wang L. Associations of sirtuins with clinicopathological variables and prognosis in human ovarian cancer. *Oncol Lett* 2020;19:3278–88. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11432>.

**Table 1.** Characterization of cervical cancer patients involved in the study.

| Variables             | Squamous Cell Cancer |                  | <i>p</i> -value |
|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------|
|                       | CRT- resistance      | CRT- sensitivity |                 |
| Age                   |                      |                  |                 |
| < 40                  | 03                   | 06               | 0.6424          |
| >40                   | 04                   | 17               |                 |
| Diabetes Mellitus     |                      |                  |                 |
| Yes                   | 01                   | 01               | 0.4017          |
| No                    | 05                   | 20               |                 |
| NI                    | 01                   | 02               |                 |
| Arterial hypertension |                      |                  |                 |
| Yes                   | 02                   | 04               | 0.6119          |
| No                    | 05                   | 18               |                 |
| NI                    | 00                   | 01               |                 |
| Smoking habit         |                      |                  |                 |
| Yes                   | 01                   | 08               | 0.6296          |
| No                    | 05                   | 14               |                 |
| NI                    | 01                   | 01               |                 |
| Alcohol Intake        |                      |                  |                 |
| Yes                   | 04                   | 07               | 0.1741          |
| No                    | 02                   | 15               |                 |
| NI                    | 01                   | 01               |                 |
| Parity                |                      |                  |                 |
| ≤ 4                   | 04                   | 12               | >0.9999         |
| > 4                   | 03                   | 10               |                 |
| NI                    | 00                   | 01               |                 |
| Body mass index       |                      |                  |                 |
| Normal                | 04                   | 11               | >0.9999         |
| Altered               | 03                   | 11               |                 |
| NI                    | 00                   | 01               |                 |

Legend: CRT - chemoradiotherapy; NI - Not Informed



**Figure 1.** (A) Expression levels of SIRT1 according to the patient age. (B) Expression levels of SIRT5 according to the patient age. (C) Correlation between of SIRT1 mRNA expression

and age in Chemoradiotherapy-sensitivity group. **(D)** Correlation between of SIRT5 mRNA expression and age in Chemoradiotherapy-resistance group. **(E)** The relation of SIRT5 mRNA expression and histological grade in the CRT-sensitive group.

## 5.2 ARTIGO 2 - Epigenetics and Oxidative Stress Pathways as Modulators to Treatment Response in Cervical Cancer

### Capítulo 2

Clinical and Translational Oncology. ISSN: 1699-048X

Qualis Capes B1

Status: Em revisão.

### Epigenetics and Oxidative Stress Pathways as Modulators to Treatment Response in Cervical Cancer

Iolanda Matias Gomes<sup>1,2,§</sup>, Joana D'arc Rozendo dos Santos<sup>1,§</sup>, Glauber Moreira Leitão<sup>1,2</sup>; Luiz Alberto Reis Mattos Júnior<sup>2,3</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>1,4</sup>, Danyelly Bruneska Gondim Martins<sup>1,4</sup>.

1. Molecular Prospection and Bioinformatics Group, Laboratory Keizo Asami of Immunopathology, Federal University of Pernambuco - Recife, Brazil.
2. Hospital das Clínicas - Federal University of Pernambuco - Recife, Brazil.
3. Centro de Ciências Médicas - Federal University of Pernambuco - Recife, Brazil.
4. Departamento de Bioquímica, Federal University of Pernambuco - Recife, Brazil.

Correspondence: Danyelly Bruneska Gondim Martins

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

e-mail: bruneska@prospecmol.org

§ Both authors contributed equally to the study.

**The corresponding author's ORCID ID is the following:**

Iolanda Matias Gomes 0000-0002-1048-7292

Joana D'arc Rozendo dos Santos 0000-0001-7148-7635

Glauber Moreira Leitão 0000-0002-4178-1558

Luiz Alberto Reis Mattos Júnior 0000-0001-5626-8979

José Luiz de Lima Filho 0000-0003-0897-7775

Danyelly Bruneka Gondim Martins 0000-0002-6005-7864

## **Abstract**

Cervical cancer is one of the most important killers of women in developing countries. Failure to treat it is a challenge in reducing these deaths. Chemotherapy associated with fractional radiotherapy is the main form of treatment for this tumor, but some develop resistance to radiochemotherapy. Understanding the molecular mechanisms involved in chemoradioresistance may be the key to better clinical management of these tumors, optimizing the therapeutic decision, and improving the effectiveness of treatment, ultimately reducing deaths caused by cervical cancer. In this review, the authors present the main findings involving critical molecules in the process of this resistance, such as epigenetic molecules, Sirtuins, in addition to agents of oxidative stress. The authors that all efforts to understand these processes finally contribute to the substantial reduction of current mortality caused by the disease.

**Keywords:** Cervical cancer, epigenetics, oxidative stress, chemoresistance.

## **Introduction**

Cervical cancer has been the leading cause of death in countries with a low human development index [1]. This cancer has a different prognosis according to the histological type and molecular profile, and it can also be influenced by ethnicities [2]. Most cervical cancers are squamous cell or adenocarcinoma histological subtypes [3], which this last one shows a worse prognosis [4].

The main treatments of cervical cancer are surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy. The vast majority of patients with early-stage disease are treated with radical hysterectomy, and pelvic lymphadenectomy remains the standard curative treatment option [5]. The standard of care includes multimodality therapy of concurrent cisplatin-based chemoradiation for locoregionally advanced carcinomas of the uterine cervix [6]. Besides, after chemotherapy treatment, patients may develop drug resistance, which leads to treatment failure [7] (Figure 1).

Epigenetic modifications are responsible for the heritable changes in gene expression through non-coding RNA regulation, histone modifications (methylation,

phosphorylation, and acetylation), and DNA methylation. These changes can be reversible. Moreover, respond to natural bioactive dietary compounds [8]. The human papillomavirus (HPV), a well-known cause of cervical cancer, may facilitate the events of protein acetylation and deacetylation in cancer progression [9].

Sirtuins (SIRT6) are NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylases and ADP-ribosyltransferases. SIRT1, SIRT6, and SIRT7 can be mainly found in the nucleus, while SIRT3, SIRT4, and SIRT5 are restricted to the mitochondria. SIRT1 and SIRT2 have been found in the cytoplasm. These molecules play a role in cell proliferation, apoptosis, and tumor development [9] (Figure 2). They can participate in the carcinogenesis process, influencing the redox balance once reactive oxygen species (ROS) underly molecular mechanisms involved in all neoplastic stages [10] (Figure 3. A; B). This review aims to highlight the epigenetics and oxidative aspects of cervical cancer to contribute to understanding chemotherapy resistance in these tumors.

### **Sirtuins as therapeutic target**

Neoplastic cells carry oncogenic mutations that favor apoptosis through several mechanisms, including epigenetic silencing tumor suppressor genes. These genetic and epigenetic modifications that allow tumor cells to adapt and survive in a quiescent state in the target organ are poorly understood. The identification of signaling networks that allow the survival of dormant tumor cells and their ultimate growth in ectopic sites can be explored to treat metastatic cancer [11].

### **Nuclear sirtuins**

SIRT1 deacetylase is ubiquitously expressed. It is preliminarily located in the nucleus but can alternate between the nucleus and cytoplasm using its two nuclear localization signals (NLS) and two nuclear export signals (NES)[12]. SIRT1 appears to participate in a P53 independent managing stress signal, inducing cell growth arrest, senescence, or apoptosis, contributing to differentiation, DNA repair, and angiogenesis. In normal cells, p53 is activated under stress conditions, resulting in the transcription of the Hypermethylated gene in Cancer 1 (HIC1), a protein that represses the transcription of the SIRT1 gene, allowing p53 to remain in its acetylated and active form. However, during the early stages of tumor progression, upregulation of SIRT1 leads to deacetylation of p53 and impairment of its function. Therefore, up-regulated SIRT1 can lead to p53 inactivation,

impairment of its functions, and defective apoptotic response to DNA damage. Thus, it increases the rate of p53 mutation and cell cycle interruption, leading to an oncogenic environment [13].

The HPV16 E7 protein is responsible for the survival of cervical SiHa cancer cell lines. SIRT1 is a regulator of various aspects of the high-risk HPV life cycle, once multiple binding regions of the HPV genome in undifferentiated cells, though this association is lost upon differentiation [14]. SIRT1 can directly regulate HPV16 E1-E2-mediated DNA replication [15], being associated as a marker of HPV16 replication and related to the degree of aggressiveness of HPV-induced dysplasia in the uterine cervix. High levels of SIRT1 increase E7 protein levels and reduces the proapoptotic capacity of p53 [16]. On the other side, HPV E7 silencing downregulates SIRT1, increasing p53 concentration and inhibiting cell cycle deregulation [17].

The growth of cervical cancer xenografts has been critically slowed by siRNAs targeting SIRT1 or extracellular vesicles derived from SIRT1 knockdown [18]. In cancer therapy, SIRT1 has been linked to chemotherapy resistance. One study showed that SIRT1 expression could predict the efficacy of Cisplatin treatment for locally advanced uterine cervical cancer [19]. In HeLa cells, SIRT1 levels were shown to be 2-fold higher in cisplatin-resistant cells compared to cisplatin-sensitive cells [20].

The overexpression of SIRT1 has been related to cancer progression and the presence of metastases [14]. Furthermore, molecular events and biological processes mediated by SIRT1 may be an underlying mechanism for metastases, and SIRT1 is a therapeutic target for disrupting metastases [21]. These findings indicate that suppression of SIRT1 can prevent tumor progression and be explored as a therapeutic approach (Figure 1).

SIRT6 is also located in the nucleus [22] regulating the levels of acetylation and expression of some targets, regulating the cell cycle and the response to DNA damage [23]. It plays an important role in human cancers, as its mutants cannot repress glycolysis and cell transformation and alter its stability, location, or activity. Furthermore, cancer-associated SIRT6 mutations are unable to repress MYC-dependent transcription and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) [24]. SIRT6 overexpression is selectively cytotoxic to several cancer cell lines, but not to untransformed cell lines. In HeLa cells, p53 is targeted for degradation by the E6 oncoprotein, suggesting that an auxiliary apoptotic pathway mediates SIRT6-induced cytotoxicity in cancer cells. SIRT6 appears to promote apoptosis through p53 or p73 signaling and requires mutated ataxia-telangiectasia (ATM)

kinase to initiate this response, involved in the DNA damage response (DDR) as a sensor and signal transducer [25]. Low levels of SIRT6 have been linked to the progression of HPV18-induced Cervical Cancer . SIRT6 upregulation in some cancers appears to protect against chemotherapy-induced DNA damage [26].

Its inhibition of SIRT6 activates the p53 / p21-mediated apoptosis pathway and deregulates BCL-2 leading to the overexpression of BAX, which directly impacts apoptosis. It activates the caspase cascade genes 3, 8, and 9, deregulates the cyclin D1 genes and increases the level of ROS [27]. Although SIRT6 is a supposed target as a biomarker, the lack of adequate information about cervical cancer precludes its indication.

### **Nucleolar Sirtuin**

SIRT7 was first identified in the nucleolus, but has already been found in the cytoplasm [28]. SIRT7 regulates ribosomal RNA expression by activating RNA polymerase I, acting as an epigenetic regulator to maintain the characteristics of cancer cells [29].

SIRT7 responds to various elements of endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, mitochondrial protein folding stress, nutritional stress, and genotoxic stress. SIRT7 regulates rRNA and protein synthesis; both processes are reduced under stress conditions. The increased expression of SIRT7 represses NRF1, a regulator of mitochondrial ribosomal proteins (mRPs). SIRT7 also interacts with HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  proteins and down-regulates their expression, which mediates adaptation to hypoxia [29]. The silencing of HIF-1 $\alpha$  can decrease the expression of its downstream genes GLUT1 and HK II, reducing the activity of tumor glycolysis and promoting tumor cell apoptosis [30]. Suppression of HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  expression inhibits proliferation, induces G1 phase arrest, and promotes apoptosis in the cervical cancer cell line CaSki [31]. It can also reduce MUC1 expression levels, associated with a shorter disease-free survival and lymph node metastasis in cases of cervical adenocarcinoma [32]. MUC1 expression was increased in cells that acquired chemoresistance, both at transcriptional and post-translational levels, through stimulation of EGFR activation and nuclear translocation, increasing the ATP B1 binding cassette expression transporter (ABCB1) [33].

SIRT7 expression was directly correlated with squamous cell carcinoma, and its progressive increase in expression was observed in the cytoplasm of pre-neoplastic and carcinoma cases [34]. In other types of cancer, high levels may be associated with tumor

size, pathological grade, and metastatic lymph nodes. In the MDA-MB-231 breast cancer cell line, SIRT7 depletion significantly increased doxorubicin-induced phosphorylation of p38-MAPK, indicating that SIRT7 depletion increased the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic drugs [35].

SIRT7 efficiently deacetylates p53, as does SIRT1, and represses p53-mediated cell growth arrest and apoptosis in response to DNA damage and oxidative stress. SIRT7-deficient primary cardiomyocytes also showed a significant reduction in oxidative and genotoxic stress resistance, suggesting a critical role in regulating stress responses and cell death, but this mechanism is not well understood. Therefore, it is premature to suggest its potential as a biomarker for disease progression or a therapeutic approach.

### **Cytoplasmic sirtuins**

SIRT2 was found primarily in the cytoplasm, co-localized with microtubules, and deacetylates the significant component of microtubules,  $\alpha$ -tubulin. However, SIRT2 transiently migrates to the nuclei during the G2/M transition and modulates chromatin condensation during metaphase [36]. It shows a dual role as a tumor suppressor or promoter, with a differential expression pattern in human cancers [37]. SIRT2 improves cell energy metabolism and changes the alkaline environment through the deacetylation of lactic dehydrogenase (LDH), promoting lactic acid accumulation. In addition, it induces mitochondrial metabolism and inhibits the E-cadherin pathway to promote invasion. On the side, SIRT2 inhibits tumor cell growth, fibroblast activity, and the production of vascular endothelial growth factors [38].

SIRT2 was found to be down-regulated in tumor tissues, and its expression was negatively correlated with tumor size, lymph node metastasis, and stage. Furthermore, both disease-free and overall survival were more satisfactory in patients with high levels of SIRT2 expression in tumor tissue [39]. However, in other types of tumors, this protein has been associated with invasion, lymph node metastasis, and clinical tumor stage of development, as well as poor overall and progression-free survival [40]. This dual behavior precludes its use as a biomarker, and more data is needed before assuming this molecule as a good candidate in cervical cancer.

### **Mitochondrial sirtuins**

Mainly mitochondrial, the SIRT3 protein regulates ROS through Mn-SOD. ROS plays an essential role in the transformation of a tumorigenic phenotype and has been

associated with the promotion of mutagenesis and genomic instability [41]. SIRT3 is involved in the regulation of fatty acid synthesis and the Warburg Effect, pathways related to growth, appearance of metastases and resistance to treatment [40]. Loss of SIRT3 mediates metabolic reprogramming by destabilizing HIF1 $\alpha$ , a transcription factor that controls glycolytic gene expression. The SIRT3 gene is absent in 20% of all human cancers, in which the loss of SIRT3 increases the production of reactive oxygen species and leads to the stabilization of HIF1 $\alpha$  [42].

SIRT3 overexpression makes HeLa cells resistant to stress-mediated cell death and, together with SIRT1, has redundant functions to protect cells under stress conditions [43]. SiHa cells showed that SIRT3 could activate the AMPK / PPAR pathway, effectively promoting intracellular triglyceride synthesis and increasing their ability to migrate. Therefore, inhibiting SIRT3 activity in cervical cancer cells and reduced fatty acid synthesis could be a therapeutic approach to regulating cervical cancer invasion and metastasis [44]. It has also been observed that SIRT3 suppression by  $\beta$ -Catenin leads to regulation of glucose uptake and lactate production in cervical cancer cells that carry PIK3CA E542K and E545K mutations.

SIRT4 mitochondrial tumor suppressor can also act as an oncoprotein, depending on the tumor type, stage, and general biological context [45]. Its activity involves deacetylation and inhibition of malonyl-CoA decarboxylase (MCD), an enzyme whose inhibition increases the oxidative capacity of fat. SIRT4 inhibits pyruvate dehydrogenase activity, a critical enzyme that affects the entry of glucose into the tricarboxylic acid cycle. It represses glutamate dehydrogenase (GDH) activity, decreasing insulin secretion in response to amino acids [46]. In addition, it can also induce intracellular NADH and glutathione concentration to stabilize the redox balance and regulate the activity of some signal transduction systems, including mTORC1 signaling, the ERK pathway, and signaling associated with regulation of mitochondrial ROS production [47]. In addition to mitochondria, SIRT4 is also found in the cytosol, found in centrosomes, especially in early mitotic stages, interacting with microtubule components, in particular  $\alpha$ -tubulin. Its increased expression results in decreased levels of acetyl- $\alpha$ -tubulin, typically associated with decreased stability and altered dynamics of mitotic microtubules, which interfere with cell cycle and proliferation [48].

Reduced SIRT4 expression in bladder cancer has been associated with cisplatin resistance [49]. The knockout decreases the chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil or oxaliplatin by inhibiting apoptosis [50]. Further evaluation

in cervical cancer cells will determine how SIRT4 may contribute to tumorigenesis and chemoresistance and provide information for therapeutic purposes.

SIRT5 is predominantly a mitochondrial matrix protein with a well-defined mitochondrial localization sequence [51], but it has also been found in the cytoplasm [21]. It plays a crucial role in controlling cellular metabolic systems such as glycolysis, the tricarboxylic acid cycle, fatty acid oxidation, nitrogen metabolism, and the pentose phosphate pathway [52]. Furthermore, mitochondrial CXCR4/JAK2/SIRT5 signaling is responsible for angiogenic capacity [53].

Overexpression of SIRT5 promotes cell proliferation and resistance to cisplatin *in vitro*, while an inhibitory effect was observed on the downregulation of SIRT5. Cisplatin can modify ROS increasing in a concentration- and time-dependent manner. This scenario changes with the overexpression of SIRT5, which up-regulates NRF2 to bind to antioxidant responsive elements (ARE). It activates HO-1 transcription, eliminating cisplatin-induced ROS, leading to inhibition of DNA damage and then cisplatin resistance in ovarian cancer cells [21] and attenuated injury cisplatin-induced acute renal failure by NRF2 and BCL-2 activation [54]. The high expression of SIRT5 in hepatocellular carcinoma is related to tumor size, lymph node metastasis status, and tumor-node-metastasis stage [55]. However, the lack of knowledge about the role of SIRT5 in tumorigenesis and chemoresistance in patients with cervical cancer shows potential to be investigated for targeted therapy.

### **Oxidative stress in cervical cancer**

To maintain redox homeostasis, protective molecules called “antioxidant defenses” act to preserve the balance between formation and removal of free radicals, that are divided into two main groups: ROS and reactive nitrogen species (RNS) [56], and through having an unpaired electron (s) enable them to bind with their biologic targets, for example, DNA, proteins, and lipids resulting in their damage. Cellular antioxidative processes strictly regulate the free radical generation and activity [57], divided into enzymatic and nonenzymatic groups. The enzymatic group comprises catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx), and glutathione-S-transferase (GST). The nonenzymatic group comprises molecules such as vitamins C and E, lipoic acid, carotenoids, flavonoids, and others [58]. Some genes involved in the antioxidative process can also be implicated in tumorigenesis, as listed in Table 1.

Oxidative stress is a consequence of an imbalance between pro-and antioxidant factors for preventing injuries that can culminate in irreparable systemic damage and

diseases [59]. ROS-mediated oxidative damage of DNA and proteins results in genomic instability and cancer promotion. Oxidative stress is reported to be associated with cancers in general once altered levels of antioxidants and oxidative damage products have been found in patients with cervical cancer. It was also related to chemo and radioresistance [60].

Depending on the stage of the carcinogenesis process, certain levels of ROS can be beneficial once they trigger antioxidant defense and protect cells. High levels of ROS can induce apoptosis in cancer cells leading to decreased proliferation and viability. However, elevated ROS levels can trigger genotoxic effects, showing a dual role in carcinogenesis and the importance of this metabolism to cell behavior [61].

Several oxidative stress genes have been identified related to cancer treatment failure in cervical carcinomas. Decreasing or increasing oxidative stress through pharmacological agents leads to stability or sensitization, sequentially, in both cell lines, confirming the idea that cellular levels of oxidative stress influence responsiveness to treatment. Interestingly, doxorubicin (DOX) and cisplatin induces distinct profiles of ROS, and these variances result in differential sensitivity of cervical cancer cells to therapy [62]. Therefore, some molecules involved in the oxidative response in cervical cancer cells are shown in a protein network (Figure 4), evidencing HPV oncoprotein interference and also oncologic treatment.

### **SOD2 and SOD3**

Manganese superoxide dismutase (MnSOD), also called SOD2, protects the cells against oxidative stress. The superoxide radicals are eliminated after their conversion to water and oxygen [63]. SOD3 is the only secreted member of the SOD family, which are the primary antioxidant enzymes involved in regulating ROS [64]. These SODs utilize metal cofactors for catalyzing one-electron oxidation followed by one-electron reduction of two superoxides ( $O_2^{\bullet-}$ ) anions to form hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ , which is further reduced into water molecules by catalase and glutathione peroxidases [65]. SIRT3 protein was found regulating MnSOD activity through acetylation, interfering in ROS generation and oxidative stress [66].

The SOD isoform expression regulation is tightly controlled according to the cell and tissue types [64], and decreasing or increasing oxidative stress in a given cell can lead to different outcomes, providing a selective advantage to cancer development [67]. In CaSki and SiHa cell lines, oxidative stress leads to protection or sensitization, respectively.

It suggests that loss of redox regulator may promote a microenvironment that favors cancer progression and also supports the idea that cellular levels of oxidative stress affect responsiveness to treatment. SiHa cells, that express higher levels of SOD2 and SOD3, are more resistant to both doxorubicin and cisplatin treatment than CaSki cells [68].

### **NRF2, KEAP1, and, MBNL1**

The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2, NFE2L2), a transcription factor that plays a crucial role in cellular defense against electrophilic and oxidative stresses. This molecule is involved in the regulation of related stress-responsive proteins expression. It attaches to the antioxidant response elements (ARE) in the promoter regions of the target genes, regulating its expression [69]. Under basal conditions, NRF2 is repressed by a Kelch-like erythroid cell-derived protein with CNC homology [ECH]-associated protein 1 (KEAP1), which could induce the degradation of NRF2. On the other hand, under oxidative stress, NRF2 could be activated and regulate the expression of the related stress-responsive genes [70]. SIRT1 was shown to modulate NRF2-dependent antioxidant protein expression and regulates ABCG2 expression by deacetylating the transcription factor CREB (SIRT1/CREB/ABCG2 pathway), contributing to the cisplatin resistance [71]. SIRT2 has been conferred to deacetylate NRF2, occurring in a reduction in total and nuclear NRF2 levels, while SIRT6 has been demonstrated to coactivate NRF2 to protect human mesenchymal stem cells against oxidative stress [10]. Therefore, epigenetic events can contribute to the deregulation of the oxidative stress genes.

Gene mutations cause dysregulation of KEAP1/NRF2 signaling pathways [72] and aberrant expression [73]. Mutations within KEAP1/NRF2 are not universally a characterization across cancers but appear to interact with particular tumor driver mutations and tissues of origin [74]. This pathway might play an active role in the pathogenesis of cervical squamous cell carcinoma, observed through mutation in KEAP1 and NRF2 in cervical cancer [75]. This pathway can also be related to chemotherapy resistance. NRF2 was involved in ROS-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer through different mechanisms, including iron metabolism and apoptosis response. It was also related to chemoresistance to paclitaxel [76]. NRF2 was also reported as cisplatin resistance in bladder cancer [77] and lung cancer [78].

The importance of NRF2 can also be observed through the behavior of its targeted genes as Muscle blind-like (MBNL) proteins, which regulate alternative splicing in multiple organs. This molecule can also regulate the degradation of Nrf2 protein by

increasing the mRNA stability of Cul3, one of the proteins related to the polyubiquitination of specific target proteins. Therefore, MBNL can influence cisplatin resistance modulation in HeLa cells, reinforcing the role of oxidative stress in cancer cells therapy response [79].

### **BCL-2 and BAX genes**

Nrf2 regulation can be related to apoptosis, but different pathways regulate this event, and one of the best-characterized apoptosis regulators includes the antiapoptotic B cell lymphoma 2 (BCL-2) proapoptotic B-cell lymphoma 2-associated X (BAX) proteins. These proteins physically interact with each other, so their relative levels are important determinants of the apoptosis rate [80]. BCL-2 and BAX are under epigenetics regulation; once SIRT1 inhibition by siRNA grows, the quantity of BAX but reduced the quantity of BCL-2, while resveratrol (a polyphenol related to the activation of SIRT1) reduced the amount of BAX but increased the amount of BCL-2 proteins [81]. SIRT6 overexpression upregulates the expression of BCL-2 and decreased the expression of BAX in cancer cell culture, while a siRNA-mediated silencing of SIRT6 showed the opposite response [82].

Interestingly, SIRT1 and SIRT6 can interact with HPV and interfere in oxidative stress and apoptosis regulation. HPV infects epithelial tissue cells, which are heavily exposed to oxidative stress, promoting carcinogenesis and metastatic signaling. Thus, HPV and oxidative stress can act synergistically as two powerful cooperative mechanisms, inducing genomic instability separately to the generation of the molecular damage needed for the appearance of neoplastic clones; and interacting with one or more molecular stages of neoplastic initiation and progression induced by the HPV infection [83].

In cervical cancer, HPV E5 oncoprotein increases the degradation rate of BAX protein by proteasome-ubiquitin pathway. COX-2 induces Prostaglandin E2 (PGE2), which activates the expression of EP2 and EP4 (PGE2 receptors, G protein-coupled receptor subtypes), cAMP, and PKA, leading to BAX ubiquitination [84]. Besides, HPV E6 can also inhibit BAX activity through p53 degradation, which inhibits p53-dependent transcription of BAX [85]. In this way, HPV oncoproteins can modulate BAX, an apoptosis regulator that belongs to the intrinsic pathway, decreasing cell death and favoring cervical carcinogenesis.

BCL-2 apoptosis intrinsic pathway can be induced by ER stress and DNA damage, therefore plays a vital role in protecting against cancer. The activity of caspase-9 and caspase-3 is restrained by inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), which are released from damaged mitochondria. BCL-2 pro-survival protein seem to control the activation of

several upstream initiator of caspases, which produce damage to the organelles that amplify the proteolytic cascade [86]. Defects in apoptosis signaling directly contribute to tumorigenesis, then BCL proteins are vital players in apoptosis. BCL-2 protein expression was found less frequent in responders after successful cisplatin-based chemotherapy, while Bax protein expression was observed more frequently. It suggests that apoptosis via the p53–Bax pathway is associated with this therapy response in cervical cancer [87].

### **ABC transporters**

It is also essential to bring the ATP binding cassette (ABC) transporters for this evaluation, once they comprise seven subfamilies of membrane proteins that facilitate the transport and modulate the effects of an extensive scale of drugs and their metabolites [88]. Remarkably, overexpression of specific ABC transporters in cancer cell lines resulted in multidrug resistance (MDR) and a potential failure of chemotherapy [89]. The ABCC1 gene, also known as multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), contributed to doxorubicin resistance in cervical cancer [90]. ABCC1 expression in specific tumor cells confers hypersensitivity to glutathione modulating agents, potentializing oxidative stress in tumor cells through GSH efflux and the reductions of cellular GSH levels [91].

Afterward, ABC transporters use mitochondrial ATP as the primary energy source for drug efflux in chemoresistant cancer cells [92]. Doxorubicin is a substrate of different ABC transporters, including ABCB1 (also known as MDR1 or P-gp) and ABCC1, predominantly contributing to the MDR phenotype in cancer [93]. The survival number of patients among cervical cancer in the MDR1-negative group was significantly more significant than the MDR1-positive group [40]. ABCC1 showed a slight gene expression increase in HeLa cells after doxorubicin treatment [90]. Another member of this group may be complex in cancer treatment response. ABCC3 gene showed detectable levels in cervical cancer while was absent in normal cervical cells [94], indicating a role in oncogenesis, and suggesting more studies to understand its potential as a target to inhibit the chemoresistance in cervical cancer treatment. However, the undeniable importance of the ABC transporters in drug resistance, no evidence of epigenetic events related to Sirtuins was described for these molecules.

### **Conclusion**

The present review highlights the modulation of genes involved in epigenetics and oxidative stress of cervical cancer chemoresistance as a possible key for sensitivity

treatment recovery. A variety of studies had evaluated the behavior of these proteins in HeLa cells derived from the adenocarcinoma in an Afro-descendant woman, and SiHa derived from squamous cellular cancer from an Asian woman. Nevertheless, we do not have a molecular portrait of these molecules in certain ethnic groups in different populations. The understanding about how histological types evolve differently, in different ages and genetic backgrounds, can point out a therapy that works for all women or all types of cervical cancer. On the other hand, it strengthens the need to look at individualized treatments and develop therapies for cervical cancer.

### **Funding**

The work was conducted with the grant provided by Pernambuco Science and Technology Support Foundation (FACEPE) and Pernambuco, Brazil, and Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), Brazil.

### **Competing interests**

None.

### **References**

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. 2018;68:394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. American Cancer Society; 2020;70:7–30. Available from: <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
3. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2016;138:2795–803. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29959>
4. Jung EJ, Byun JM, Kim YN, Lee KB, Sung MS, Kim KT, et al. Cervical Adenocarcinoma Has a Poorer Prognosis and a Higher Propensity for Distant Recurrence Than Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Gynecologic Cancer* [Internet]. England; 2017;27:1228–36. Available from: <https://clsjournal.ascls.org/lookup/doi/10.1097/IGC.0000000000001009>

5. Ramirez PT, Frumovitz M, Pareja R, Lopez A, Vieira M, Ribeiro R, et al. Minimally Invasive versus Abdominal Radical Hysterectomy for Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. Massachusetts Medical Society; 2018;379:1895–904. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1806395>
6. Tewari KS, Monk BJ. Evidence-Based Treatment Paradigms for Management of Invasive Cervical Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2019/08/12. American Society of Clinical Oncology; 2019;37:2472–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31403858>
7. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Wiley; 2019;69:363–85.
8. Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2010;4:242–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.002>
9. Zhao E, Hou J, Ke X, Abbas MN, Kausar S, Zhang L, et al. The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. *Cancers* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019 [cited 2020 Dec 9];11:1949. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1949>
10. Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* [Internet]. 2018;28:643–61. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7290>
11. Giancotti FG, Baksh S, Blandino G, Just W. Deregulation of cell signaling in cancer. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.005>
12. Rifai K, Idrissou M, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Breaking down the contradictory roles of histone deacetylase sirt1 in human breast cancer. *Cancers*. MDPI AG; 2018.
13. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2006;6:107–16. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc1799>
14. Langsfeld ES, Bodily JM, Laimins LA. The Deacetylase Sirtuin 1 Regulates Human Papillomavirus Replication by Modulating Histone Acetylation and Recruitment of DNA Damage Factors NBS1 and Rad51 to Viral Genomes. McBride AA, editor. *PLOS*

Pathogens [Internet]. Public Library of Science; 2015;11:e1005181. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005181>

15. Das D, Smith N, Wang X, Morgan IM. The Deacetylase SIRT1 Regulates the Replication Properties of Human Papillomavirus 16 E1 and E2. Banks L, editor. Journal of Virology [Internet]. American Society for Microbiology; 2017;91:e00102-17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28275188>

16. Ocadiz-Delgado R, Cruz-Colin JL, Alvarez-Rios E, Torres-Carrillo A, Hernandez-Mendoza K, Conde-Pérezprina JC, et al. Expression of miR-34a and miR-15b during the progression of cervical cancer in a murine model expressing the HPV16 E7 oncoprotein. Journal of Physiology and Biochemistry. Springer Science and Business Media B.V.; 2021;

17. Allison SJ, Jiang M, Milner J. Oncogenic viral protein HPV E7 up-regulates the SIRT1 longevity protein in human cervical cancer cells. Aging [Internet]. Impact Journals LLC; 2009;1:316–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20157519>

18. So D, Shin H-W, Kim J, Lee M, Myeong J, Chun Y-S, et al. Cervical cancer is addicted to SIRT1 disarming the AIM2 antiviral defense. Oncogene [Internet]. 2018;37:5191–204. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41388-018-0339-4>

19. TERAMAE M, FUKUDA T, WADA T, KAWANISHI M, IMAI K, YAMAUCHI M, et al. Sirtuin1 expression predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. Molecular and Clinical Oncology [Internet]. Spandidos Publications; 2015;3:73–8. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2014.427>

20. Raji GR, Sruthi TV, Edatt L, Haritha K, Sharath Shankar S, Sameer Kumar VB. Horizontal transfer of miR-106a/b from cisplatin resistant hepatocarcinoma cells can alter the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin. Cellular Signalling [Internet]. 2017;38:146–58. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656817301833>

21. Sun X, Wang S, Gai J, Guan J, Li J, Li Y, et al. SIRT5 Promotes Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer by Suppressing DNA Damage in a ROS-Dependent Manner via Regulation of the Nrf2/HO-1 Pathway. Frontiers in Oncology [Internet]. Frontiers Media S.A.; 2019;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00754/full>

22. Lee N, Kim DK, Kim ES, Park SJ, Kwon JH, Shin J, et al. Comparative interactomes of SIRT6 and SIRT7: Implication of functional links to aging. *Proteomics*. Wiley-VCH Verlag; 2014;14:1610–22.
23. Khongkow M, Olmos Y, Gong C, RGomes A, JMonteiro L, Yagüe E, et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2013;34:1476–86. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article/34/7/1476/2463358>
24. Kugel S, Feldman JL, Klein MA, Silberman DM, Sebastián C, Mermel C, et al. Identification of and Molecular Basis for SIRT6 Loss-of-Function Point Mutations in Cancer. *Cell Reports*. Elsevier B.V.; 2015;13:479–88.
25. van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. Cell Cycle SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *www.landesbioscience.com Cell Cycle* 3153 *Cell Cycle* [Internet]. 2011;10:3153–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20>
26. Desantis V, Lamanuzzi A, Vacca A. The role of SIRT6 in tumors. *Haematologica* [Internet]. Ferrata Storti Foundation; 2018;103:1–4. Available from: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2017.182675>
27. Krishnamoorthy V, Vilwanathan R. Silencing Sirtuin 6 induces cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Genomics*. Academic Press Inc.; 2020;112:3703–12.
28. Kiran S, Chatterjee N, Singh S, Kaul SC, Wadhwa R, Ramakrishna G. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal. *FEBS Journal*. 2013;280:3451–66.
29. Wu D, Li Y, Zhu KS, Wang H, Zhu WG. Advances in Cellular Characterization of the Sirtuin Isoform, SIRT7. *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
30. Chen J, Chen H, Pan L. SIRT1 and gynecological malignancies (Review). *Oncology Reports* [Internet]. 2021;45:43. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2021.7994>
31. Jiang W, He T, Liu S, Zheng Y, Xiang L, Pei X, et al. The PIK3CA E542K and E545K mutations promote glycolysis and proliferation via induction of the  $\beta$ -catenin/SIRT3 signaling pathway in cervical cancer. *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018;11.

32. Togami S, Nomoto M, Higashi M, Goto M, Yonezawa S, Tsuji T, et al. Expression of mucin antigens (MUC1 and MUC16) as a prognostic factor for mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. Blackwell Publishing Asia; 2010;36:588–97.
33. Jin W, Liao X, Lv Y, Pang Z, Wang Y, Li Q, et al. MUC1 induces acquired chemoresistance by upregulating ABCB1 in EGFR-dependent manner. *Cell Death and Disease* [Internet]. 2017;8. Available from: [www.nature.com/cddis](http://www.nature.com/cddis)
34. Singh S, Kumar PU, Thakur S, Kiran S, Sen B, Sharma S, et al. Expression/localization patterns of sirtuins (SIRT1, SIRT2, and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. *Tumor Biology*. Kluwer Academic Publishers; 2015;36:6159–71.
35. Chen KL, Li L, Yang FX, Li CM, Wang YR, Wang GL. SIRT7 depletion inhibits cell proliferation, migration, and increases drug sensitivity by activating p38MAPK in breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2018;233:6767–78.
36. Machado de Oliveira R, Sarkander J, Kazantsev AG, Fleming Outeiro T, Armando Genazzani KA. SIRT2 as a therapeutic target for age-related disorders. 2012; Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
37. Sinha S, Sharma S, Vora J, Shrivastava N. Emerging role of sirtuins in breast cancer metastasis and multidrug resistance: Implication for novel therapeutic strategies targeting sirtuins. *Pharmacological Research*. Academic Press; 2020.
38. Chen G, Huang P, Hu C. The role of SIRT2 in cancer: A novel therapeutic target. *International Journal of Cancer* [Internet]. 2020;147:3297–304. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33118>
39. Yang L, Feng H, Ma J, Wu H, Liu C, Hou J. SIRT2 expression exhibits potential to serve as a biomarker for disease surveillance and prognosis in the management of cervical cancer patients. *Medicine* [Internet]. 2020;99. Available from: [https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2020/03130/SIRT2\\_expression\\_exhibits\\_potential\\_to\\_serve\\_as\\_a.2.aspx](https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2020/03130/SIRT2_expression_exhibits_potential_to_serve_as_a.2.aspx)
40. Yang F, Gao B, Li R, Li W, Chen W, Yu Z, et al. Expression levels of resistant genes affect cervical cancer prognosis. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. Spandidos Publications; 2017;15:2802–6. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.6328>
41. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. Sirtuin-3 (SIRT3) and the Hallmarks of Cancer. *Genes and Cancer*. 2013;4:164–71.

42. Finley LWS, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1 $\alpha$  Destabilization. *Cancer Cell* [Internet]. 2011;19:416–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610811000857>
43. Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 Is a Stress-Responsive Deacetylase in Cardiomyocytes That Protects Cells from Stress-Mediated Cell Death by Deacetylation of Ku70. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* [Internet]. 2008;28:6384–401. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
44. Xiao J-B, Ma J-Q, Yakefu K, Tursun M. Effect of the SIRT3-AMPK/PPAR pathway on invasion and migration of cervical cancer cells [Internet]. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020. Available from: [www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)
45. Tomaselli D, Steegborn C, Mai A, Rotili D. Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer. *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
46. Oztürk E, Dikensoy E, Balat O, Uğur MG, Balcı SO, Aydın A, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with endometrial carcinoma: a preliminary study. *Journal of the Turkish German Gynecological Association* [Internet]. AVES; 2011;12:229–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24592000>
47. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: Unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2012. p. 362–9.
48. Bergmann L, Lang A, Bross C, Altinoluk-Hambüchen S, Fey I, Overbeck N, et al. Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein. *Cells* [Internet]. NLM (Medline); 2020;9:1950. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/9/1950>
49. Bai A, Xie G, Duan Z, Pang L, Jin Y, Li M, et al. Association of Chemotactic Chemokine Ligand 5 Polymorphisms with the Risk of Developing Severe Enterovirus 71 Infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2015;93:709–13. Available from: <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.14-0745>
50. Zhu Y, Wang G, Li X, Wang T, Weng M, Zhang Y. Knockout of sirt4 decreases chemosensitivity to 5-fu in colorectal cancer cells. *Oncology Letters*. Spandidos Publications; 2018;16:1675–81.

51. Matsushita N, Yonashiro R, Ogata Y, Sugiura A, Nagashima S, Fukuda T, et al. Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms. *Genes to Cells*. 2011;16:190–202.
52. Bringman-Rodenbarger LR, Guo AH, Lyssiotis CA, Lombard DB. Emerging Roles for SIRT5 in Metabolism and Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling* [Internet]. Mary Ann Liebert Inc.; 2018;28:677–90. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7264>
53. Yu BB, Zhi H, Zhang XY, Liang JW, He J, Su C, et al. Mitochondrial dysfunction-mediated decline in angiogenic capacity of endothelial progenitor cells is associated with capillary rarefaction in patients with hypertension via downregulation of CXCR4/JAK2/SIRT5 signaling. *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2019;42:64–75.
54. Li W, Yang Y, Li Y, Zhao Y, Jiang H. Sirt5 Attenuates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury through Regulation of Nrf2/HO-1 and Bcl-2. *BioMed Research International* [Internet]. Hindawi; 2019;2019:1–11. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/4745132/>
55. Chang L, Xi L, Liu Y, Liu R, Wu Z, Jian Z. SIRT5 promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting E2F1. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. Spandidos Publications; 2017;17:342–9. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.7875>
56. Sun M-S, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang F-L, Guo Z-N, et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. Giustarini D, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. Hindawi; 2018;2018:1–17. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/3804979>
57. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology* [Internet]. 2015/01/03. Elsevier; 2015;4:180–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25588755>
58. Lorusso D, Petrelli F, Coinu A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecologic Oncology* [Internet]. United States; 2014;133:117–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825814001024>
59. Silva G, Nunes R, Morale M, Boccardo E, Aguayo F, Termini L. Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics* [Internet]. scielo; 2018;73.

Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-59322018000200335&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322018000200335&nrm=iso)

60. Ebrahimi S, Soltani A, Hashemy SI. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2019;120:6868–77. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcb.28007>

61. Mao W, Sun Y, Zhang H, Cao L, Wang J, He P. A combined modality of carboplatin and photodynamic therapy suppresses epithelial-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 expression in HEP-2 human laryngeal cancer cells via ROS-mediated inhibition of MEK/ERK signalling pathway. *Lasers in Medical Science* [Internet]. 2016;31:1697–705. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2040-6>

62. Filippova M, Filippov V, Williams VM, Zhang K, Kokoza A, Bashkirova S, et al. Cellular Levels of Oxidative Stress Affect the Response of Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. Lu W-L, editor. *BioMed Research International* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–14. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/574659>

63. Ekoue DN, He C, Diamond AM, Bonini MG. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. *Biochimica et biophysica acta Bioenergetics* [Internet]. 2017/01/11. 2017;1858:628–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28087256>

64. Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free radical biology & medicine*. 2017;112:464–79.

65. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* [Internet]. 2017/01/05. Elsevier; 2017;11:613–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110218>

66. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park S-H, Jiang H, et al. Sirt3-Mediated Deacetylation of Evolutionarily Conserved Lysine 122 Regulates MnSOD Activity in Response to Stress. *Molecular Cell* [Internet]. Cell Press; 2010 [cited 2021 Jul 28];40:893–904. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727651000969X>

67. Griess B, Klinkenbiel D, Kueh A, Desler M, Cowan K, Fitzgerald M, et al. Association of SOD3 promoter DNA methylation with its down-regulation in breast carcinomas. *Epigenetics* [Internet]. 2020;15:1325–35. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15592294.2020.1777666>

68. Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radical Biology and Medicine* [Internet]. 2017;112:464–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584917307293>
69. Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1–Nrf2 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences* [Internet]. England; 2013;34:340–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614713000667>
70. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine* [Internet]. United States; 2015;88:93–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584915002749>
71. Zhang L, Guo X, Zhang D, Fan Y, Qin L, Dong S, et al. Upregulated miR-132 in Lgr5 + gastric cancer stem cell-like cells contributes to cisplatin-resistance via SIRT1/CREB/ABCG2 signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017;56:2022–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22656>
72. Jeong Y, Hoang NT, Lovejoy A, Stehr H, Newman AM, Gentles AJ, et al. Role of KEAP1 / NRF2 and TP53 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma Development and Radiation Resistance. *Cancer Discovery* [Internet]. 2017;7:86–101. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-16-0127>
73. Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR, Campbell F, Costello E, Lloyd B, et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Molecular Cancer* [Internet]. 2011;10:37. Available from: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-37>
74. Wu WL, Papagiannakopoulos T. The Pleiotropic Role of the KEAP1/NRF2 Pathway in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* [Internet]. 2020;4:413–35. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030518->
75. Liao Y, Wang Y, Hsi E, Chang M, You Y. MicroRNA-765 influences arterial stiffness through modulating. *Molecular and Cellular Endocrinology* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;1:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.04.006>
76. Li D, Hong X, Zhao F, Ci X, Zhang S. Targeting Nrf2 may reverse the drug resistance in ovarian cancer. *Cancer Cell International* [Internet]. 2021;21:116. Available from: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-01822-1>
77. Hayden A, Douglas J, Sommerlad M, Andrews L, Gould K, Hussain S, et al. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2021 Jul

28];32:806–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143914000374>

78. Silva MM, Rocha CRR, Kinker GS, Pelegrini AL, Menck CFM. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Scientific Reports* [Internet]. 2019;9:17639. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-54065-6>

79. Wang T, Liu Q, Duan L. MBNL1 regulates resistance of HeLa cells to cisplatin via Nrf2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 2020;522:763–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X19322909>

80. Ku B, Liang C, Jung JU, Oh B-H. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Research* [Internet]. 2011;21:627–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/cr2010149>

81. Takayama K, Ishida K, Matsushita T, Fujita N, Hayashi S, Sasaki K, et al. SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* [Internet]. 2009;60:2731–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.24864>

82. Zhang C, Yu Y, Huang Q, Tang K. SIRT6 regulates the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma via the ERK1/2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. Spandidos Publications; 2019;20:1575–82. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10398>

83. Sample KM. DNA repair gene expression is associated with differential prognosis between HPV16 and HPV18 positive cervical cancer patients following radiation therapy. *Scientific Reports* [Internet]. 2020;10:2774. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-59383-8>

84. Oh J-M, Kim S-H, Cho E-A, Song Y-S, Kim W-H, Juhnn Y-S. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* [Internet]. 2010;31:402–10. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp318>

85. Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J, Hoppe-Seyler F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* [Internet]. 2006;25:4009–15. Available from: <http://www.nature.com/articles/1209429>

86. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2002;2:647–56. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc883>
87. Sultana H, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Oishi T, Sato S, et al. Chemosensitivity and p53–Bax pathway-mediated apoptosis in patients with uterine cervical cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 2003;14:214–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419453477>
88. Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Delivery* [Internet]. 2004;1:27–42. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/63040/article>
89. Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GIG, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenetics and Genomics* [Internet]. United States; 2008;18:263–73. Available from: <http://journals.lww.com/01213011-200803000-00011>
90. Drozd E, Krzysztoń-Russjan J, Marczewska J, Drozd J, Bubko I, Bielak M, et al. Up-regulation of glutathione-related genes, enzyme activities and transport proteins in human cervical cancer cells treated with doxorubicin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2016;83:397–406. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216301676>
91. Laberge R-M, Karwatsky J, Lincoln MC, Leimanis ML, Georges E. Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* [Internet]. 2007;73:1727–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295207000925>
92. Giddings EL, Champagne DP, Wu M-H, Laffin JM, Thornton TM, Valenca-Pereira F, et al. Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nature Communications* [Internet]. 2021;12:2804. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-021-23071-6>
93. Tiash S, Chowdhury EH. siRNAs targeting multidrug transporter genes sensitise breast tumour to doxorubicin in a syngeneic mouse model. *Journal of Drug Targeting* [Internet]. Taylor & Francis; 2019;27:325–37. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1061186X.2018.1525388>
94. Narayan G, Bourdon V, Chaganti S, Arias-Pulido H, Nandula S v., Rao PH, et al. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: Identification

of candidate amplified and overexpressed genes. *Genes, Chromosomes and Cancer* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2007;46:373–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gcc.20418>

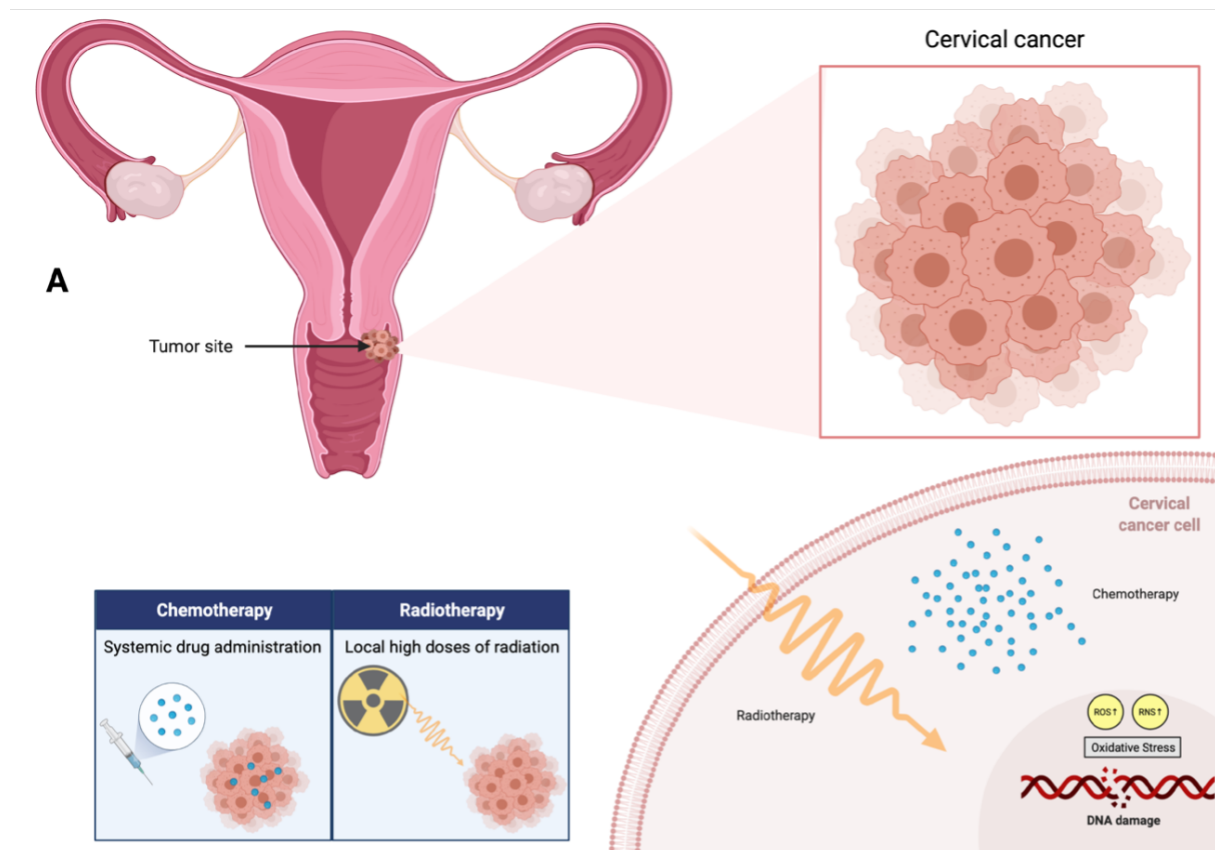


Figure 1. Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Cervical Cancer

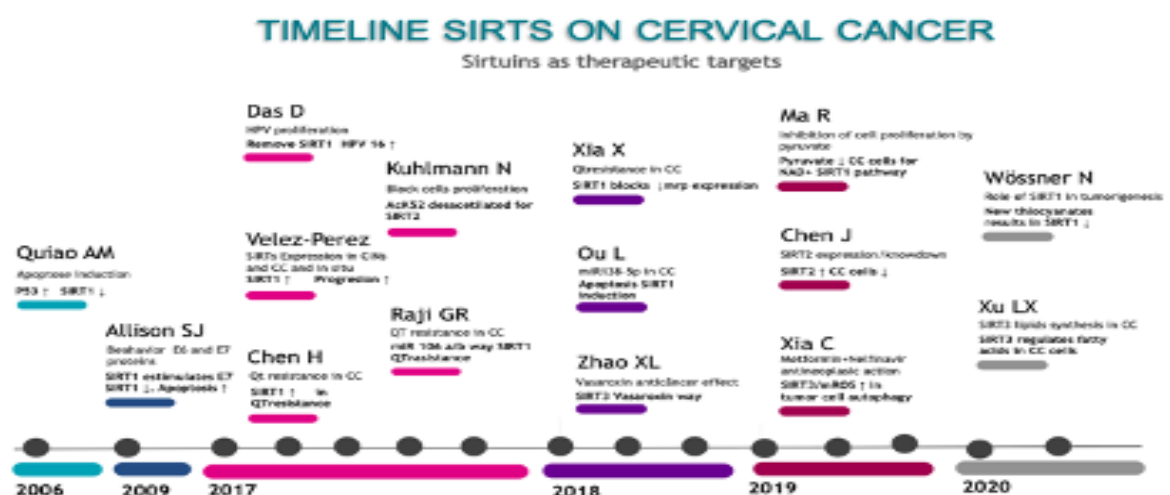


Figure 2. Impact of the role of Sirtuins in tumorigenesis in cervical cancer.

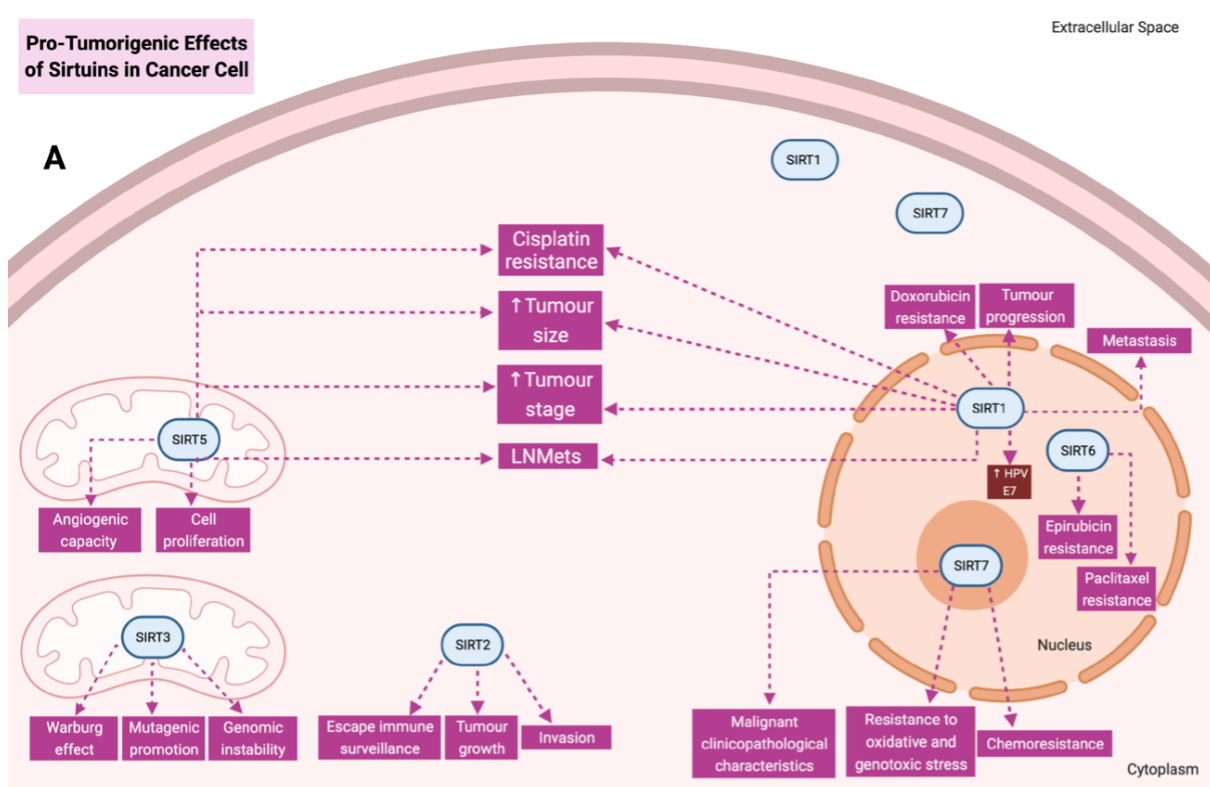


Figure 3. Action and location of Sirtuins in cells

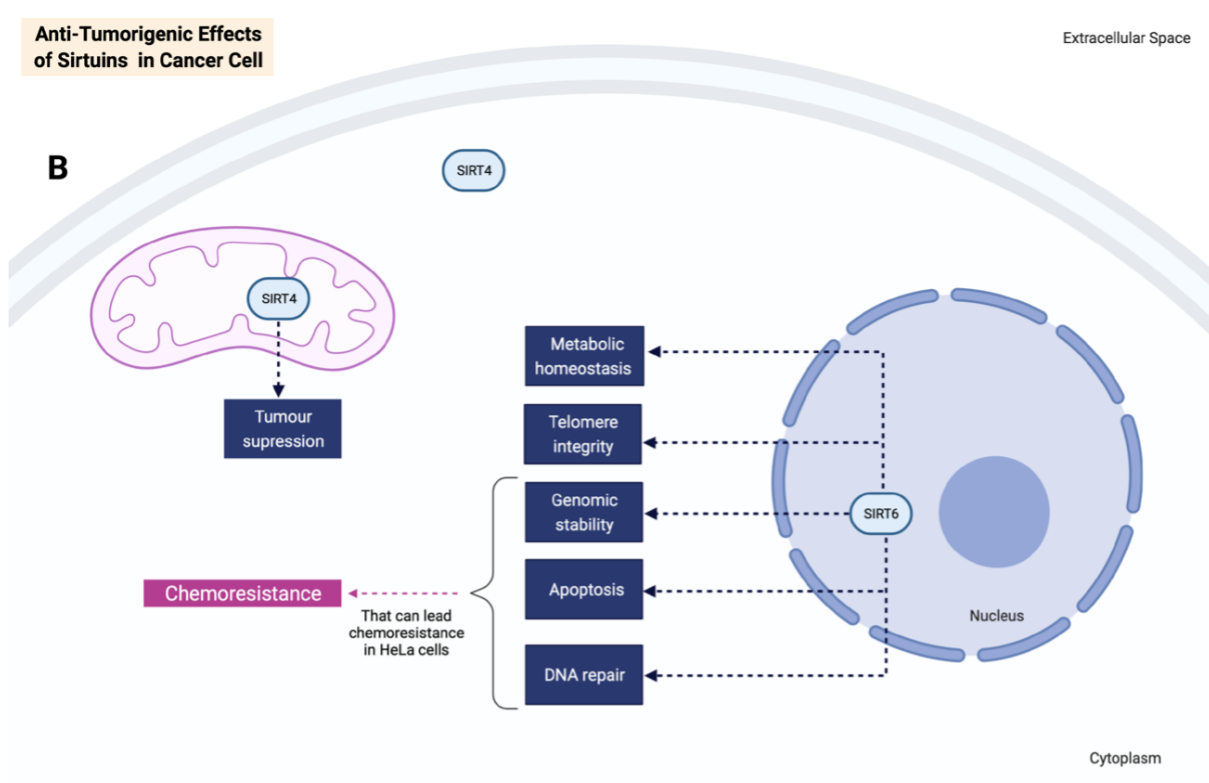


Figure 4. Role of Sirtuins 4 and 6 in Chemoresistance

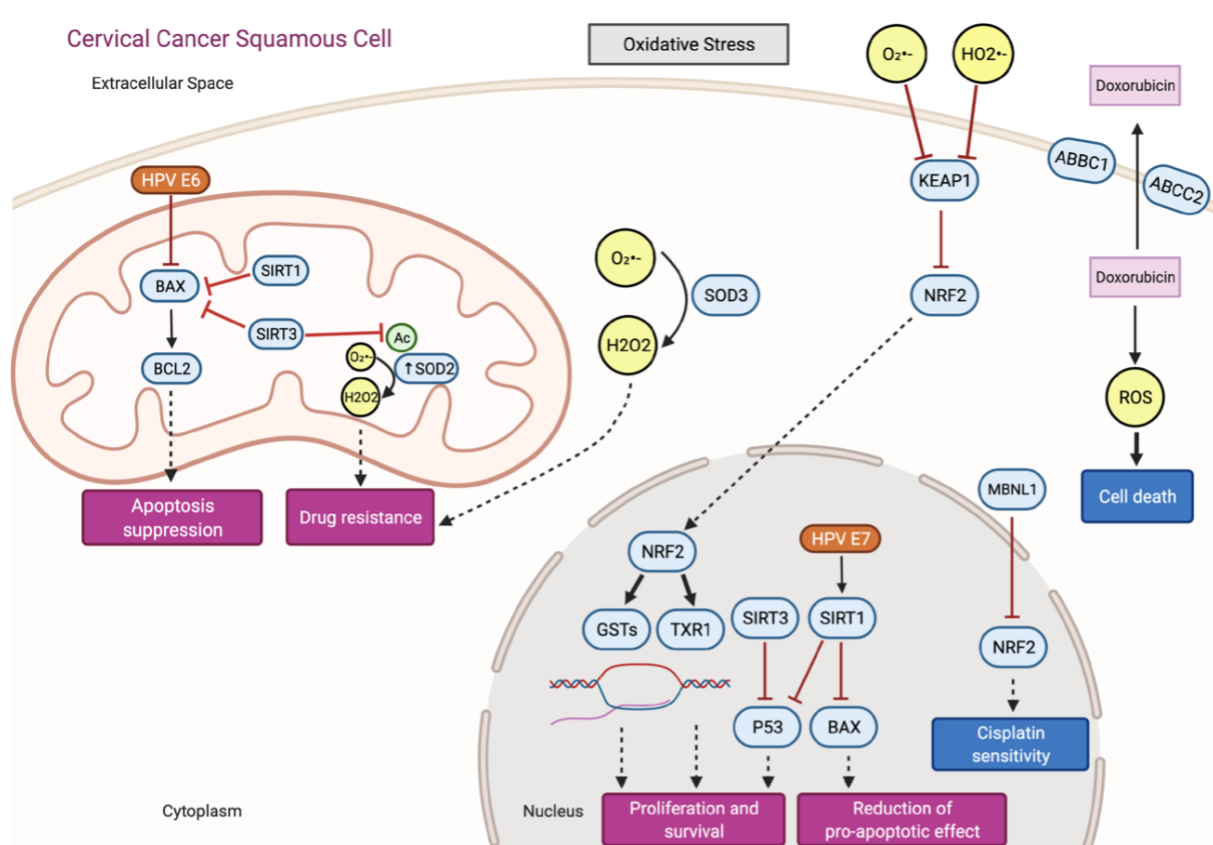


Figure 5. Oxidative Stress in Cervical Squamous Carcinoma

## 6 CONCLUSÕES

O desafio de reduzir as mortes causadas pelo câncer do colo do útero deve envolver estudo de populações-alvo como a do Nordeste brasileiro. Compreender as diferenças comportamentais no âmbito molecular dos tipos histológicos deste tumor é condição premente à melhoria da elaboração prognóstica e melhoria nos índices de cura da doença. Nesse contexto, conhecer o papel das Sirtuínas na tumorigênese, mostrou ser um caminho promissor no sentido de estabelecer ser potencial como alvo terapêutico, bem como marcador de prognóstico. As Sirt1 e 5 demonstram esse potencial, mas necessitam observação em amostras maiores, como também expandir essa observação às outras Sirtuínas.

## REFERÊNCIAS

- ABU-RUSTUM, N. R. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Cervical Cancer, Version 1.2020: Featured Updates to the NCCN Guidelines. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, jun. 2020. v. 18, n. 6, p. 660–666. Disponível em: <https://jnccn.org/view/journals/jnccn/18/6/article-p660.xml>>. Acesso em: 19 set. 2021.
- ALLISON, S. J.; JIANG, M.; MILNER, J. Oncogenic viral protein HPV E7 up-regulates the SIRT1 longevity protein in human cervical cancer cells. **Aging**, 2 mar. 2009. v. 1, n. 3, p. 316–327.
- ANATOMIA GENITAL FEMININA. MEDICINE THE DEFINITIVE ILLUSTRATED HISTORY. [S.l: s.n., s.d.].
- ARBYN, M. *et al.* Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, fev. 2020. v. 8, n. 2, p. e191–e203. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X19304826>>. Acesso em: 22 ago. 2021.
- AVGERINOS, K. I. *et al.* Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. **Metabolism**, mar. 2019. v. 92, p. 121–135. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049518302324>>. Acesso em: 19 set. 2021.
- BENARD, V. B. *et al.* Cervical cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. **Cancer**, 15 dez. 2017. v. 123 Suppl 24, p. 5119–5137.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, nov. 2018. v. 68, n. 6, p. 394–424. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- CHAN, C. K. *et al.* Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. **Journal of Oncology**, 10 out. 2019. v. 2019, p. 1–11. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jo/2019/3257939/>>. Acesso em: 19 set. 2021.
- Charles Gross. **Grey Anatomia**. 29. ed. [S.l.]: Henry Grey, 1988. V. 1.
- CHEN, G.; HUANG, P.; HU, C. The role of SIRT2 in cancer: A novel therapeutic target. **International Journal of Cancer**, 15 dez. 2020. v. 147, n. 12, p. 3297–3304. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33118>>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- CHESSON, H. W. *et al.* The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, nov. 2014. v. 41, n. 11, p. 660–664.
- CHUNG, K. W.; CHUNG, H. M. **Gross anatomy**. 7th ed ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

COLOMBO, N. *et al.* Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, out. 2012. v. 23, p. vii27–vii32. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419376690>>. Acesso em: 19 set. 2021.

DAS, D. *et al.* The Deacetylase SIRT1 Regulates the Replication Properties of Human Papillomavirus 16 E1 and E2. **Journal of Virology**, 15 maio. 2017. v. 91, n. 10. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00102-17>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ELEJE, G. U. *et al.* Palliative interventions for controlling vaginal bleeding in advanced cervical cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 19 mar. 2019. v. 2019, n. 3. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD011000.pub3>>. Acesso em: 19 set. 2021.

Federação Brasileira De Ginecologia E Obstetrícia. **Manual de Orientação Trato Genital Inferior**. Febrasgo.org. . Acesso em: 19 set. 2021.

HO, C.-M. *et al.* Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, jul. 2006. v. 102, n. 1, p. 54–60. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825805010425>>. Acesso em: 19 set. 2021.

Hospital A.C. Camargo. **Manual de Condutas em Ginecologia Oncológica / Hospital A.C. Camargo, Departamento de Ginecologia**. 1. ed. São Paulo, Brasil: Fundação Antonio Prudente, 2010. V. 1.

JUNG, E. J. *et al.* Cervical Adenocarcinoma Has a Poorer Prognosis and a Higher Propensity for Distant Recurrence Than Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Gynecologic Cancer**, jul. 2017. v. 27, n. 6, p. 1228–1236. Disponível em: <<https://ijgc.bmj.com/lookup/doi/10.1097/IGC.0000000000001009>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KUHLMANN, N. *et al.* Development of Substrate-Derived Sirtuin Inhibitors with Potential Anticancer Activity. **ChemMedChem**, 20 out. 2017. v. 12, n. 20, p. 1703–1714. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201700414>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

LETO, M. Das G. P. *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, abr. 2011. v. 86, n. 2, p. 306–317. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962011000200014&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000200014&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 19 set. 2021.

LUTZ GISSMANN, N. M.~oz. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **HPV on Cervical Câncer**. [S.l.]: Elsevier, 2006.

MABUCHI, S. *et al.* Prognostic Factors for Survival in Patients With Recurrent Cervical Cancer Previously Treated With Radiotherapy. **International Journal of Gynecologic Cancer**, jun. 2010. v. 20, n. 5, p. 834–840. Disponível em: <<https://ijgc.bmj.com/lookup/doi/10.1111/IGC.0b013e3181dcadd1>>. Acesso em: 19 set. 2021.

MANZO-MERINO, J. *et al.* The Role of Signaling Pathways in Cervical Cancer and Molecular Therapeutic Targets. **Archives of Medical Research**, out. 2014. v. 45, n. 7, p. 525–539. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440914002215>>. Acesso em: 19 set. 2021.

MORENO-ACOSTA, P. *et al.* Biomarkers of resistance to radiation therapy: a prospective study in cervical carcinoma. **Radiation Oncology**, dez. 2017. v. 12, n. 1, p. 120. Disponível em: <<http://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-017-0856-2>>. Acesso em: 19 set. 2021.

MOYER, V. A. Screening for Cervical Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **Annals of Internal Medicine**, 19 jun. 2012. v. 156, n. 12, p. 880. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-156-12-201206190-00424>>. Acesso em: 19 set. 2021.

OU, L. *et al.* Decreased Expression of miR-138-5p by lncRNA H19 in Cervical Cancer Promotes Tumor Proliferation. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, 10 abr. 2018. v. 26, n. 3, p. 401–410. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/10.3727/096504017X15017209042610>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

PARVEEN, S. *et al.* Cervical cancer: outcome of treatment and causes of failure. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, out. 2006. v. 56, n. 10, p. 436–440.

PEDROZA-TORRES, A. *et al.* MicroRNA-125 modulates radioresistance through targeting p21 in cervical cancer. **Oncology Reports**, 18 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6219>>. Acesso em: 19 set. 2021.

PUBLICATION, I. O. **Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines**. Geneva: World Health Organization, 2006.

QIAO, A. *et al.* Involvement of mitochondria and caspase pathways in N-demethyl-clarithromycin-induced apoptosis in human cervical cancer HeLa cell. **Acta Pharmacologica Sinica**, dez. 2006. v. 27, n. 12, p. 1622–1629. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1745-7254.2006.00444.x>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

QIN, C. *et al.* Factors associated with radiosensitivity of cervical cancer. **Anticancer Research**, set. 2014a. v. 34, n. 9, p. 4649–4656.

RAJI, G. R. *et al.* Horizontal transfer of miR-106a/b from cisplatin resistant hepatocarcinoma cells can alter the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin. **Cellular Signalling**, out. 2017. v. 38, p. 146–158. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656817301833>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

RASHMI, R. *et al.* Radioresistant Cervical Cancers Are Sensitive to Inhibition of Glycolysis and Redox Metabolism. **Cancer Research**, 15 mar. 2018. v. 78, n. 6, p. 1392–1403. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-17-2367>>. Acesso em: 19 set. 2021.

ROMA, A. A. *et al.* Invasive Endocervical Adenocarcinoma: A New Pattern-based Classification System With Important Clinical Significance. **American Journal of Surgical Pathology**, maio. 2015. v. 39, n. 5, p. 667–672. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00000478-201505000-00011>>. Acesso em: 19 set. 2021.

SASLOW, D. *et al.* American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, jun. 2012. v. 62, n. 3, p. 147–172.

SCHOENWOLF, S. *et al.* **Larsen Embriologia Humana**.

SCHWARZ, J. K. *et al.* Pathway-Specific Analysis of Gene Expression Data Identifies the PI3K/Akt Pathway as a Novel Therapeutic Target in Cervical Cancer. **Clinical Cancer Research**, 1 mar. 2012. v. 18, n. 5, p. 1464–1471. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-2485>>. Acesso em: 19 set. 2021.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R.; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiante**. Lyon: Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.

SHANG, C. *et al.* LNMICC Promotes Nodal Metastasis of Cervical Cancer by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. **Cancer Research**, 15 fev. 2018. v. 78, n. 4, p. 877–890. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-17-2356>>. Acesso em: 19 set. 2021.

SHI, D. *et al.* The effect of surgery on the survival status of patients with locally advanced cervical cancer after radiotherapy/chemoradiotherapy: a meta-analysis. **BMC Cancer**, dez. 2018. v. 18, n. 1, p. 308. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-4232-x>>. Acesso em: 19 set. 2021.

SHRESTHA, A. D. *et al.* Cervical Cancer Prevalence, Incidence and Mortality in Low and Middle Income Countries: A Systematic Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, fev. 2018. v. 19, n. 2. Disponível em: <<https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.2.319>>. Acesso em: 19 set. 2021.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, jan. 2020. v. 70, n. 1, p. 7–30. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21590>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SILVA, MARIA APARECIDA DA, N., Sabrina. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica / Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, Brasil, 10 nov. 2010.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 71(3), 209–249.

THE INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies: Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Cervix. **International Journal of Cancer**, 15 fev. 2007. v. 120, n. 4, p. 885–891. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22357>>. Acesso em: 19 set. 2021.

TSUCHIYA, C. *et al.* O câncer de colo do útero no Brasil: uma retrospectiva sobre as políticas públicas voltadas à saúde da mulher. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, abr. 2017. v. 9, n. 1, p. 137–147. Disponível em: <<http://www.jbes.com.br/images/v9n1/137.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2021.

TYAGI, A. *et al.* Cervical cancer stem cells manifest radioresistance: Association with upregulated AP-1 activity. **Scientific Reports**, dez. 2017. v. 7, n. 1, p. 4781. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-05162-x>>. Acesso em: 19 set. 2021.

VELEZ-PEREZ, A. *et al.* SIRT1 overexpression in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, jan. 2017. v. 59, p. 102–107. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817716302398>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

VEO, C. A. R. *et al.* Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. **Tumor Biology**, jul. 2015. v. 36, n. 7, p. 5399–5405. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3205-9>>. Acesso em: 19 set. 2021.

VIEIRA, S. C. *et al.* Exenteração pélvica para câncer do colo uterino recidivado pós-radioterapia: experiência de um centro terciário do Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, jan. 2009. v. 31, n. 1, p. 22–27. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032009000100005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032009000100005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 19 set. 2021.

VITHANA, P. V. S. C. *et al.* Cervical cancer: survival and associated prognostic factors in the western province of Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, 14 set. 2021. v. 49, n. 2, p. 273. Disponível em: <<https://jnsfsl.sljol.info/article/10.4038/jnsfsr.v49i2.9704>>. Acesso em: 19 set. 2021.

WASSIE, M. *et al.* Survival status and associated factors of death among cervical cancer patients attending at Tikur Anbesa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia: a retrospective cohort study. **BMC Cancer**, dez. 2019. v. 19, n. 1, p. 1221. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-6447-x>>. Acesso em: 19 set. 2021.

WENTZENSEN, N. *et al.* Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice: Eurogin 2016 Roadmap. **International Journal of Cancer**, 15 maio. 2017. v. 140, n. 10, p. 2192–2200. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.30579>>. Acesso em: 23 set. 2021.

WOJTYLA, C.; JANIK-KONCEWICZ, K.; LA VECCHIA, C. Cervical cancer mortality in young adult European women. **European Journal of Cancer**, fev. 2020. v. 126, p. 56–

64. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804919308548>>. Acesso em: 19 set. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guideline on self-care interventions for health and well-being**. Geneva: World Health Organization, 2021.

WWW.IARC.WHO.INT/CARDS\_PAGE/WORLD-CANCER-REPORT.

XIA, X.; ZHOU, X. Knockdown of SIRT1 inhibits proliferation and promotes apoptosis of paclitaxel-resistant human cervical cancer cells. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)**, 15 maio. 2018. v. 64, n. 6, p. 36–41.

XIAO, J.-B. *et al.* Effect of the SIRT3-AMPK/PPAR pathway on invasion and migration of cervical cancer cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 2020. v. 13, n. 10, p. 2495–2501.

XU, L. X. *et al.* SIRT3 promotes the invasion and metastasis of cervical cancer cells by regulating fatty acid synthase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, jan. 2020. v. 464, n. 1–2, p. 11–20. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-019-03644-2>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

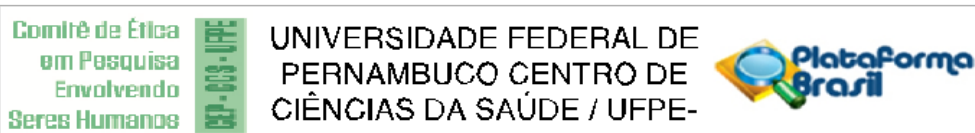
YANG, J. *et al.* Nomograms for predicting the survival rate for cervical cancer patients who undergo radiation therapy: a SEER analysis. **Future Oncology**, set. 2019. v. 15, n. 26, p. 3033–3045. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon-2019-0029>>. Acesso em: 19 set. 2021.

YOSHIDA, K. *et al.* The upregulated expression of vascular endothelial growth factor in surgically treated patients with recurrent/radioresistant cervical cancer of the uterus. **Oncology Letters**, 2 maio. 2018. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8610>>. Acesso em: 19 set. 2021.

ZEFERINO, L. C. *et al.* Duração da Neoplasia Intra-Epitelial e do Carcinoma Invasor do Colo Uterino: Estudo Epidemiológico. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, dez. 1998. v. 20, n. 10. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72031998001000004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72031998001000004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 19 set. 2021.

ZHAO, E. *et al.* The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. **Cancers**, 5 dez. 2019. v. 11, n. 12, p. 1949. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1949>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

## APÊNDICE A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** SAÚDE DA MULHER: MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DE MAMA E CERVICAL

**Pesquisador:** Danyelly Bruneska Gondim Martins

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 35626514.5.0000.5208

**Instituição Proponente:** LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 852.334

**Data da Relatoria:** 30/10/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

Indicado na relatoria inicial.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Indicado na relatoria inicial.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Indicado na relatoria inicial.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Indicado na relatoria inicial.

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

Indicado na relatoria inicial.

#### **Recomendações:**

Recomendação:

No orçamento, o equipamento pertence ao LIKA/UFPE, portanto não seria necessário incluir no orçamento, mas informar que o Laboratório permitirá o uso do mesmo.

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

aprovado com recomendação.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-6588

**E-mail:** capcos@ufpe.br

## APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS-Resolução 466/12)

Convidamos a Sra. para participar como voluntária da pesquisa “SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DO COLO UTERINO” que está sob a responsabilidade da pesquisadora/orientadora Danyelly Bruneska Gondim Martins, no endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, telefones: (81) 2126-8489/8484, e-mail: [bruneska@prospecmol.org](mailto:bruneska@prospecmol.org).

Este Termo de Consentimento pode conter informações que a senhora não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que a senhora esteja bem esclarecida sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e 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 a Sra. não será penalizada de forma alguma. Também garantimos que a Senhora tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Os objetivos principais consistem no desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce, rápido, eficiente e de baixo custo para doenças ocasionadas pelo Papilomavírus humano (HPV), 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 ocasionada por este microrganismo. A coleta de dados será feita por resposta a um questionário de estudo socio-demográfico realizado por colaboradores da pesquisa.

- O período de participação do voluntário na pesquisa será compreendido entre a consulta no ambulatório do Serviço de Ginecologia do HC/UFPE onde será feita a coleta de material e a volta desse mesmo paciente para seguimento no mesmo serviço. A integração do paciente na pesquisa em nada irá alterar as suas possibilidades de tratamento, servindo para no futuro se ter um melhor entendimento do câncer do colo uterino assim como servir de base para o possível desenvolvimento de novos fármacos direcionados para essa patologia.

A contribuição do paciente consiste em doação de sangue, onde serão colhidos 4 mL de sangue – 1 colher das de sopa – por punção de veia do braço. Células epiteliais provenientes da “escovinha” usada durante o exame de Papanicolau, procedimento realizado no ambulatório do Serviço de Ginecologia do HC/UFPE. A coleta de biópsia da região do colo do útero será efetuada no mesmo ambulatório quando após colposcopia o ginecologista ache necessário. Esta amostra tem dimensões muito reduzidas, na ordem de 3mm (um grão de arroz).

- RISCOS diretos para o voluntário: na coleta de dados existe o risco de perda de algum dado e/ou desconforto da paciente por revelar detalhes íntimos. Como forma de minimização, o questionário sócio demográfico será preenchido em local reservado, onde apenas o paciente e o colaborador da pesquisa estarão presentes. A coleta de sangue não faz parte do procedimento padrão de exames ginecológicos implementados pelo Ministério da Saúde, sendo este um desconforto adicional,

podendo ocasionar um leve desconforto no momento da coleta e a possibilidade de surgimento de um pequeno trauma no local da coleta que desaparecerá após 24 ou 48 horas. Para minimização dos riscos associados a coleta de sangue, esta apenas será feita por profissionais capacitados em estrutura apropriada. Assim como num exame ginecológico periódico, existe apenas um desconforto no momento da observação do colo do útero, onde será realizada a coleta, pela introdução do espéculeto no canal cervical. Os riscos associados a este procedimento serão minimizados, novamente, pelo fato de apenas profissionais capacitados o fazerem. Também, será totalmente explicada qualquer tipo de dúvida ou receio que a paciente possa demonstrar. Um dos riscos associados é a possível perda de amostras no que diz respeito a manipulação das mesmas onde serão depositadas num banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. Para evitar tal acontecimento, apenas profissionais capacitados poderão manipular essas amostras.

· BENEFÍCIOS diretos e indiretos para os voluntários: para cada paciente será emitido um laudo onde constará não só a existência ou não de infecção por HPV, mas também o seu genótipo. Isto levará a uma maior consciência da paciente e do ginecologista do risco associado aos HPVs infectantes. Para além disso, como se pretende que a longo prazo possa haver a produção de novos fármacos para câncer do colo uterino, outras pacientes poderão se beneficiar desta pesquisa. Como este estudo visa o desenho de um painel genético para diagnóstico, futuras pacientes podem ser altamente beneficiadas, ainda em estágios precoces da doença.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e fotos), ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da pesquisadora/orientadora, no endereço acima informado, pelo período de no mínimo 5 anos.

A senhora não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

\_\_\_\_\_ (assinatura do pesquisador)

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIA

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DO COLO UTERINO”, como voluntária.

Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade, tais como interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):  
Impressão digital (opcional)

|             |             |
|-------------|-------------|
| Nome:       | Nome:       |
| Assinatura: | Assinatura: |

## APÊNDICE C - FICHA DE COLETA DE DADOS

[illegible]

**APÊNDICE D - RELAÇÃO DOS MAIS DIVERSOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE TUMORES QUE OCORREM NO COLO DO ÚTERO**

| <b>Tumores Epiteliais</b>                                                                                           |                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Tumores escamosos e lesões precursoras                                                                              | Neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 (NIC 3) |
| Carcinoma de células escamosas, sem outras especificações                                                           | Carcinoma in situ de células escamosas            |
| Queratinizantes                                                                                                     | Alterações benignas das células escamosas         |
| Não queratinizantes                                                                                                 | Condiloma acuminado                               |
| Basalóide                                                                                                           | Papiloma escamoso                                 |
| Carcinoma verrucoso                                                                                                 | Pólipo fibroepitelial                             |
| Carcinoma verrucoso com características de infecção por HPV, também conhecido como carcinoma escamoso condilomatoso | Tumores glandulares e lesões precursoras          |
| Papilar                                                                                                             | Adenocarcinoma                                    |
| Tipo Linfoepitelioma                                                                                                | Adenocarcinoma mucinoso                           |
| Carcinoma escamo-transicional                                                                                       | Endocervical                                      |
| Carcinoma de células escamosas micro-invasor                                                                        | Intestinal                                        |
| Neoplasia escamosa intra-epitelial                                                                                  | Tumores mesenquimais e lesões pseudotumorais      |
| Carcinoma de células em anel de sinete                                                                              | Leiomiossarcoma                                   |
| Variação mínima                                                                                                     | Sarcoma estromal endometrial, de baixo grau       |
| Viloglandular                                                                                                       | Sarcoma endocervical indiferenciado               |
| Carcinoma endometrióide                                                                                             | Sarcoma botrióide                                 |
| Adenocarcinoma de células claras                                                                                    | Sarcoma alveolar de partes moles                  |
| Adenocarcinoma seroso                                                                                               | Angiossarcoma                                     |
| Adenocarcinoma mesonéfrico                                                                                          | Tumor maligno da bainha do nervo periférico       |

|                                             |                                                  |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Adenocarcinoma com invasão inicial          | Leiomioma                                        |
| Adenocarcinoma in situ                      | Rabdomioma genital                               |
| Displasia glandular                         | Nódulo pós-operatório de células fusiformes      |
| Lesões glandulares benignas                 | Tumores mistos epiteliais e mesenquimais         |
| Papiloma mülleriano                         | Carcinossarcoma (Tumor mülleriano misto maligno) |
| Pólipo endocervical                         | Adenossarcoma                                    |
| Outros tumores epiteliais                   | Tumor de Wilms                                   |
| Carcinoma adenoescamoso                     | Adenofibroma                                     |
| Variante de carcinoma de "célula vítrea"    | Adenomioma                                       |
| Carcinoma adenóide cístico                  | Tumores melanocíticos                            |
| Carcinoma adenóide basal                    | Melanoma maligno                                 |
| Tumores neuroendócrinos                     | Nevus azul                                       |
| Carcinóide                                  | Outros tumores                                   |
| Carcinóide atípico                          | Tumores das células germinativas                 |
| Carcinoma de pequenas células               | Tumor do seio endodérmico (Yolk sac tumour)      |
| Carcinoma neuroendócrino de grandes células | Cisto dermóide                                   |
| Carcinoma indiferenciado                    | Teratoma cístico maduro                          |
| Hemotopoético e linfóide                    | Leucemia (tipo específico)                       |
| Linfoma maligno (tipo específico)           | Tumores secundários                              |