

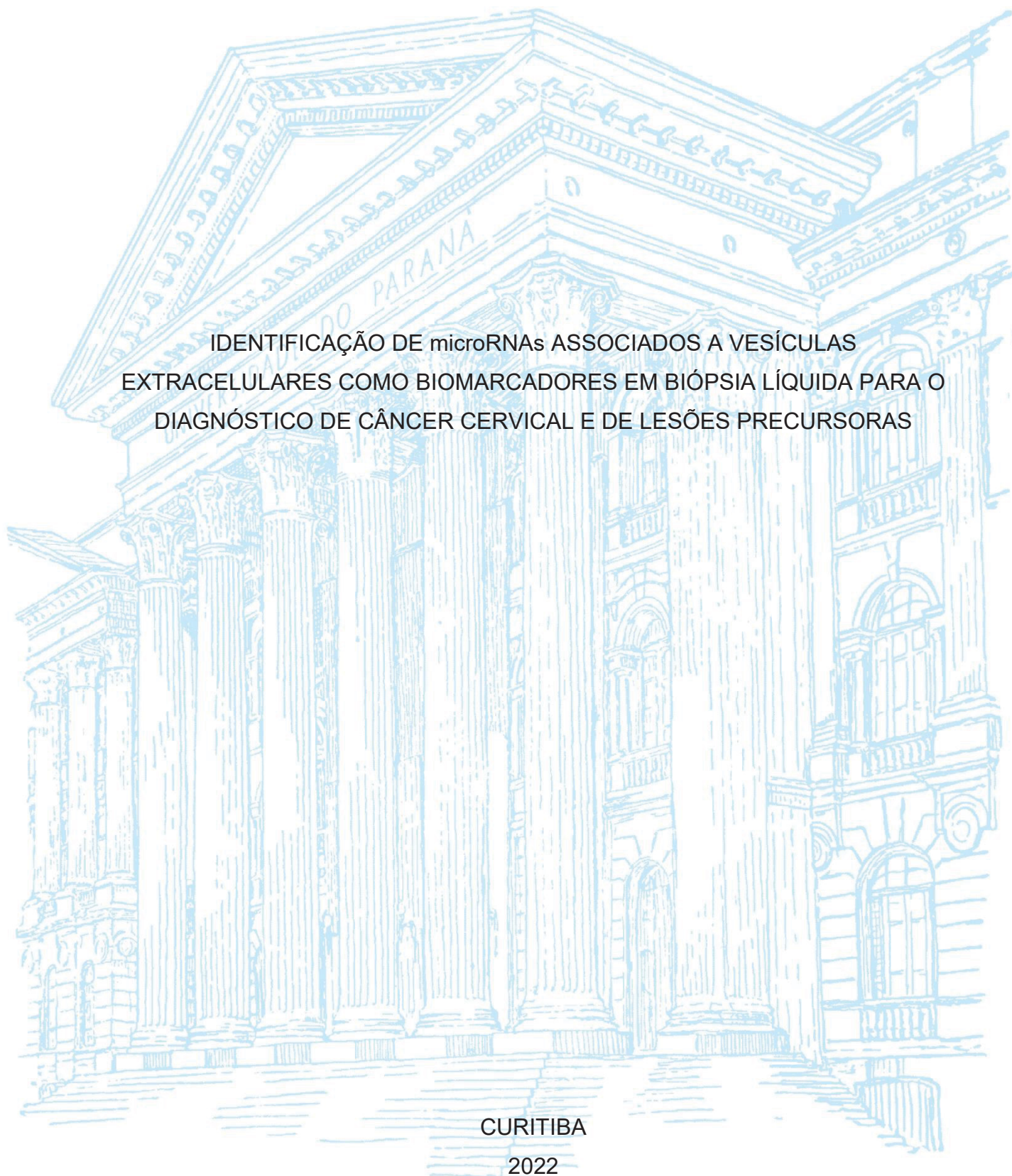
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA COSTA BRANDÃO BERTI

IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs ASSOCIADOS A VESÍCULAS
EXTRACELULARES COMO BIOMARCADORES EM BIÓPSIA LÍQUIDA PARA O
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER CERVICAL E DE LESÕES PRECURSORAS

CURITIBA

2022



FERNANDA COSTA BRANDÃO BERTI

IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs ASSOCIADOS A VESÍCULAS
EXTRACELULARES COMO BIOMARCADORES EM BIÓPSIA LÍQUIDA PARA O
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER CERVICAL E DE LESÕES PRECURSORAS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Malheiros

Coorientador: Prof. Dr. Gabriel Adelman Cipolla

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Berti, Fernanda Costa Brandão.

Identificação de MicroRNAs associados a vesículas extracelulares como biomarcadores em biópsia líquida para o diagnóstico de câncer cervical e de lesões precursoras. / Fernanda Costa Brandão Berti. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Danielle Malheiros.

Coorientador: Gabriel Adelman Cipolla.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. MicroRNAs. 2. Vesícula. 3. Biomarcadores. 4. Biópsia. 5. Colo uterino - Câncer. I. Título. II. Malheiros, Danielle. III. Cipolla, Gabriel Adelman. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDA COSTA BRANDÃO BERTI** intitulada: **IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs ASSOCIADOS A VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO BIOMARCADORES EM BIÓPSIA LÍQUIDA PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER CERVICAL E DE LESÕES PRECURSORAS**, sob orientação da Profa. Dra. DANIELLE MALHEIROS FERREIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

24/02/2022 10:49:37.0

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/02/2022 15:04:48.0

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -
HOSPITAL DE CLÍNICAS)

Assinatura Eletrônica

23/02/2022 14:04:18.0

ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/02/2022 12:53:17.0

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA
Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

23/02/2022 13:30:22.0

MARCO AUGUSTO STIMAMIGLIO
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 154644

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 154644

Ao meu Amado Deus, que é poderoso para realizar infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou imaginamos, de acordo com o seu Poder que age em nós! E à minha amada família, que sonhou e realizou ativamente este doutorado comigo!!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Danielle Malheiros por me acolher e apostar em mim, mesmo sem me conhecer previamente e por ter me dado esta oportunidade de crescimento, que tanto significou em minha vida. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Gabriel Adelman Cipolla, que entrou no meio desta jornada com a gente, e fez o nosso time ficar completo! Pela orientação, incentivo e disponibilidade de ambos, especialmente nos últimos anos. Obrigada por sempre estarem tão presentes, por realizarem comigo este doutorado! Também sou grata pela preciosa amizade que construímos ao longo desse tempo!

Ao Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner e à Unidade Básica de Saúde Nossa Senhora Aparecida, pelo auxílio na obtenção das amostras. Em especial à Dra. Fernanda Villar Fonseca e à Enfermeira Xênia Silva, por serem tão prontas e dispostas a nos ajudar durante as coletas. Sem seu auxílio, as mesmas não seriam possíveis. Um agradecimento especialíssimo à minha parceira oficial de coletas e amiga, Tatiane! Tati, você fez tudo ficar mais leve! Agradeço também à Camila e à Priscila que nos auxiliaram nesse processo! E um agradecimento mais do que especial às pacientes que aceitaram fazer parte desta pesquisa, contribuindo com a doação de amostras e viabilizando a realização desta. Vocês foram essenciais!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional e à Capes, e a PROPPG-UFPR, pelo apoio financeiro para realização deste estudo. Aos parceiros e amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana, por todo apoio e ajuda. Em especial à técnica Priscila, Amanda, Débora, Helen e Thiago. Aos parceiros do Departamento de Genética e de Biologia Molecular, que me ajudaram nos experimentos e análises. Um agradecimento especial à Paty, Ingrid, Profa. Dra. Lucélia Donatti, Pryscilla Fanini Wowk, Carol e Tay por toda paciência, disposição e prontidão em me ajudar!

Ao meu amado esposo Lucas, por me incentivar a crescer e me fazer acreditar que era possível fazer um doutorado depois de tantos anos de formada! Pela parceria e amor, que me sustentaram ao longo deste processo. Ao meu amado filho Theo, que entrou em nossas vidas logo no início dessa jornada e transformou tudo! Mas, me deu garra e forças para chegar até o final. Ao meu amado filho canino Brot, que esteve sempre ao meu lado. Sou muito grata aos três pela paciência e compreensão que tiveram, pelos muitos sacrifícios que fizeram!

Aos meus pais, Jorge e Vera, e à minha sogra Sonia, por serem mais que incentivadores. Pelo apoio, compreensão, torcida e por tanto amor. Sem vocês eu sem dúvida não chegaria até aqui. Vocês foram e são pilares para mim! Um agradecimento especial também à minha irmã Manoela, por me ouvir, me apoiar, estar comigo nos momentos mais difíceis. Mesmo à distância, Maru, você foi presente demais! E à toda a minha família, em especial à Grazi, Mateus, Davi e André.

Aos meus queridos amigos, que me apoiaram e incentivaram, e estiveram ao meu lado me encorajando e vibrando comigo a cada etapa vencida. Amigos de tantos lugares, de tempos diferentes da minha vida; mas cada um, em algum momento, me deu forças e me ajudou a chegar até aqui! E a todos que, eventualmente, acabei não mencionando, mas que contribuíram direta ou indiretamente, de maneira não menos importante para o desenvolvimento deste trabalho.

*“A minha **GRAÇA** é sempre mais do que suficiente para ti, e o meu **PODER**
encontra a sua **EXPRESSÃO PLENA** na tua fraqueza” (II Co. 12:9-10)*

RESUMO

O câncer cervical (CC) ocupa o quarto lugar entre os cânceres mais comumente diagnosticados em mulheres, sendo uma das principais causas de morte por câncer em todo o mundo. A carcinogênese cervical está intimamente associada aos papilomavírus humanos de alto risco (HPV-AR), considerados os agentes causadores de virtualmente todos os casos de CC. A infecção persistente por um HPV-AR induz uma importante mudança na expressão gênica global nas células hospedeiras contribuindo para a ocorrência do ciclo viral e, conseqüentemente, a manutenção da infecção. Mais recentemente, diversas evidências demonstraram a participação de vários microRNAs (miRNAs) na carcinogênese cervical, incluindo miRNAs associados a vesículas extracelulares (miRNAs-VE). Embora alguns biomarcadores moleculares tenham sido descritos como apresentando potencial diagnóstico e prognóstico no CC, o uso de miRNAs-VE como potenciais biomarcadores nesse contexto ainda está em seu início. Assim, é com base na necessidade imediata de se identificar e validar novos biomarcadores em biópsia líquida para o diagnóstico de CC e de lesões precursoras que este estudo foi proposto. Inicialmente, análise de bioinformática e busca na literatura foram conduzidas a fim de se selecionar potenciais miRNAs-VE candidatos para a identificação dos diferentes estágios de lesões precursoras/CC. Quatro candidatos foram selecionados – miR-10b-5p, miR-148a-3p, miR-181b-5p e miR-155-5p – sendo os três primeiros quantificados em VEs isoladas a partir de amostras de plasma obtidas de controles e pacientes brasileiras com diferentes estágios de lesões cervicais. VEs plasmáticas foram isoladas por um método baseado em precipitação e, então, caracterizadas pela análise de rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão e *western blotting*. Os *pellets* isolados mostraram-se enriquecidos em exossomos. Os níveis de miR-VE-10b-5p foram significativamente menores em pacientes com CC do que em participantes sem lesão cervical (SL) ($p < 0,050$; *fold-change*_{SL x CC} = 1,883). A análise de curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) revelou que o miR-VE-10b-5p apresenta potencial diagnóstico razoável em discriminar tais estágios, com sensibilidade e especificidade de 81,25% e 72,73%, respectivamente. Os níveis de miR-VE-181b-5p não variaram significativamente entre os grupos avaliados, enquanto os níveis de miR-VE-148a-3p foram significativamente menores em pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) em comparação às mulheres SL ($p < 0,050$; *fold-change*_{SL x LIEBG} = 3,437), bem como em comparação ao conjunto das pacientes com lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) e com CC ($p < 0,050$; *fold-change*_{(LIEAG+CC) x LIEBG} = 3,006). No entanto, seu potencial diagnóstico em discriminar os diferentes estágios não foi satisfatório. A validação em conjuntos amostrais adicionais, utilizando número amostral maior e incluindo diferentes populações faz-se necessária a fim de se confirmar e melhor entender o potencial dos miRNAs-VE avaliados como biomarcadores de diferentes estágios da carcinogênese cervical, especialmente do miR-VE-10b-5p. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo quantificando miRNAs-VE plasmáticos em diferentes estágios de CC e lesões precursoras em amostra populacional brasileira.

Palavras-chave: MicroRNAs. Vesículas Extracelulares. Biomarcadores. Biópsia Líquida. Câncer Cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) ranks fourth among the most commonly diagnosed cancers in women and is one of the leading causes of death by cancer worldwide. Cervical carcinogenesis is intimately associated with high-risk human papillomaviruses (HR-HPV), considered the causative agents of virtually all cases of CC. Following a persistent infection by an HR-HPV, an important change in global gene expression in host cells takes place, contributing to the maintenance of the viral cycle and, therefore, of the infection. Most recently, accumulating evidence has shown several microRNAs (miRNAs) taking part in cervical carcinogenesis, including extracellular vesicle-associated miRNAs (EV-miRNAs). Although some molecular biomarkers have been described as presenting diagnostic and prognostic potential in CC, the use of EV-miRNAs as potential biomarkers in such context is still starting to be set. This study was therefore proposed based on the urgent need to identify and validate new biomarkers in liquid biopsy for the diagnosis of CC and its precursor lesions. At first, bioinformatics analysis and literature search were applied to select potential candidate EV-miRNAs for identifying different stages of precursor lesions/CC. Four candidates were selected – miR-10b-5p, miR-148a-3p, miR-181b-5p, and miR-155-5p – and the first three were quantified in EVs isolated from plasma samples obtained from Brazilian controls and patients with different stages of cervical lesions. Plasma EVs were isolated through a precipitation-based method and were characterized by nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy, and western blotting. The isolated pellets presented an exosome-enriched pattern. EV-miR-10b-5p levels were significantly lower in CC patients than in subjects without cervical lesion (WL) ($p < 0.050$; fold-change $_{WL \times CC} = 1.883$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis revealed EV-miR-10b-5p as presenting a fair diagnostic potential in discriminating such stages, with sensitivity and specificity of 81.25% and 72.73%, respectively. EV-miR-181b-5p levels did not vary significantly between the evaluated groups, while EV-miR-148a-3p levels were significantly lower in low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) patients in comparison to women WL ($p < 0.050$; fold-change $_{WL \times LSIL} = 3.437$), as well as in comparison to high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) patients together with CC subjects ($p < 0.050$; fold-change $_{(HSIL+CC) \times LSIL} = 3.006$). However, its diagnostic potential in discriminating the different stages was not satisfactory. Further validation sets using larger sample sizes and different populations are required to confirm and better understand the potential of the evaluated EV-miRNAs as biomarkers of the different stages of cervical carcinogenesis, especially of EV-miR-10b-5p. To the best of our knowledge, this is the first study quantifying plasma EV-miRNAs in different stages of CC and its precursor lesions in the Brazilian population.

Keywords: MicroRNAs. Extracellular Vesicles. Biomarkers. Liquid Biopsy. Cervical Cancer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROGRESSÃO PARA O CÂNCER CERVICAL MEDIADA PELO VÍRUS HPV.....	33
FIGURA 2 - VISÃO ESQUEMÁTICA DA BIOGÊNESE DE miRNAs	38
FIGURA 3 - APLICAÇÕES CLÍNICAS DIVERSAS DE BIÓPSIA LÍQUIDA	43
FIGURA 4 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	48
FIGURA 5 - ETAPAS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	53
FIGURA 6 - VISÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA A SELEÇÃO DE POTENCIAIS miRNAs-VE CANDIDATOS	57
FIGURA 7 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE NTA DE VEs PLASMÁTICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE CONTROLE E PACIENTES.....	66
FIGURA 8 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE VEs PLASMÁTICAS ISOLADAS	68
FIGURA 9 - MARCADORES PROTEÍCOS ANALISADOS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	69
FIGURA 10 - POTENCIAIS miRNAs-VE CANDIDATOS PARA DIAGNÓSTICO DE LIE E CC	85
FIGURA 11 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO miR-VE-10b-5p NOS DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS	94
FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO miR-VE-148a-3p NOS DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS	96
FIGURA 13 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO miR-VE-181b-5p NOS DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS	98
FIGURA 14 - POTENCIAL DIAGNÓSTICO DO miR-VE-10b-5p e miR-VE-148a-3p EM DISCRIMINAR DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALOCAÇÃO DAS AMOSTRAS EM DIFERENTES GRUPOS A PARTIR DE DIAGNÓSTICO INICIAL CONSIDERANDO DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES PROPOSTAS	55
TABELA 2 - PARÂMETROS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	64
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL+LIEBG <i>versus</i> LIEAG+CC73	
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL <i>versus</i> CC	75
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL <i>versus</i> LIE <i>versus</i> CC.....	77
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL <i>versus</i> LIEBG <i>versus</i> LIEAG+CC	79
TABELA 7 - PERFIS DE EXPRESSÃO DOS DIFERENTES miRNAs SELECIONADOS EM DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS	87
TABELA 8 - PARÂMETROS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE CURVAS ROC INDIVIDUAIS.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AD	- Adenocarcinoma
ADAM9	- <i>ADAM metallopeptidase domain 9</i>
ALIX	- <i>ALG-2 interacting protein X</i>
APP	- Proteína precursora amiloide
ARF6	- <i>ADP-ribosylation factor 6</i>
ARMMs	- <i>Arrestin-domain-containing protein 1-mediated microvesicles</i>
Ago2	- Argonauta
ANOVA	- Análise de variância
AUC	- <i>Area under the curve</i>
BIRC5	- <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i>
CAAE	- Certificado de apresentação para apreciação ética
CC	- Câncer cervical
CCE	- Carcinoma de células escamosas
CDKN2A	- Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
ceRNA	- RNAs competidores endógenos
cfDNA	- DNA livre circulante
circRNA	- RNA circular
CIS	- Carcinoma <i>in situ</i>
CMV	- Corpo multivesicular
CTC	- Célula tumoral circulante
ctDNA	- DNA tumoral circulante
CXCR4	- Receptor 4 de quimiocina CXC
DGCR8	- <i>DiGeorge syndrome critical region 8 protein</i>
DNA-HPV	- HPV por captura híbrida
DNMT1	- DNA-metiltransferase 1
dsRNA	- RNA dupla fita
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
E2F2	- <i>E2F Transcription Factor 2</i>
E2F7	- <i>E2F Transcription Factor 7</i>
ERK	- Quinase regulada por sinal extracelular
EXP5	- Exportina-5
E6AP	- Ubiquitina ligase UBE3A

<i>FOXM1</i>	- <i>Forkhead Box M1</i>
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GTP	- Trifosfato de guanosina
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HEG	- Hospital Erasto Gaertner
HPV	- Papilomavírus humano
HPV-AR	- HPV de alto risco
HPV-BR	- HPV de baixo risco
HPV-RI	- HPV de risco indeterminado
<i>HRP</i>	- <i>Horseradish peroxidase</i>
<i>HSIL</i>	- <i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
HSP	- Proteína de choque térmico
HSPG	- Proteoglicano de heparam sulfato
HUVEC	- Células endoteliais de veia umbilical humana
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	- Molécula de adesão intercelular
IST	- Infecção sexualmente transmissível
<i>LAST</i>	- <i>Lower anogenital squamous terminology</i>
LBPA	- Ácido lisobisfosfatidil
<i>LCR</i>	- <i>Long control region</i>
LFA1	- Antígeno-1 associado à função linfocitária
LGMH	- Laboratório de Genética Molecular Humana
<i>LGR4</i>	- <i>Leucine rich repeat containing g protein-coupled receptor 4</i>
LIE	- Lesão intraepitelial escamosa
LIEBG	- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LIEAG	- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
lncRNA	- RNA longo não-codificador
<i>LSIL</i>	- <i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
<i>MCM5</i>	- <i>Minichromosome Maintenance Complex Component 5</i>
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
<i>MET</i>	- <i>Proto-Oncogene Protein c-Met</i>
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
miRNA	- microRNA
miRNAs-VE	- miRNAs derivados de VEs

MRE	- Elementos de reconhecimento de miRNA
mRNA	- RNA mensageiro
ncRNA	- RNA não-codificador
NIC	- Neoplasia intraepitelial cervical
NPM1	- Nucleofosfamina
NTA	- Análise de rastreamento de nanopartículas
OMS	- Organização Mundial da Saúde
ORF	- <i>Open reading frame</i>
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PBS	- Tampão fosfato salino
PK1	- Piruvato desidrogenase quinase 1
PECAM1	- Molécula-1 de adesão celular endotelial a plaquetas
PLD	- Fosfolipase D
PMEL	- <i>Premelanosome protein</i>
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonil
pRB	- Proteína do retinoblastoma
pré-miRNA	- miRNA precursor
pri-miRNA	- miRNA primário
PrP	- Proteína priônica
QR	- Quantidade relativa
RISC	- Complexo de silenciamento induzido por RNA
ROC	- <i>Receiver operator characteristic</i>
ROCK	- Proteína quinase associada a Rho
SDS	- Sulfato de sódio
SUS	- Sistema Único de Saúde
SLC38A2	- <i>Solute carrier family 38 member 2</i>
SMS	- Secretaria Municipal de Saúde
TBST	- Tampão tris-salino com tween 20
TCGA	- <i>The Cancer Genome Atlas Program</i>
TCR	- Receptor de célula T
TDP43	- Proteína de ligação ao DNA TAR 43
TEM	- Transição epitélio-mesênquimal
TEPs	- Plaquetas “educadas” por tumor

<i>TP53</i>	- <i>Tumor Protein P53</i>
<i>TP53INP1</i>	- <i>Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1</i>
TFR	- Receptor de transferrina
<i>TSG101</i>	- <i>Tumor susceptibility 101</i>
TSPAN	- Tetraspanina
UC	- Ultracentrifugação
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
<i>UTR</i>	- <i>Untranslated region</i>
VE	- Vesícula extracelular
VIL	- Vesículas intraluminais
<i>VPS</i>	- <i>Vacuolar protein sorting-associated protein</i>
<i>WB</i>	- <i>Western blotting</i>
RT-qPCR	- Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real
<i>ZNF81</i>	- <i>Zinc finger protein 81</i>
<i>WNT</i>	- <i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°	- grau Celsius
g	- força g
mA	- miliampere
mg	- miligrama
µg	- micrograma
mL	- mililitro
µL	- microlitro
mM	- milimolar
µm	- micrômetro
nm	- nanômetro
pg	- picograma
pH	- potencial hidrogeniônico
V	- volt

SUMÁRIO

SÍNTESE DO DOUTORAMENTO E ESTRUTURA DA TESE	20
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Objetivos	25
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	25
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Câncer Cervical	27
2.1.1 <i>Papilomavírus Humano (HPV)</i>	28
2.1.2 <i>HPV na Carcinogênese Cervical</i>	30
2.1.3 <i>HPV: Desenvolvimento de LIE e CC</i>	31
2.1.4 <i>Sistemas de Classificação – Histológico/Citológico</i>	33
2.1.5 <i>Cofatores na Carcinogênese Cervical</i>	35
2.2 MiRNAs	36
2.2.1 <i>Biogênese e Principais Funções</i>	37
2.2.2 <i>MiRNAs na Regulação da Expressão Gênica</i>	39
2.2.3 <i>MiRNAs no Contexto do CC</i>	40
2.2.4 <i>MiRNAs Circulantes no Câncer</i>	41
2.3 Biópsia Líquida	42
2.3.1 <i>Vantagens da Biópsia Líquida</i>	44
2.3.2 <i>Biópsia Líquida no Contexto do CC</i>	44
2.4 Vesículas Extracelulares (VEs)	46
2.4.1 <i>Biogênese e Classificação</i>	47
2.4.2 <i>Conteúdo e Função</i>	49
2.4.3 <i>miRNAs-VE no Contexto do CC</i>	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Metodologia	53
3.2 Amostras Biológicas – Aprovação Ética e Coleta	53
3.3 Classificação Das Amostras	55
3.4 Estratégias – Seleção de miRNAs-VE Candidatos	56
3.5 Isolamento da Fração Enriquecida em Exossomos	58
3.6 Caracterização das VEs Plasmáticas Isoladas	59
3.6.1 <i>Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)</i>	59

3.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	60
3.6.3 Western Blotting (WB)	60
3.7 Extração de miRNAs-VE	61
3.8 Síntese de cDNA e Quantificação por RT-qPCR	62
3.9 Análises Estatísticas	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 Caracterização das VEs Isoladas.....	64
4.2 Caracterização da Amostra Populacional Estudada	70
4.3 MiRNAs-VE Candidatos Seleccionados.....	84
4.3.1 <i>miR-10b-5p</i>	87
4.3.2 <i>miR-148a-3p</i>	89
4.3.3 <i>miR-155-5p</i>	90
4.3.4 <i>miR-181b-5p</i>	91
4.4 Quantificação Relativa dos miRNAs-VE Candidatos.....	92
4.4.1 <i>miR-10b-5p</i>	93
4.4.2 <i>miR-148a-3p</i>	95
4.4.3 <i>miR-181b-5p</i>	97
4.5 Potencial Diagnóstico dos miRNAs-VE Diferencialmente Quantificados	99
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
6 CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS.....	107
APÊNDICE 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ADICIONAL DESENVOLVIDA NO PERÍODO DE DOUTORADO RELACIONADA AO TEMA - RNAs NÃO- CODIFICADORES NO CONTEXTO DO CC.....	133
APÊNDICE 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ADICIONAL DESENVOLVIDA NO PERÍODO DE DOUTORADO RELACIONADA AO TEMA - RNAs NÃO- CODIFICADORES NO CONTEXTO DO CC.....	134
APÊNDICE 3 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DESENVOLVIDA NO PERÍODO DE DOUTORADO RELACIONADO AO TEMA DA TESE – BIÓPSIA LÍQUIDA	135
APÊNDICE 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HOSPITAL ERASTO GAERTNER	136
APÊNDICE 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – UBS NOSSA SENHORA APARECIDA	138

APÊNDICE 6 – QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS PARTICIPANTES DO ESTUDO EM AMBOS OS CENTROS DE SAÚDE PARTICIPANTES.....	140
APÊNDICE 7 – MATERIAL SUPLEMENTAR	142

SÍNTESE DO DOUTORAMENTO E ESTRUTURA DA TESE

Durante o período de doutoramento, teve-se como objetivo maior entender o papel dos RNAs – em especial RNAs não-codificadores (ncRNA) – no contexto do desenvolvimento do câncer cervical (CC), incluindo os estágios de lesões precursoras que o antecedem. Basicamente, duas linhas de pesquisa foram desenvolvidas, as quais são melhor descritas abaixo, assim como seus respectivos dados/artigos resultantes.

1) ***Identificação de redes de RNAs competidores endógenos (ceRNAs) em amostras tumorais/linhagens celulares***, resultando em:

- i. Artigo de revisão intitulado “***Competing Endogenous RNAs in Cervical Carcinogenesis: A New Layer of Complexity***”, publicado em 2021 no periódico *Processes (Special Issue: Biogenesis, Function and Role of MicroRNA in Cancer)*. Esta revisão sumariza diferentes redes de competição endógena – especialmente mediadas por RNAs longos não-codificadores (lncRNA) – envolvidas no processo de carcinogênese cervical, destacando seus principais impactos sobre vários processos celulares. Nela apresentam-se: predições *in silico* e estratégias *in vitro* que revelam diferentes interações entre diversas moléculas; resultados obtidos de estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstrando os impactos biológicos finais dessas respectivas moléculas/eixos ceRNA sobre processos moleculares e celulares importantes para a carcinogênese; além de dados experimentais obtidos através da avaliação dos perfis de expressão dessas diferentes moléculas em amostras de pacientes, corroborando o envolvimento das redes propostas na carcinogênese cervical. Adicionalmente, destacam-se alguns RNAs comuns a diferentes redes de competição endógena, incluindo os lncRNAs HOTAIR, MALAT1, NEAT1, OIP5-AS1 e XIST, assim como os miRNAs miR-140-5p, miR-143-3p, miR-148a-3p e miR-206. Ao final, ressalta-se o potencial uso desses diferentes RNAs, assim como das respectivas redes moleculares descritas (compostas por diferentes lncRNAs, miRNAs e mRNAs), no diagnóstico e/ou prognóstico do CC, assim como

sua potencial utilização como alvos terapêuticos no contexto do CC (APÊNDICE 1);

- ii. Artigo original intitulado “***Comprehensive analysis of ceRNA networks in HPV16- and HPV18-mediated cervical cancers reveals XIST as a pivotal competing endogenous RNA***”, publicado em 2021 no periódico *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*. A partir de dados de transcriptoma de amostras de CC (carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma) disponíveis no banco de dados público *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA), identificou-se, por análises de bioinformática, redes de ceRNA capazes de diferenciar tumores cervicais associados a diferentes tipos de Papilomavírus humano (HPV); em especial, tumores cervicais HPV16-positivos de tumores HPV18-positivos. Diferentes assinaturas moleculares foram descritas, destacando o lncRNA XIST como um ceRNA crucial, envolvido em diferentes redes de competição endógena, porém, com diferentes parceiros moleculares. Nos tumores cervicais HPV16-positivos, o XIST mostrou-se coexpresso com os mRNAs *LGR4* e *ZNF81*, compartilhando vários miRNAs pertencentes à família let-7. Por sua vez, em tumores HPV18-positivos, o XIST esteve coexpresso com os mRNAs *ADAM9* e *SLC38A2*, compartilhando vários miRNAs pertencentes à família miR-30. Adicionalmente, observou-se o impacto de diferentes redes de competição endógena na sobrevida global das pacientes com tumores cervicais mediados pelos distintos tipos de HPV (APÊNDICE 2).

2) ***Identificação de microRNAs (miRNAs) em vesículas extracelulares (VEs) isoladas a partir do plasma e da secreção cervical de pacientes com lesões precursoras/CC (Biópsia Líquida) e controles***, resultando em:

- i. Artigo de revisão intitulado “***From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis***”, publicado em 2019 no periódico *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*. Esta revisão traz um panorama geral sobre a pesquisa em miRNAs circulantes, livres ou associados a

VEs, envolvidos no processo de carcinogênese cervical. Logo após a infecção pelo HPV, mudanças no transcriptoma da célula hospedeira podem ocorrer, resultando em padrões específicos de expressão de miRNAs circulantes em diferentes estágios da doença cervical – desde lesões intraepiteliais escamosas (LIE) até o CC. Nesse artigo, apresenta-se uma visão geral sobre miRNAs celulares associados à infecção pelo HPV, assim como aos estágios de LIE e CC. Adicionalmente, apresenta-se o estado da arte envolvendo miRNAs livres e miRNAs associados a VEs (miRNAs-VE) envolvidos na carcinogênese cervical ou tumorigênese induzida pelo HPV. Por fim, destacam-se alguns miRNAs circulantes como potenciais biomarcadores para os estágios de LIE e/ou CC em diferentes compartimentos (sangue e cérvix uterina), reforçando-se também a necessidade urgente de esforços que contribuam para uma melhor compreensão deste campo de pesquisa (**APÊNDICE 3**);

- ii. Dados experimentais referentes à caracterização de VEs isoladas de plasma de mulheres brasileiras com LIE e CC, assim como à quantificação de miRNAs-VE candidatos, com o objetivo de encontrar biomarcadores destes diferentes estágios. Tais dados encontram-se minuciosamente descritos e formam o cerne da presente tese.

1 INTRODUÇÃO

Em conjunto com outros fatores, determinados vírus apresentam a habilidade de transformar células infectadas em células tumorais benignas ou malignas, estimulando o crescimento e a sobrevivência celular por diferentes mecanismos, estando diretamente envolvidos no desenvolvimento de um amplo espectro de manifestações clínicas em humanos, incluindo o câncer. Entre estes inclui-se o HPV, responsável por causar desde infecções não aparentes até neoplasias malignas (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2015).

Em mulheres, alguns tipos de HPV – denominados HPV de alto risco (HPV-AR) ou oncogênicos – estão intimamente relacionados ao processo de carcinogênese cervical. Estes estão ativamente envolvidos no desenvolvimento de lesões precursoras – de baixo (LIEBG) ou alto (LIEAG) grau – que precedem o CC, bem como no desenvolvimento do CC. Codificando diferentes oncoproteínas estritamente envolvidas na iniciação e progressão das lesões precursoras, estes DNA-vírus promovem o desenvolvimento tumoral, encontrando-se virtualmente presentes em 100% dos casos de CC; a infecção persistente por um HPV-AR é considerada fator crucial neste processo, desde o desenvolvimento de LIE até o estabelecimento do CC (BOSCH *et al.*, 2002; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Apesar da persistência do HPV ser necessária ao desenvolvimento de LIE e evolução ao estágio de CC, diz-se que esta não é suficiente, sendo necessária a ação de outros fatores em conjunto (MOODY; LAIMINS, 2010). No microambiente cervical, vários componentes parecem desempenhar funções importantes no estabelecimento da infecção pelo HPV, bem como a progressão para LIE e CC. Entre estes, incluem-se os miRNAs – pequenos ncRNAs, que exercem papel essencial na regulação da expressão gênica (BARTEL, 2004; GULYAEVA; KUSHLINSKIY, 2016). O papel de uma vasta gama de miRNAs no contexto do CC, desde a infecção por um HPV-AR até o estágio de CC, vem sendo consolidado nos últimos anos, estando estes diferencialmente expressos em diferentes graus de LIE e no CC, e ativamente envolvidos no processo de carcinogênese (GÓMEZ-GÓMEZ; ORGANISTA-NAVA; GARIGLIO, 2013; HE *et al.*, 2016; SAMMARCO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2014).

Além de presentes nos compartimentos teciduais, diferentes miRNAs podem também estar presentes em um amplo espectro de biofluidos, incluindo o plasma (WEBER *et al.*, 2010). Estes podem estar presentes tanto na sua forma livre

(ARMAND-LABIT; PRADINES, 2017; MONTANI; BIANCHI, 2016), quanto empacotados em vesículas liberadas pelas células – VEs (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018) –, compondo assim o *pool* de miRNAs circulantes em determinado biofluido. Uma vez acessíveis no plasma, por exemplo, e combinados a testes com especificidade e sensibilidade adequadas, estes miRNAs circulantes podem ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico de doença (CONDRAT *et al.*, 2020). Ademais, o conceito de “biópsia líquida” – que surgiu como uma nova abordagem que busca fornecer um panorama abrangente da dinâmica de determinado tumor através do material circulante derivado deste – inclui como material circulante derivado do tumor diferentes células e moléculas, incluindo miRNAs, tanto na sua forma livre, quanto empacotados em VEs (KELLEY; PANTEL, 2020; MADER; PANTEL, 2017).

Especialmente numa era em que a medicina de precisão/medicina personalizada tem crescido (BIANKIN; PIANTADOSI; HOLLINGSWORTH, 2015), algumas vantagens da biópsia líquida em contraste à biópsia “sólida” têm se destacado (BARDELLI; PANTEL, 2017; ILIÉ; HOFMAN, 2016; MADER; PANTEL, 2017). Além de ser uma modalidade não invasiva (ou minimamente invasiva) e de mais fácil acesso, esta pode ser realizada com maior frequência. De maneira geral, é proposto que informações referentes ao diagnóstico e prognóstico antes ou durante o tratamento, assim como durante a progressão da doença, sejam mais facilmente obtidas por biópsias líquidas (ZHANG *et al.*, 2017). Adicionalmente, a análise de material derivado de tumor presente no sangue, por exemplo, tende a contemplar de maneira mais heterogênea a biologia tumoral primária e metastática, tornando esta modalidade diagnóstica ainda mais atraente (AMELIO *et al.*, 2020). Custo e tempo reduzidos somam-se a estas vantagens. Todavia, apesar de todos os potenciais benefícios e “apostas” referentes à biópsia líquida, mais esforços são necessários para validar e padronizar as metodologias propostas antes do seu uso ser estabelecido na prática clínica (AMELIO *et al.*, 2020).

No contexto do CC, as ferramentas de diagnóstico mais difundidas para rastreamento de LIE/CC são o teste de Papanicolaou (exame citopatológico conhecido também como exame preventivo) e o teste de detecção do DNA de HPV por captura híbrida (DNA-HPV). Apesar de considerados minimamente invasivos, ambos exigem coleta a partir do exame ginecológico, cuja adesão é influenciada por questões socioeconômicas, culturais, éticas, religiosas, entre outros fatores (CAFFORIO *et al.*,

2021). Além disso, quando durante a realização do exame preventivo há suspeita de lesões, a paciente é então encaminhada à colposcopia e a biópsia convencional pode vir a ser realizada. Nesse cenário, uma abordagem baseada em biópsia líquida pode representar um modelo adicional (ou alternativo) interessante para o rastreamento, diagnóstico e acompanhamento de LIE/CC, assim como fornecer, em teoria, informações prognósticas e preditivas potenciais (CAFFORIO *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020). Dessa forma, torna-se pertinente a identificação e validação de potenciais novos biomarcadores em biópsia líquida para o diagnóstico de CC, assim como dos seus estágios precursores. Baseando-se nas evidências e fatos apresentados na seção anterior, propõe-se identificar e validar potenciais biomarcadores em biópsia líquida, os quais poderão vir a auxiliar no diagnóstico de diferentes graus de LIE e CC.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de miRNAs-VE plasmáticos candidatos como biomarcadores de diagnóstico de lesões precursoras e de CC a partir de amostras de controles e pacientes brasileiras.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Delinear e compreender o estado da arte relacionado à pesquisa sobre miRNAs circulantes (livres ou empacotados em VEs) como potenciais biomarcadores da carcinogênese cervical, desde o estágio de LIE até o CC;
- Selecionar, a partir de estratégia de bioinformática utilizando dados de bancos públicos e a partir de dados da literatura científica, potenciais miRNAs-VE candidatos para o diagnóstico de LIE e CC;
- Caracterizar a população de mulheres incluídas neste estudo (sem e com lesão no colo uterino, assim como diagnosticadas com CC) quanto a aspectos sociodemográficos, clínicos e relacionados à saúde global/saúde da mulher, e investigar se há diferenças quanto a estes entre os diferentes grupos avaliados;

- Avaliar se há diferença nos níveis de quantificação relativa dos diferentes miRNAs-VE plasmáticos entre os diferentes grupos avaliados;
- Avaliar o potencial diagnóstico dos miRNAs-VE candidatos, quanto à especificidade e à sensibilidade, individualmente ou em conjunto (caso apropriado).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer Cervical

O CC ou câncer do colo uterino se desenvolve no colo do útero ou cérvix uterina, estando intimamente relacionado à infecção por um HPV-AR, vírus oncogênico transmitido pelo contato sexual (DENNY, 2012; SCHIFFMAN *et al.*, 2007). É um dos cânceres mais comuns em mulheres em todo o mundo, ocupando o quarto lugar entre os mais comumente diagnosticados nesta população. Estima-se uma incidência global anual de mais de meio milhão de novos casos, sendo uma das principais causas de morte em mulheres (BRAY *et al.*, 2018; COHEN *et al.*, 2019; DENNY, 2012). Particularmente em países em desenvolvimento, onde as abordagens de prevenção primária (vacinação contra HPV) e secundária (rastreamento e tratamento de lesões pré-cancerosas) são deficitárias, limitadas pelo custo e questões culturais, o CC é a principal causa de morte por câncer entre mulheres (BEDELL *et al.*, 2020; BRAY *et al.*, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), poucas doenças refletem as desigualdades globais tanto quanto o CC. Quase 90% das mortes em 2018, por exemplo, ocorreram em países de baixa e média renda (SANKARANARAYANAN, 2014; WHO, 2020).

Em 2020, a OMS anunciou uma iniciativa global voltada para a eliminação do CC, por meio de estratégias de vacinação e rastreamento. A fim de eliminar o CC, propôs-se que todos os países devem alcançar e manter uma taxa de incidência inferior a quatro por 100.000 mulheres. Cada país deve cumprir algumas metas denominadas “90-70-90”, que se baseiam em três pilares principais e números a serem atingidos: 1) Vacinação - 90% das meninas totalmente vacinadas com a vacina contra o HPV aos 15 anos; 2) Triagem - 70% das mulheres triadas por meio de um teste de alto desempenho aos 35 anos e novamente aos 45; e 3) Tratamento - 90% das mulheres com lesões precursoras tratadas e 90% das mulheres com câncer invasivo tratadas (WHO, 2020).

No Brasil, o CC é o terceiro câncer mais incidente em mulheres, sendo a taxa de mortalidade no Brasil (6,17 mortes/ 100 mil habitantes) aproximadamente o dobro da média mundial (3,3 mortes/ 100 mil habitantes) (INCA, 2019; WHO, 2020). No país, esforços também têm sido conduzidos a fim de que os programas de rastreamento e, especialmente, de vacinação, sejam ampliados e melhor executados (MOURA;

CODEÇO; LUZ, 2020; WENDLAND *et al.*, 2021). Dados relacionados à eficácia do programa de vacinação universal com a vacina quadrivalente já mostram redução na prevalência dos tipos de HPV contemplados pela vacina – especialmente o HPV16 – somado à diminuição das taxas de infecção principalmente nas faixas etárias mais jovens (WENDLAND *et al.*, 2021).

De maneira geral, quando diagnosticado precocemente, e desde que tratado de maneira adequada e eficaz, o CC é altamente curável, sendo um dos tipos de câncer tratáveis com mais sucesso. Igualmente, tumores em estágios mais avançados também podem ser altamente responsivos aos diferentes tratamentos disponíveis, desde que o manejo destes seja célere e apropriado (CHARGARI *et al.*, 2021).

2.1.1 Papilomavírus Humano (HPV)

Os papilomavírus compõem um grupo heterogêneo de vírus, ocorrendo em animais, principalmente em mamíferos, e estando associado a diversas manifestações clínicas (DE VILLIERS *et al.*, 2004; GALLOWAY; LAIMINS, 2015). Dentre os diversos agentes infecciosos transmitidos sexualmente, os HPVs destacam-se como os mais comuns (GROSS, 2014). Estima-se que mais de 80% da população feminina e mais de 90% da população masculina sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida, geralmente antes dos 45 anos (CHESSON *et al.*, 2014; SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

Estes vírus são geralmente transmitidos pelo contato pele-pele, pele-mucosa ou mucosa-mucosa, apresentando tropismo por células epiteliais, em diversas localizações anatômicas. Apesar da relevância da transmissão sexual, outras formas de transmissão são conhecidas, como a transmissão vertical e a transmissão por autoinoculação (MOSCICKI *et al.*, 2012). Geralmente, a infecção se dá pela entrada de partículas virais através de lesões ou microabrasões na superfície do epitélio (STANLEY, 2010).

A família *Papillomaviridae* agrupa vírus de DNA dupla-fita, pequenos e circulares, de aproximadamente 50-52 nm de diâmetro, contendo o genoma viral de aproximadamente 8.000 pares de bases. Este é constituído por um segmento longo não-codificador denominado de LCR (do inglês, *long control region*), envolvido na transcrição e no controle de replicação; e por oito ou nove sequências de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*), divididas em duas regiões, uma de expressão

precoce (E) e outra de expressão tardia (L) (GALLOWAY; LAIMINS, 2015). Basicamente, a região E codifica as proteínas virais E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são necessárias para a replicação do DNA viral. Em conjunto, as proteínas E1, E2 e E4 são responsáveis pela amplificação e liberação viral, enquanto E5, E6 e E7 exercem efeito pró-tumoral. Por sua vez, a região L codifica as proteínas virais estruturais, L1 e L2, ambas expressas apenas em células superficiais infectadas, as quais liberarão novos virions. Enquanto L1 é a proteína principal do capsídeo, L2 é responsável por recrutar L1 para a montagem de novos virions. A expressão de L1 e L2, em geral, ocorre nas células diferenciadas, na parte superior do epitélio (BRAVO; FELEZ-SANCHEZ, 2015; NGUYEN; RAMÍREZ-FORT; RADY, 2014).

Diferentes tipos de HPV compartilham alguns elementos conservados, incluindo a presença da LCR, os genes de expressão precoce *E1* e *E2*, assim como os de expressão tardia *L1* e *L2* (DE VILLIERS *et al.*, 2004; GARCÍA-VALLVÉ; ALONSO; BRAVO, 2005). Adicionalmente, apesar de diferentes membros da família *Papillomaviridae* apresentarem proteínas homólogas, efeitos biológicos distintos são observados quando tipos diferentes de HPV são confrontados, especialmente quanto ao risco carcinogênico ou ao gênero envolvido (CHIESA *et al.*, 2016; GALLOWAY; LAIMINS, 2015). Tomando como base seu potencial carcinogênico, os HPVs podem ser classificados como de risco indeterminado (HPV-RI), baixo risco (HPV-BR) ou HPV-AR. Infecções com HPV-BR, também denominados de HPV não oncogênicos, podem causar anormalidades benignas, como verrugas genitais, enquanto HPV-AR atuam como agentes carcinogênicos biológicos (SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

Por sua vez, considerando o critério filogenético, os HPV são agrupados separadamente, levando à definição de níveis taxonômicos diferentes. Em geral, é possível definir um tipo distinto de HPV através da sequência *L1*, uma vez que este é o gene mais conservado dentro de todo o genoma viral (DE VILLIERS *et al.*, 2004). Se a sequência de *L1* variar mais do que 10% de qualquer tipo caracterizado, um novo tipo de HPV é definido. Adicionalmente, se a sequência de *L1* variar de 2-10% ou menos de 2%, um novo subtipo ou variante, respectivamente, é caracterizado (CHEN *et al.*, 2005; DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Adicionalmente, com base em determinadas propriedades biológicas e na organização do genoma, cinco gêneros de HPV foram estabelecidos: alfa-, beta-, gama-, mu- ou nu-papilomavírus, englobando 28 espécies e aproximadamente 40 tipos responsáveis por infectar o trato genital (DE VILLIERS *et al.*, 2004; DOORBAR

et al., 2012; NGUYEN; RAMÍREZ-FORT; RADY, 2014). Os alfa-HPV normalmente infectam a mucosa e estão associados a cânceres anogenitais, sendo que dentre estes encontram-se vários HPV-AR, como o HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 e HPV58 (apesar de alguns HPV-BR também se incluírem neste grupo, como o HPV42 e HPV54). Os beta-HPV, por outro lado, infectam o epitélio cutâneo (GALLOWAY; LAIMINS, 2015), tendo sua participação como cofatores no desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma descrita nos últimos anos (BANDOLIN *et al.*, 2020). Ainda, cânceres de cabeça e pescoço também têm sido descritos como intimamente associados à presença de HPVs de diferentes gêneros (alfa-, beta-e gama-HPVs). A exemplo, destaca-se o HPV16 como o tipo mais prevalente associado ao câncer de boca (ou de cavidade oral) (GARBUGLIA, 2014).

2.1.2 HPV na Carcinogênese Cervical

Diversos fatores estão envolvidos na carcinogênese cervical, sendo a presença de um HPV-AR fator indispensável (FORMAN *et al.*, 2012). O HPV16 destaca-se como o tipo mais predominante, estando presente em mais de 50% dos mais de 500.000 novos casos de CC diagnosticados anualmente (MUÑOZ *et al.*, 2003). Conjuntamente com o HPV18, é responsável pela maioria dos casos de CC (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Apesar do HPV16 apresentar elevado potencial carcinogênico, estima-se que menos de 5% dos indivíduos infectados venham a desenvolver câncer ao longo de suas vidas (GOLDIE *et al.*, 2003), padrão também observado para outros HPV-AR (GALLOWAY; LAIMINS, 2015). Estes apresentam diferenças notáveis em relação a outros tipos de HPV, as quais estão intrinsecamente associadas a habilidade destes em levar a célula hospedeira à malignização. Quando comparados a HPV-BR, por exemplo, os HPV-AR tendem a ser mais eficazes em promover diferentes efeitos biológicos nas células hospedeiras, em especial por ação de suas oncoproteínas (MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009).

Dentre as proteínas produzidas pelos HPV-AR, E5, E6 e E7 estão diretamente relacionadas com a iniciação e progressão do CC (ESTÊVÃO *et al.*, 2019). E5 atua modulando a atividade de diversas proteínas celulares, participando do efeito transformador do HPV, além de favorecer a atividade de E6 e E7 (DIMAIO; PETTI, 2013). Por sua vez, E6 se liga à p53, recrutando a ubiquitina ligase UBE3A (E6AP),

levando à poliubiquitinação de p53 e sua degradação pelo proteassoma. Como consequência, diversos processos celulares são afetados, levando à perda de reparo do DNA, inibição da apoptose, imortalização celular, perda da polaridade celular, entre outros efeitos (DOORBAR *et al.*, 2015; HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2009). Igualmente, E7 interage com distintas vias de sinalização celular. Esta se liga à proteína do retinoblastoma (pRB), liberando o fator de transcrição E2F, que se encontra normalmente ligado à pRB, promovendo progressão do ciclo celular. Entre os diversos efeitos produzidos direta ou indiretamente por ação de E7 estão hiperproliferação celular, reparo ineficiente do DNA, instabilidade genômica e inibição da apoptose (MOODY; LAIMINS, 2010; ROMAN; MUNGER, 2013).

Adicionalmente, um evento molecular crucial na carcinogênese cervical é a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2019; BURK *et al.*, 2017). Acredita-se que esta ocorra preferencialmente durante a progressão para LIEAG (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013), uma vez que, na maioria dos casos de LIEAG, a quase totalidade de células já tenha DNA viral integrado (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2019; HUDELIST *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2008). Este pode se integrar de maneira integral, ou se inserir como várias repetições em *tandem* no genoma da célula hospedeira (MCBRIDE; WARBURTON, 2017). Muitos esforços a fim de elucidar locais preferenciais de integração ao genoma do hospedeiro foram feitos (HU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2018, 2019d; LIU *et al.*, 2017b), e alguns locais com alta frequência de inserção já foram descritos, a exemplo do proto-oncogene *MYC* (ARACELI OYERVIDES-MUÑOZ *et al.*, 2018), um “regulador mestre” envolvido na regulação do crescimento e metabolismo celular (MILLER *et al.*, 2012). De maneira geral, o HPV se integra preferencialmente em locais de “fácil acesso”, como regiões transcricionalmente ativas (MCBRIDE; WARBURTON, 2017). Adicionalmente, pontos de quebra no genoma viral decorrentes da integração podem ocorrer, como nos genes *E1* (ARACELI OYERVIDES-MUÑOZ *et al.*, 2018) e *E2* (SCHMITZ *et al.*, 2012).

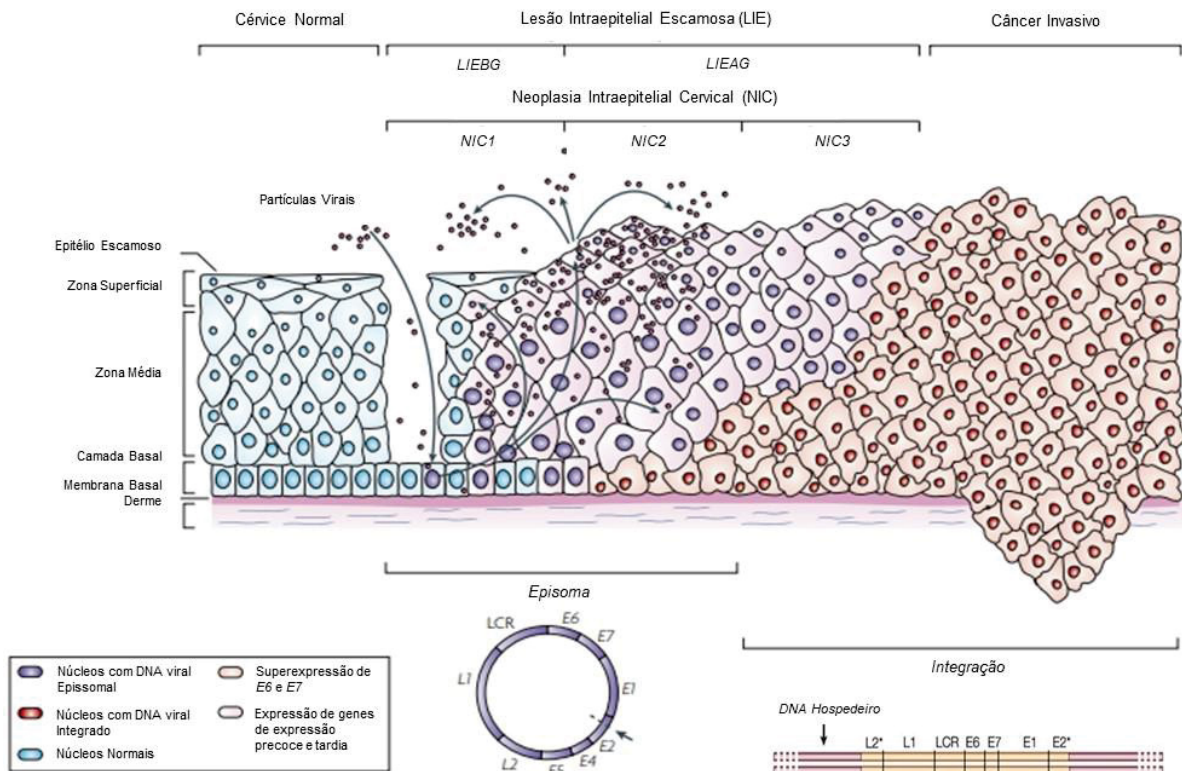
2.1.3 HPV: Desenvolvimento de LIE e CC

A medida em que ocorre a substituição fisiológica do epitélio glandular pelo epitélio escamoso na cérvix uterina – processo denominado metaplasia escamosa – uma grande área de tecido escamoso metaplásico é formada, caracterizando a zona de transformação, a qual é especialmente vulnerável à infecção pelo HPV (DOORBAR

et al., 2015). Apesar da infecção pelo HPV apresentar baixa frequência de persistência, quando esta ocorre, anormalidades na cérvix uterina são induzidas, consequentemente, aumentando o risco de desenvolvimento de lesões precursoras (BRAATEN; LAUFER, 2008).

Em geral, a progressão para o CC a partir de um estado pré-invasivo até o câncer invasivo propriamente dito, é um processo lento, levando anos ou até mesmo décadas para ocorrer (embora alguns casos evoluam em um curto período). Basicamente o processo de carcinogênese cervical é composto por três estágios: 1) infecção por um HPV-AR; 2) persistência desta e evolução para um estágio “pré-câncer”; 3) invasão. Todas essas etapas são necessárias, e nesta ordem. A ocorrência de CC é “virtualmente” impossível na ausência de infecção sexualmente transmissível (IST) por um HPV-AR, assim como o é na ausência de progressão intermediária para este estágio de “pré-câncer” (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

No microambiente cervical, em regiões de microabrasão, o HPV infecta células basais. Após a infecção por um HPV-AR, genes de expressão precoce (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*) são então expressos e o DNA viral ainda na forma episomal (segmento de DNA circular com capacidade de replicação) começa a se replicar. Nas camadas superiores do epitélio, a medida em que o genoma viral é replicado e os genes tardios *L1*, *L2* e *E4* são expressos, novas partículas virais são formadas e liberadas na mucosa cervical, podendo então infectar novas células adjacentes (SCHIFFMAN *et al.*, 2007; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). A progressão da infecção por um HPV-AR até o CC, passa por diversos estágios, sendo um processo multi-etapas, envolvendo diversas alterações, tais como desregulação do ciclo celular, superexpressão de genes oncogênicos, integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, entre outros (DOORBAR *et al.*, 2015; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007b; ZUR HAUSEN, 2002). A **FIGURA 1** esquematiza a progressão para o CC a partir da infecção pelo HPV, passando pelos estágios de lesões precursoras que o antecedem.

FIGURA 1 - PROGRESSÃO PARA O CÂNCER CERVICAL MEDIADA PELO VÍRUS HPV

LEGENDA: No microambiente cervical, em regiões de microabrasão, o HPV infecta células basais, iniciando sua replicação e a expressão de genes de expressão precoce (alguns envolvidos na replicação e liberação viral, como *E1*, *E2* e *E4*; outros como *E5*, *E6* e *E7*, que codificam as oncoproteínas virais do HPV). Nas camadas superiores, a medida em que o genoma viral é replicado e os genes tardios *L1* e *L2*, expressos, novas partículas virais são formadas e liberadas na mucosa cervical, podendo então infectar novas células adjacentes. Diferentes sistemas de classificação são adotados, entre eles o sistema que considera diferentes graus de NIC, incluindo os estágios de NIC1 (displasia leve, com apenas um terço do epitélio anormal), NIC2 (displasia moderada e até dois terços do epitélio anormal) e NIC3 (displasia severa ou CIS), estando toda a extensão do epitélio comprometida). Adicionalmente, outra classificação baseada em diferentes sistemas (Bethesda, classificação citológica; e LAST, classificação histológica) vem sendo amplamente utilizada. Esta classifica as lesões em LIEBG e LIEAG. Enquanto o LIEBG corresponde ao NIC1, o estágio de LIEAG engloba o NIC2 e NIC3. A progressão da infecção por um HPV-AR até o CC é um processo multi-etapas, envolvendo diversas alterações, entre eles a integração do DNA viral (inicialmente na forma episossomal) no genoma do hospedeiro. Este evento pode levar à ruptura de genes como *E2*, o que por sua vez, pode influenciar na regulação da expressão dos oncogenes *E6* e *E7*. CC, câncer cervical; CIS, carcinoma *in situ*; LAST, *Lower Anogenital Squamous Terminology Project*; LIE, lesão intraepitelial escamosa; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; NIC, neoplasia intraepitelial cervical. FONTE: Adaptado de Woodman *et al.*, 2007 e zur Hausen, 2002.

2.1.4 Sistemas de Classificação – Histológico/Citológico

Ao longo do tempo, distintos termos vêm sendo adotados por diferentes sistemas de classificação, tanto histológicos quanto citológicos, os quais evoluíram

separadamente. Em termos gerais, enquanto a classificação histológica caracteriza melhor o processo neoplásico e orienta o tratamento e manejo da doença, a citologia esfoliativa tem papel essencial na triagem, refletindo o provável estado histológico subjacente (SCHIFFMAN; SOLOMON, 2013; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

Alguns sistemas de classificação histológica foram adotados ao longo dos anos. Inicialmente, anormalidades celulares do colo do útero eram classificadas de acordo com o grau de displasia observado, sendo estes: leve, moderada, grave, carcinoma *in situ* (CIS) ou CC (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013). Posteriormente, foi proposta a classificação considerando diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), a qual perdura até hoje. Esta é caracterizada pela presença de arquitetura celular anormal, incluindo irregularidades nucleares, razão núcleo/citoplasma alterada e mitoses anormais. Sendo assim, classificam-se as lesões como NIC1 (displasia¹ leve e apenas um terço do epitélio anormal), NIC 2 (displasia moderada e até dois terços do epitélio anormal), NIC 3 (displasia severa ou CIS, estando toda a extensão do epitélio comprometida) e CC (BRAATEN; LAUFER, 2008; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

Posteriormente, com o avanço da pesquisa sobre a natureza da infecção pelo HPV, tornou-se evidente a não adequação completa dessa classificação: histologicamente o NIC1 tenderia a refletir a infecção aguda/transiente por HPV (porém com baixa sensibilidade e especificidade); enquanto o NIC2 se apresentaria como uma categoria “limítrofe” heterogênea entre a infecção aguda/transiente por HPV e o pré-câncer (NIC3) (CASTLE *et al.*, 2007; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013; STOLER; SCHIFFMAN, 2001). Adicionalmente, outras diferenças entre os estágios de NIC2 e NIC3 foram melhor caracterizadas, tendo o NIC2 maior probabilidade de regredir espontaneamente em comparação ao NIC3 (CASTLE *et al.*, 2009; WENTZENSEN *et al.*, 2009). Nesse ponto, apesar da nomenclatura histológica não ter formalmente mudado, era clara a tendência de se estratificar essas lesões em 2 estágios: de baixo grau, refletindo a infecção aguda por HPV; e de alto grau, caracterizando o estágio precursor do CC, destacando a necessidade de tratamento e intervenção para sua eliminação (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

¹ Displasia: caracterizada por crescimento e diferenciação celular anormais, levando ao aumento da proliferação, podendo haver perda de diferenciação celular.

Em 2012, após a conferência *LAST* (do inglês, *Lower Anogenital Squamous Terminology Conference*), uma nova nomenclatura foi proposta, considerando estes dois estágios de lesão (DARRAGH *et al.*, 2012). Esta toma como base outros parâmetros, incluindo a marcação histológica para a proteína p16, também conhecida como inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) ou p16^{INK4a}, a qual tem sua expressão aumentada por ação de E7 (MUNGER; GWIN; MCLAUGHLIN-DRUBIN, 2013; PAL; KUNDU, 2020). Assim, propôs-se que NIC2 com marcação imunohistoquímica positiva para p16 seja combinado ao NIC3, compondo as LIEAG; enquanto NIC2 com marcação negativa para p16 combinado ao NIC1, as LIEBG (DARRAGH, 2015). Desde então, esta classificação imunohistoquímica vem ganhando espaço.

Em relação à classificação citológica, por sua vez, dois sistemas de classificação já foram propostos: inicialmente a classificação Papanicolau (I, II, III, IV e V), porém não mais utilizada (SCHIFFMAN *et al.*, 2007; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013); e a classificação baseada no Sistema Bethesda (proposta em 1988, e revista em 2001 e 2014) (APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT, 2003; DAVEY *et al.*, 2004; NAYAR; WILBUR, 2015), sendo a classificação utilizada atualmente. A partir da citologia esfoliativa, quatro grandes grupos diagnósticos são propostos para anormalidades celulares escamosas: atipias celulares escamosas; LIEBG (incluindo NIC1); LIEAG (incluindo NIC2, NIC3 e CIS); e carcinoma de células escamosas (CCE) (NAYAR; WILBUR, 2015). De forma geral, o Sistema Bethesda parece ser o sistema de classificação que mais se adequou aos avanços recentes. Inclusive, este embasou a mudança reportada anteriormente referente à classificação histológica, lançando a estratégia de estratificação em 2 estágios (LIEBG e LIEAG). Hoje, esta é recomendada por diversas entidades, incluindo a OMS, para reportar achados histopatológicos (NAYAR; WILBUR, 2015).

2.1.5 Cofatores na Carcinogênese Cervical

Incontestavelmente, a infecção por um HPV-AR se apresenta como o principal fator envolvido na carcinogênese cervical. Todavia, apesar da presença do vírus ser necessária, esta não é suficiente, fato bem estabelecido na literatura. Isso se baseia no fato de que uma minoria de mulheres infectadas por um HPV-AR desenvolve lesões precursoras e de que um número menor ainda evolui para o CC. Assim, o CC

tende a ser resultado da ação conjunta de diversos fatores (NGUYEN; RAMÍREZ-FORT; RADY, 2014).

Cofatores comportamentais como idade precoce da primeira relação sexual, multiplicidade de parceiros sexuais e não uso de contraceptivos de barreira favorecem a transmissão viral. Por sua vez, o uso prolongado de contraceptivos hormonais orais, tabagismo, multiparidade e presença de determinados tipos de HPV-AR (como HPV16 e HPV18) estão associados a maior risco de desenvolvimento de LIE e CC (WANG *et al.*, 2009; WENTZENSEN *et al.*, 2009). Cofatores relacionados ao hospedeiro, e/ou associados a resposta deste à infecção viral, estão também associados à progressão de lesões cervicais e à transformação maligna (GUO; HUA, 2020). Variações genéticas em diferentes genes associados à resposta imune do hospedeiro ao vírus, por exemplo, modulam o risco de desenvolver CC, além de influenciar na progressão e sobrevida de pacientes com CC (NUNOBIKI *et al.*, 2011; MEHTA *et al.*, 2017).

Especialmente na última década, estudos revelaram aspectos antes desconhecidos, especialmente relacionados aos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento do CC (SAMMARCO *et al.*, 2020). Por consequência, a participação de novos cofatores foi somada aos mencionados acima. Dentre eles, a expressão desregulada de miRNAs, uma classe de pequenos RNAs que regulam a expressão gênica e exercem efeitos diversos sobre diferentes processos celulares, incluindo a apoptose e o ciclo celular, tem sido associada à carcinogênese cervical (HE *et al.*, 2016; MIAO *et al.*, 2020; PEDROZA-TORRES *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2019)

2.2 MiRNAs

A expressão desregulada de diferentes moléculas, incluindo miRNAs, parece desempenhar papel importante na transformação celular desde a infecção pelo HPV, até o desenvolvimento de LIE e CC (BERTI *et al.*, 2019; TORNESELLO *et al.*, 2020). Estes pequenos RNAs não codificadores emergiram como uma nova classe de RNAs reguladores, com relevância em processos celulares essenciais. Em 1993, estes foram pela primeira vez descritos como reguladores fundamentais para o desenvolvimento pós-embrionário de *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), e desde 2001 designados como miRNAs (ou microRNAs) (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001). Até 2019, sequências de miRNAs pertencentes a 271

organismos já foram descritas, totalizando aproximadamente 48.860 miRNAs maduros, derivados de mais de 38.589 moléculas precursoras. Desses, pelo menos 2.600 miRNA maduros, derivados de mais de 1.900 moléculas precursoras são descritas em humanos (BERTI *et al.*, 2019).

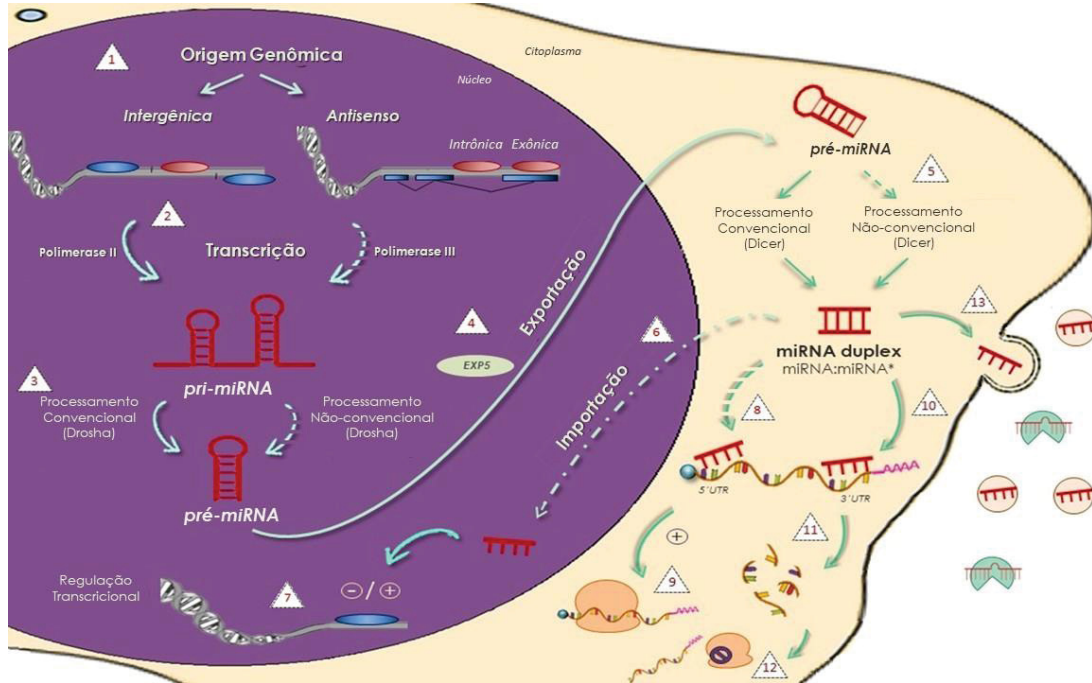
Os miRNAs destacam-se como uma classe de RNAs fita-simples, não codificadores, com 18-25 nucleotídeos de comprimento, que regulam a expressão gênica através da interação com a região 3' não traduzida (3'UTR, do inglês *3' untranslated region*) do RNA mensageiro (mRNA) alvo, impedindo a tradução ou promovendo a degradação do mRNA (BARTEL, 2004). Como consequência, acredita-se que um terço do transcriptoma humano seja regulado por miRNAs, o que pode significar a participação potencial dessas moléculas na regulação dos diferentes eventos biológicos (BERTI *et al.*, 2019).

2.2.1 Biogênese e Principais Funções

A biogênese dos miRNAs envolve um complexo sistema de proteínas. Basicamente, os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em um longo miRNA primário (pri-miRNA), o qual contém o *cap* 7-metilguanosina e a cauda poli (A). Posteriormente, ainda no núcleo, essa estrutura é clivada por um complexo proteico do qual fazem parte uma RNase III (Drosha) e a proteína Pasha ou *DGCR8* (do inglês, *DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein*) que apresenta um domínio de ligação para RNA dupla fita (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*). A clivagem resulta no miRNA precursor (pré-miRNA), com cerca de 70 nucleotídeos de comprimento, contendo um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura em grampo (ou *hairpin*). O pré-miRNA é exportado pela Exportina-5 (EXP5) para o citoplasma, onde é clivado pela Dicer, gerando um miRNA maduro. A Dicer é uma RNase III envolvida na incorporação de uma das fitas do miRNA ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), do qual faz parte a proteína Argonauta (Ago2) juntamente com outras proteínas. Este complexo permite o pareamento entre a fita do miRNA incorporada e a região complementar do mRNA alvo por complementaridade de bases. Normalmente, quando a complementaridade é total, ocorre degradação do mRNA; quando é parcial, a inibição da tradução ocorre (BARTEL, 2004, 2009, 2018). A **FIGURA 2** traz uma visão geral sobre a biogênese de

miRNAs, além de apresentar etapas alternativas às usualmente descritas. Somadas, estas refletem a complexidade da biogênese dessas moléculas.

FIGURA 2 - VISÃO ESQUEMÁTICA DA BIOGÊNESE DE miRNAs



LEGENDA: Setas cheias representam as vias usualmente descritas (canônicas), enquanto setas tracejadas representam vias alternativas que vêm sendo propostas (não canônicas). Convencionalmente, genes de miRNAs localizam-se em regiões intergênicas (tendo seus próprios promotores) ou em regiões intrônicas (compartilhando o promotor do gene no qual estão inseridos) (1), sendo estes comumente transcritos pela RNA polimerase II (2). Os pri-miRNAs são então processados pela Drosha em pré-miRNAs (3), sendo estes exportados do núcleo para o citoplasma pela EXP5 (4). Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é convertido em um duplex miRNA:miRNA* pela Dicer, gerando um miRNA maduro (5). Em geral, uma das fitas do miRNA é incorporada ao complexo RISC, permanecendo no citoplasma. Normalmente, a fita incorporada ao RISC tem como alvo a região 3'UTR de determinado mRNA alvo (10), levando à sua degradação (11) ou à inibição da tradução (12). Por fim, estes miRNAs podem ser secretados para o ambiente extracelular, ligados a proteínas transportadoras como Ago2 ou carregadas em VEs (13). Eventualmente, algumas etapas alternativas podem ocorrer como: genes de miRNAs podem ser originados da transcrição e processamento a partir da fita antisense (1), sendo transcritos pela RNA polimerase III (2); os pri-miRNAs podem ser processados pela Drosha em pré-miRNAs (3), assim como pela Dicer (5), por processamento alternativo. Pode haver também a importação de miRNAs maduros para o núcleo (6), local onde estes podem regular positivamente ou negativamente a transcrição de genes alvo (7), ou podem ainda permanecer no citoplasma ligando-se à região 5'UTR de determinado mRNA alvo, exercendo regulação pós-transcricional positiva, facilitando a tradução (9). O duplex miRNA:miRNA* é composto por duas fitas: a correspondente ao miRNA maduro (denominado de miRNA guia ou miRNA) e a fita complementar (denominada miRNA passageiro ou miRNA*), a qual é, em geral, degradada. Ago2, proteína Argonata; EXP5, Exportina-5; RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA; UTR, região não traduzida; VE, Vesículas Extracelulares. **FONTE:** Adaptado de Berti *et al.*, 2019.

2.2.2 MiRNAs na Regulação da Expressão Gênica

Conforme visto anteriormente, é bem estabelecida a atuação dos diferentes miRNAs no citoplasma e seu papel como importantes reguladores pós-transcricionais negativos, especialmente degradando mRNAs alvo ou regulando negativamente a tradução. É através desses mecanismos classicamente descritos que estas pequenas moléculas regulam até um terço dos genes humanos codificadores, controlando processos celulares fundamentais, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e metabolismo (GEBERT; MACRAE, 2018; O'BRIEN *et al.*, 2018). Todavia, mais recentemente, outras funções regulatórias associadas aos miRNAs vêm sendo descritas, a exemplo de sua ação transcricional quando estes permanecem ou retornam para o núcleo, incluindo silenciamento e ativação de genes, através da sua ligação a RNAs nascentes e regiões promotoras (LIU *et al.*, 2018).

Adicionalmente, apesar de considerados como elementos regulatórios “ativos”, enquanto seus mRNAs alvo são tidos como “alvos passivos”, novas evidências demonstram que essas moléculas podem ser alvo de outros RNAs, sendo protagonistas de redes de interação denominadas redes de competição endógena (SALMENA *et al.*, 2011). Nestas, participam diferentes transcritos denominados ceRNAs, incluindo RNAs longos não-codificadores (lncRNAs), mRNAs, pseudogenes e RNAs circulares (circRNAs). Estes ceRNAs competem por um determinado *pool* de miRNAs, através de sequências específicas, denominadas elementos de reconhecimento de miRNA (MRE, do inglês *microRNA response elements*). Tais sequências são comuns às diferentes moléculas competidoras e complementares à sequência específica presente no miRNA alvo, pelo qual estas têm potencial de competir (KARTHA; SUBRAMANIAN, 2014). Como consequência, o miRNA alvo fica impedido de exercer sua ação pós-transcricional negativa sobre seu(s) mRNA(s) alvo (SALMENA *et al.*, 2011).

A complexidade e dinamismo desse “novo” mecanismo, somada às novas descobertas relacionadas às potenciais funções pós-transcricionais positivas dos miRNAs, reforçam o quanto ainda é pouco compreendido o papel destes, assim como dos diferentes ncRNAs na regulação da expressão gênica. Apesar do grande volume de novas evidências, inúmeras lacunas precisam ainda ser preenchidas a fim de se elucidar por completo a função destas moléculas.

2.2.3 MiRNAs no Contexto do CC

Conforme mencionado, diferentes miRNAs regulam diversos processos celulares, sendo, conjuntamente, reguladores-chave na manutenção da homeostase de diferentes tecidos, órgãos e sistemas. Estudos avaliando a expressão diferenciada de miRNAs em diferentes órgãos e tecidos sugerem que os perfis de expressão de miRNAs são fortes indicadores da identidade tecidual, além da função de determinados miRNAs já ter sido relatada como órgão/tecido-específica em alguns casos (GUO *et al.*, 2014; LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2002). Por sua vez, a desregulação da expressão destes tem sido extensivamente associada a uma vasta gama de doenças, incluindo infecções virais e câncer (ARDEKANI; NAEINI, 2010; BARTEL, 2018; CONDRAT *et al.*, 2020).

Curiosamente, um único miRNA é capaz de controlar a expressão de centenas de genes codificadores de proteínas e modular um amplo espectro de funções biológicas como proliferação, diferenciação, reparo do DNA, adesão celular, sobrevivência, senescência e apoptose – processos fundamentais para a tumorigênese. Por conta disso, a desregulação da expressão dessas moléculas tem sido descrita como intimamente associada ao desenvolvimento e progressão de tumores (HATA; KASHIMA, 2016). Nesse contexto, esses miRNAs podem ser classificados como “oncomiRs” ou como miRNAs supressores tumorais. Enquanto os “oncomiRs” favorecem o processo tumoral, estando geralmente aumentados em determinados cânceres, os miRNAs supressores tumorais atuam inibindo processos relacionados à tumorigênese, tendo sua expressão diminuída nos tecidos tumorais. Adicionalmente, o mesmo miRNA pode atuar como oncomiR ou supressor tumoral em diferentes contextos celulares (SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016).

Inúmeros miRNAs já foram descritos como desregulados desde a infecção pelo HPV até a progressão para os estágios de LIE e CC (ABBAS *et al.*, 2021; BERTI *et al.*, 2019), impactando múltiplos processos celulares. Tal desregulação tem sido intimamente associada à patogênese cervical como um todo, desde o início e progressão para o CC, incluindo a ocorrência de metástase, até a resposta à terapia (radiossensibilidade e quimiossensibilidade) (ABBAS *et al.*, 2021; DWIVEDI *et al.*, 2021; MIAO *et al.*, 2020). A título de exemplo podemos citar a participação de alguns miRNAs no processo de carcinogênese cervical, como o oncomiR miR-155-5p, responsável por estimular a proliferação, migração, invasão e crescimento, assim

como por inibir a apoptose, favorecendo a progressão tumoral (LAO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2019a). Outro exemplo é o miR-148a-3p, descrito como miRNA supressor tumoral no contexto do CC, sendo responsável por inibir a proliferação, migração e invasão, enquanto induz a apoptose, inibindo assim a progressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2019b).

De maneira geral, tais padrões de desregulação refletem, portanto, o processo patológico presente em determinado tecido-órgão. Somado a isso, considerando que tais moléculas apresentam a maioria dos critérios exigidos para um biomarcador ideal, como acessibilidade, alta especificidade e sensibilidade, diferentes “perfis/assinatura de miRNAs” vêm sendo propostos na literatura especialmente na última década (CONDRAT *et al.*, 2020).

2.2.4 MiRNAs Circulantes no Câncer

Inicialmente, acreditava-se que miRNAs não poderiam ocorrer de forma estável em biofluidos como soro ou plasma, uma vez que RNAs, de maneira geral, tendem a ser rapidamente degradados pela presença de RNases quando no meio extracelular. Surpreendentemente, miRNAs extracelulares mostraram-se altamente estáveis, indicando que estes de alguma forma estariam protegidos da degradação por estas enzimas (SADIK *et al.*, 2018). Nas últimas duas décadas, evidenciou-se a presença de miRNAs circulantes em diferentes biofluidos (sangue, urina, saliva, leite materno, entre outros) (KAI; DITTMAR; SEN, 2018a; WEBER *et al.*, 2010).

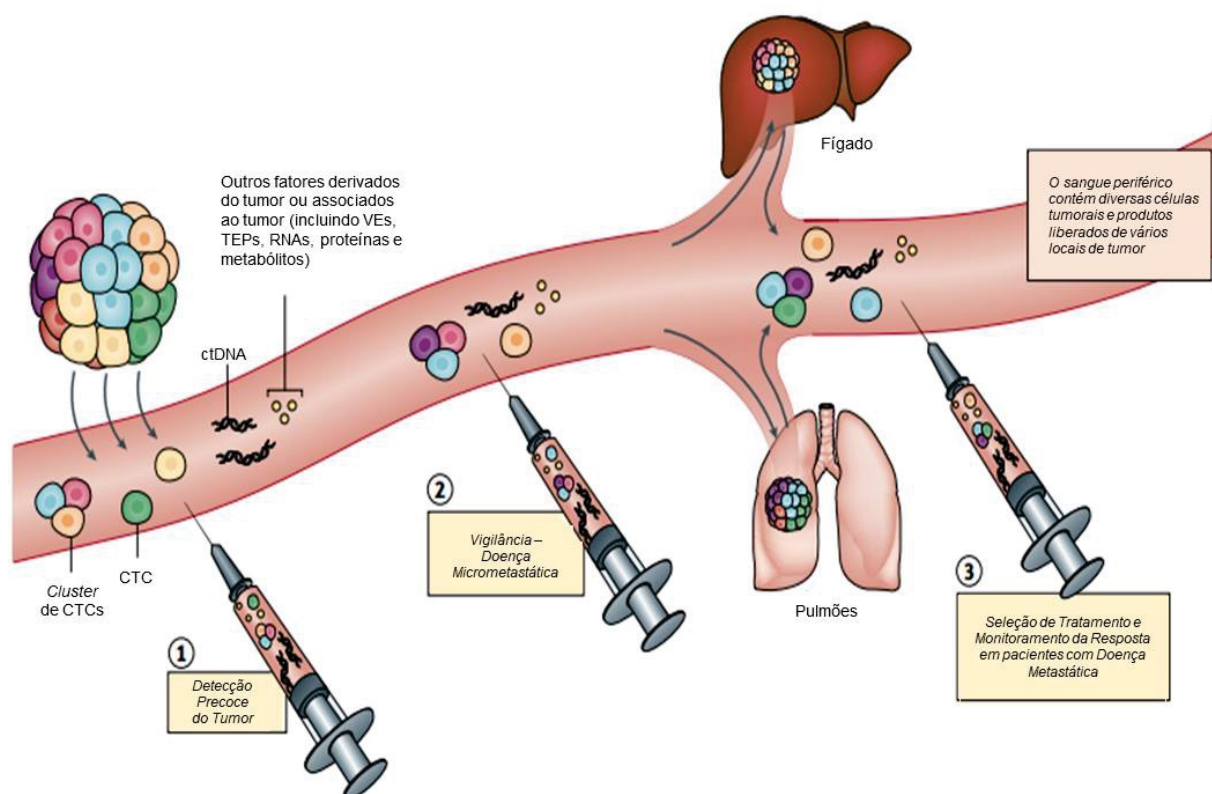
Basicamente, acredita-se que estes possam se originar de duas formas: 1) a partir de processos patológicos como dano tecidual, necrose ou apoptose, permanecendo em sua forma livre, porém associados a proteínas que conferem certa estabilidade e proteção aos mesmos, sendo então denominados miRNAs livres ou “cell-free” (MO *et al.*, 2012); ou 2) secretados de maneira seletiva para o ambiente extracelular dentro de VEs, especialmente em exossomos, sendo denominados miRNAs exossomais ou, de maneira geral, miRNAs-VE (KALLURI; LEBLEU, 2020). Juntos, miRNAs livres e miRNAs-VE compõe o *pool* circulante de miRNAs em determinado biofluido (KAI; DITTMAR; SEN, 2018b). Estima-se que aproximadamente 10% do conteúdo circulante de miRNAs esteja presente em exossomos, enquanto os outros 90% forme complexos com proteínas como a Ago2, a nucleofosfamina (NPM1), e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (ARROYO *et al.*, 2011; CONDRAT *et al.*,

2020; CORTEZ *et al.*, 2011; VICKERS *et al.*, 2011). Adicionalmente, ao *pool* de miRNAs circulantes somam-se outros componentes, compondo um *pool* “mais complexo”. Este é formado por diversos materiais derivados do tumor, os quais podem refletir a dinâmica deste e ser utilizado como estratégia diagnóstica/prognóstica (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021; KELLEY; PANTEL, 2020).

2.3 Biópsia Líquida

A partir da análise de diferentes materiais circulantes derivados de células tumorais, propôs-se o termo "biópsia líquida". Inicialmente focando em células tumorais circulantes (CTCs) ou fatores circulantes derivados de tumor, em particular, DNA tumoral circulante (ctDNA) ou DNA livre circulante (cfDNA) (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2010, 2019), atualmente este termo estende-se para diversas moléculas, incluindo subpopulações de plaquetas, assim como miRNAs livres ou vesiculares (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2021; AMELIO *et al.*, 2020; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021; ZHANG *et al.*, 2017). A **FIGURA 3** apresenta uma visão geral esquemática de possíveis aplicações da biópsia líquida.

Numa era em que a medicina de precisão/personalizada - que tem como foco o indivíduo baseando-se na utilização de testes genéticos, identificação de biomarcadores e desenvolvimento de terapia-alvo – vem crescendo, acompanhado de expressivo desenvolvimento tecnológico na área oncológica, a biópsia líquida surge como instrumento importante que tem alto potencial de auxiliar na implementação de estratégias terapêuticas individualizadas (FERNÁNDEZ-LÁZARO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017). Tida como uma das estratégias mais inovadoras e promissoras em oncologia médica, esta possui alto potencial como ferramenta de rastreamento e detecção precoce, além de permitir o acompanhamento em tempo real do estado do paciente após o diagnóstico, assim como durante e depois do tratamento (PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2019) .

FIGURA 3 - APLICAÇÕES CLÍNICAS DIVERSAS DE BIÓPSIA LÍQUIDA

LEGENDA: Uma única amostra de sangue pode conter uma variedade de tipos celulares e produtos derivados destas células, provenientes de vários locais de tumor em todo o corpo. A análise de materiais derivados do tumor – biópsia líquida – pode servir a vários propósitos no tratamento do câncer, como: (1) na detecção precoce de câncer (esta abordagem pode auxiliar também para investigar e esclarecer anormalidades detectadas em exames de imagem, como mamografia ou tomografia computadorizada de pulmão); (2) na vigilância para detecção de doença micrometastática, que pode surgir logo após tratamento do tumor primário, permitindo avaliar o risco de recorrência da doença e auxiliando no manejo adequado de doença recorrente, quando necessário; (3) na orientação em relação ao tratamento adequado (seleção da opção terapêutica mais apropriada para cada paciente), assim como acompanhamento de respostas ao tratamento, especialmente em pacientes com doença metastática (por meio da caracterização dinâmica de mudanças na carga tumoral e na biologia da doença observadas em biópsias líquidas). CTC, célula tumoral circulante; ctDNA, DNA tumoral circulante; TEPs, plaquetas “educadas” por tumor. FONTE: Adaptado de Ignatiadis *et al.*, 2021.

De maneira geral, o termo “biópsia líquida” (ou biópsia de fluido ou de fase fluida) é a amostragem e análise de material biológico não sólido, principalmente o sangue. Este, certamente, é o biofluido mais estudado e bem caracterizado até o momento no que diz respeito a biópsias líquidas (AMELIO *et al.*, 2020). Todavia, o termo pode ser igualmente estendido a diversos outros fluidos corporais, como saliva, urina, fluidos seminais e secreções, uma vez que nestes também podem ser detectados diferentes componentes tumorais (BARDELLI; PANTEL, 2017). Ainda não se sabe ao certo se estes refletem a dinâmica tumoral em sua totalidade como acredita-se que amostras de sangue circulante reflitam (MADER; PANTEL, 2017).

2.3.1 Vantagens da Biópsia Líquida

A biópsia líquida parece superar algumas limitações da “biópsia sólida” (convencional), tendo como principais vantagens: contemplar a heterogeneidade do tumor (diferentes subclones derivados do tumor são liberados na corrente sanguínea, por exemplo); ser de fácil acesso, especialmente no caso de alguns tumores, cujo acesso é muitas vezes limitado; poder ser realizada em tempo real e com maior frequência (amostras repetidas podem ser coletadas permitindo acompanhar resposta ao tratamento, por exemplo); ter baixo custo e requerer menos tempo para sua execução (CONDRAT *et al.*, 2020).

Adicionalmente, a combinação dessa abordagem não invasiva (ou minimamente invasiva), juntamente com o estudo das “ômicas” relacionadas (incluindo a genômica, transcriptômica e proteômica), levou a resultados promissores no mundo da oncologia moderna (AMELIO *et al.*, 2020). Apesar dos avanços notáveis alcançados nos últimos anos, até agora as análises em biópsia líquida raramente têm sido implementadas na rotina clínica. As aplicações clínicas relacionadas ao acompanhamento de pacientes diagnosticados com câncer, no sentido de prever recidivas e orientar a terapia estão se tornando mais evidentes, enquanto sua aplicação para a detecção precoce do câncer ainda permanece um desafio substancial (IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021).

2.3.2 Biópsia Líquida no Contexto do CC

No contexto do CC e das lesões que o precedem o uso de biópsias líquidas, especialmente a partir de sangue, pode representar uma estratégia bastante interessante. Apesar do rastreamento e diagnóstico de LIE e CC ser amplamente realizado através do exame preventivo, este apresenta baixa sensibilidade e reprodutibilidade (LIANG *et al.*, 2021); parâmetros que são “melhorados” quando realizado o exame preventivo em conjunto com o teste de detecção de DNA de HPV por captura híbrida (DNA-HPV). Todavia, essa é uma realidade em países desenvolvidos, mas não em países em desenvolvimento, como o Brasil. Adicionalmente, em países de baixa e média renda, questões socioeconômicas, culturais, religiosas, entre outras, tornam ainda mais difícil o rastreamento do CC. Nesse cenário, o uso de biópsias líquidas a partir de amostras de sangue,

principalmente, pode se tornar uma alternativa em situações particulares, tanto no rastreamento, quanto no diagnóstico e acompanhamento de LIE e CC (CAFFORIO *et al.*, 2021).

De acordo com o material analisado, diferentes aplicações, assim como vantagens e desvantagens, são propostas. Por exemplo, a análise de CTCs em biópsia líquida a partir de plasma de pacientes com LIE ou CC traz como vantagem a possibilidade de se visualizar células intactas, as quais poderiam ser caracterizadas morfolologicamente e imunofenotipicamente (PAN *et al.*, 2019). Em pacientes com CC, por exemplo, a contagem de CTCs poderia ser associada ao estadiamento do tumor (PAN *et al.*, 2019), ter valor prognóstico (DU *et al.*, 2020; TEWARI *et al.*, 2020; WEN *et al.*, 2018), e auxiliar na seleção do tratamento (CHUNG *et al.*, 2017). Dentre as limitações, pode-se ressaltar a falta de padronização, especialmente pré-analítica, a qual pode refletir na contagem limitada destas células (CAFFORIO *et al.*, 2021; NEUMANN *et al.*, 2018). Adicionalmente, o potencial uso de ctDNA (ou cfDNA) como estratégia diagnóstica e prognóstica, assim como ferramenta no monitoramento da resposta ao tratamento (CABEL *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2019) e ocorrência de metástase (KANG *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2021) também vem sendo avaliado. A análise de DNA-HPV circulante como biomarcador do CC também vem sendo proposta (CHEUNG *et al.*, 2019; PORNTHANAKASEM *et al.*, 2001), tendo este alta sensibilidade e moderada especificidade (GU *et al.*, 2020).

Mais recentemente, o uso de miRNAs vesiculares, como os presentes em exossomos, no rastreamento de lesões precursoras e CC vem sendo estudado e proposto (ACEVEDO-SÁNCHEZ *et al.*, 2021; CHIANTORE *et al.*, 2020; NAHAND *et al.*, 2020; SADRI NAHAND *et al.*, 2020). Considerando que, em termos gerais, estes são altamente estáveis, tendo elevada sensibilidade e especificidade, aposta-se no potencial destes como promissores biomarcadores de diagnóstico e progressão. Todavia, ainda são muitas as limitações relacionadas à falta de padronização quanto ao isolamento de VEs em geral, assim como relacionadas à quantificação das moléculas presentes nestas, incluindo os miRNAs-VE (CONDRAT *et al.*, 2020; NAHAND *et al.*, 2020), tornando evidente a necessidade de grandes esforços a fim de validar e padronizar as metodologias propostas antes de seu uso clínico.

2.4 Vesículas Extracelulares (VEs)

Há tempos é conhecida a capacidade de determinadas células especializadas liberarem no meio extracelular vesículas contendo moléculas como hormônios ou neurotransmissores (DUNANT, 1994; HUTTNER *et al.*, 1995). Todavia, apenas mais recentemente, consolidou-se a ideia de que todas as células são virtualmente capazes de secretar diferentes tipos de vesículas com conteúdo heterogêneo, sendo essas conhecidas como VEs. Este processo, apesar de descoberto recentemente, é um mecanismo conservado ao longo da evolução, presente tanto em bactérias quanto em eucariontes (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012).

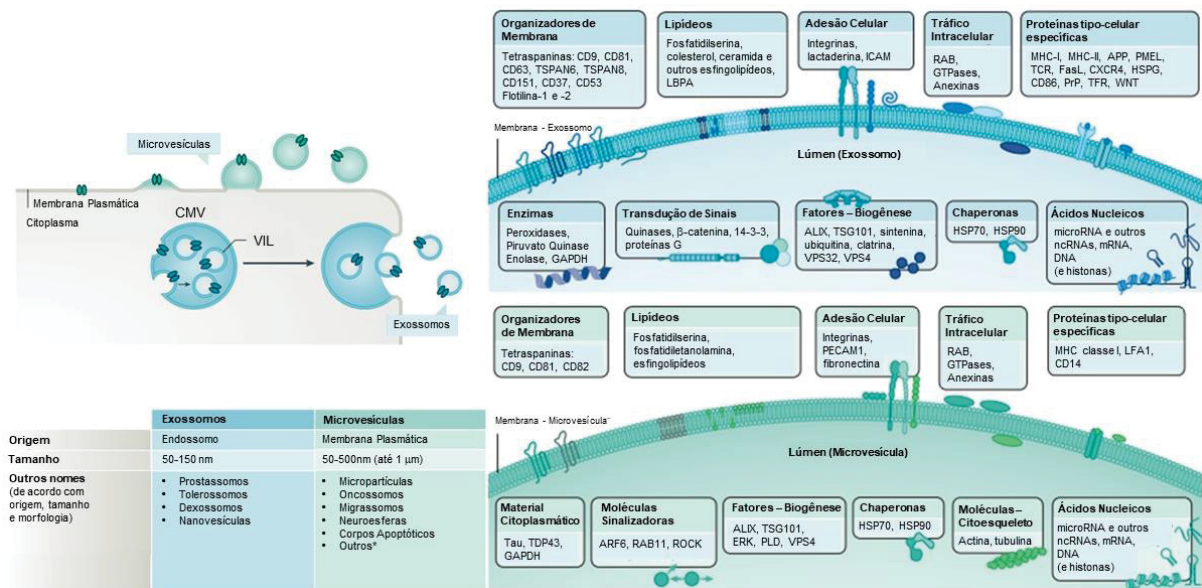
Estas foram inicialmente descritas na década de 80, como sendo liberadas a partir de células sanguíneas (ALLAN; THOMAS; LIMBRICK, 1980) e linhagens celulares neoplásicas (TRAMS *et al.*, 1981). Inicialmente, acreditava-se que estas eram meros carreadores de moléculas “não mais necessárias” às células que as secretavam. Porém, diversos estudos subsequentes revelaram a importância dessas nanopartículas e seu papel crucial na sinalização celular de diferentes processos biológicos (LO CICERO; STAHL; RAPOSO, 2015). Em 2007, por exemplo, a transferência de miRNAs e mRNAs mediada por VEs, como um “novo” mecanismo de troca genética entre células foi demonstrada (VALADI *et al.*, 2007).

Na sequência, inúmeros trabalhos foram publicados consolidando a ideia de que diferentes moléculas, incluindo miRNAs, são carreados por VEs, estando ativamente envolvidos na comunicação intercelular e transdução de sinais em diversos fluidos biológicos, desempenhando assim papel crucial no desenvolvimento, progressão e evolução de tumores (DAI *et al.*, 2020; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). A participação de VEs em diversos processos biológicos tem sido relatada na literatura, tanto em condições fisiológicas (sinalização do sistema imune, coagulação sanguínea, manutenção de células tronco, reparo tecidual e processos de sinalização), quanto em condições patológicas, incluindo infecções virais e câncer. Como consequência, estas têm sido consideradas potenciais biomarcadores de diagnóstico/prognóstico em condições patológicas, até mesmo pelo seu próprio conteúdo genético, incluindo a presença de miRNAs (DOYLE; WANG, 2019).

2.4.1 Biogênese e Classificação

Basicamente, as VEs caracterizam-se como um grupo heterogêneo de estruturas derivadas da membrana celular, compreendendo subpopulações distintas (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Por conta de sua origem, estas são compostas por uma bicamada lipídica, sendo naturalmente secretadas por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células tumorais (MINCIACCHI; FREEMAN; DI VIZIO, 2015). Baseado no conhecimento corrente sobre sua biogênese, atualmente as VEs são divididas em duas categorias principais: exossomos e microvesículas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Ao *pool* de VEs somam-se outras estruturas adicionais, como os corpos apoptóticos. A medida em que a pesquisa relacionada à biogênese, morfologia e composição das VEs, assim como estudos relacionados à função destas, avança, a nomenclatura das mesmas sofre alterações e adequações (THÉRY *et al.*, 2018; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

De maneira geral, os exossomos possuem dimensão entre 50-150 nm (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018) [variações referentes a este intervalo são encontradas na literatura, como entre 30-150 nm (DOYLE; WANG, 2019), ou entre 40-160 nm (DAI *et al.*, 2020), por exemplo], sendo resultantes da fusão dos corpos multivesiculares do último compartimento endossomal com a membrana celular, seguido de liberação no meio extracelular. Podem também apresentar nomes alternativos, de acordo com a célula de origem, seu tamanho ou mesmo sua morfologia, apesar de o termo “exossomo” ser o mais aceito e usual na literatura atual (DAI *et al.*, 2020; DOYLE; WANG, 2019; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Por sua vez, as microvesículas apresentam dimensão entre 50-500 nm em média (variações referentes a este intervalo também são encontradas na literatura, como entre 100-1000 nm, por exemplo), sendo vesículas oriundas da membrana plasmática. Podem também ser denominadas micropartículas, oncossomos, entre outros nomes (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Detalhes relacionados à biogênese destas VEs são mais bem descritos na revisão feita por van Niel *et al.* (2018). A **FIGURA 4** apresenta características gerais das VEs.

FIGURA 4 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

LEGENDA: VEs são formadas a partir da membrana celular (microvesículas) ou resultantes da fusão dos corpos multivesiculares do último compartimento endossomal com a membrana celular (exossomos), seguido de liberação no meio extracelular. Exossomos e microvesículas variam não apenas quanto à origem, mas também tamanho. Exossomos têm em média de 50-150 nm, enquanto microvesículas têm tamanho médio de 50-500 nm (podendo medir até 1 µm). Diferentes subpopulações de VEs podem transportar várias moléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, incluindo miRNAs; podendo este conteúdo variar de acordo com o tipo celular e condições a que tais células se encontram expostas. Acredita-se que a composição específica afeta diretamente o destino e a função das respectivas VEs, destacando a importância dos mecanismos de carregamento seletivo das mesmas. Adicionalmente, sabe-se que, dependendo do tipo celular, as VEs liberadas por este tendem a exibir um conjunto de proteínas específico em sua membrana, o qual está igualmente associado ao destino dessas VEs, assim como às funções específicas que estas executarão. Apesar de diferentes mecanismos de biogênese, exossomos e microvesículas apresentam aparência semelhante, tamanho sobreposto e composição frequentemente comum. *Outros nomes sem tradução bem definida ainda em português (*blebbing vesicles*; *shedding vesicles*; *ARMMs*, *arrestin-domain-containing protein 1-mediated microvesicles*). ALIX, *ALG-2 interacting protein X*; APP, proteína precursora amiloide; ARF6, *ADP-ribosylation factor 6*; CMV, corpo multivesicular; CXCR4, receptor 4 de quimiocina CXC; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GTP, trifosfato de guanossina; HSP, proteína de choque térmico; HSPG, proteoglicano de heparam sulfato; ICAM, molécula de adesão intercelular; LBPA, ácido lisobisfosfatidil; LFA1, antígeno-1 associado à função linfocitária; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; PECAM1, molécula-1 de adesão celular endotelial a plaquetas; PLD, fosfolipase D; PMEL, *premelanosome protein*; PrP, proteína priônica; ROCK, proteína quinase associada a Rho; TCR, receptor de célula T; TDP43, proteína de ligação ao DNA TAR 43; TFR, receptor de transferrina; TSG101, tumour susceptibility gene 101 protein; TSPAN, tetraspanina; VIL, vesículas intraluminais; VPS, *vacuolar protein sorting-associated protein*; WNT, *wingless-type MMTV integration site family*. FONTE: Adaptado de van Niel *et al.*, 2018.

Conforme demonstrado na **FIGURA 4**, a membrana dos exossomos é rica em moléculas. Nela, incluem-se diversas proteínas encontradas amplamente em exossomos, como as tetraspaninas CD63, CD9 e CD81, entre outras; assim como proteínas específicas para diferentes tipos celulares. Adicionalmente, lipídeos e

moléculas de adesão, como integrinas e caderinas, podem também ser encontradas na membrana dessas nanopartículas.

2.4.2 Conteúdo e Função

Na literatura, é bem estudado e consolidado o fato de exossomos carregarem uma variedade de moléculas em seu lúmen, incluindo proteínas, mRNAs, miRNAs e lncRNAs, entre outros. Estes são secretados por uma vasta gama de células e, após sua liberação no meio extracelular, podem se romper e liberar seu conteúdo no meio extracelular, ou permanecer intactos, aptos a interagirem com células alvo tanto à curta, quanto à longa distância. Tais interações podem ocorrer de forma direta ou por diferentes tipos de endocitose. Os exossomos estão presentes em todos os fluidos biológicos investigados até o presente momento (ELEWAILY; ELSERGANY, 2021), inclusive no fluido cérvico-vaginal (ELLWANGER; VEIT; CHIES, 2017).

A diversidade do conteúdo exossomal parece traduzir a ampla variedade de funções biológicas exercidas por estas VEs. Comunicação celular e transporte de biomoléculas estão, sem dúvida, entre suas funções mais importantes. Todavia, receptores celulares, moléculas de adesão, citocinas e outras moléculas de sinalização celular podem também ser transportadas através de exossomos, demonstrando seu potencial papel imunomodulador e regulador de diversas funções biológicas (DAI *et al.*, 2020; SIMONS; RAPOSO, 2009; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). O envolvimento dessas VEs no microambiente tumoral, regulando crescimento, angiogênese, entre outras funções, assim como sua interação com sítios mais distais, participando de processos como migração, invasão e metástase, vêm sendo amplamente descrito e têm sido cada vez melhor compreendido (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Por conta da sua natureza, sendo seletivamente empacotados, somado ao seu efeito “pleiotrópico”, os exossomos têm ganhado grande atenção da comunidade científica, se destacando como “protagonistas” no processo de carcinogênese e estratégia diagnóstica e prognóstica promissora no contexto do câncer em geral, inclusive com potencial terapêutico (DAI *et al.*, 2020).

Em relação ao conteúdo das microvesículas, novas evidências vêm demonstrando que estas podem conter não apenas proteínas e lipídeos derivados da membrana plasmática, como acreditava-se anteriormente; a presença de diferentes ácidos nucleicos, incluindo miRNAs, pequenos RNAs de interferência e lncRNAs tem

sido descrita (CHEN; LI; LIU, 2018; TURCHINOVICH; DRAPKINA; TONEVITSKY, 2019). Acredita-se que a presença deste conteúdo seja aleatória, reflexo do mecanismo de biogênese desta subpopulação, e portanto não seletiva (LO CICERO; STAHL; RAPOSO, 2015). De qualquer forma, ela tende a refletir o conteúdo celular de um dado momento, e uma dada condição fisiológica ou patológica. Igualmente, funções associadas à comunicação intercelular não são tão bem descritas para microvesículas, porém, uma vez que as mesmas carregam componentes de suas células mãe, estas podem exercer efeitos como imunoregulação e transdução de sinais (CHEN; LI; LIU, 2018).

Adicionalmente, acredita-se que cada tipo celular libere VEs de acordo com o estado fisiológico ou patológico. Muitos esforços estão sendo conduzidos a fim de melhor isolar e caracterizar diferentes subpopulações de VEs, e consequentemente caracterizar adequadamente o conteúdo destas em diferentes momentos/situações biológicas (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Dessa maneira, será possível elucidar mais precisamente os mecanismos subjacentes associados a diferentes conteúdos vesiculares.

2.4.3 *miRNAs-VE no Contexto do CC*

Apesar dos avanços recentes, a pesquisa envolvendo miRNAs-VE no contexto do CC ainda é bastante inicial. Praticamente todos os artigos publicados até o presente momento investigaram o papel de miRNAs exossomais na carcinogênese cervical ou tumorigênese HPV-mediada/induzida, incluindo abordagens *in vitro* e *in vivo*. Apenas uma publicação demonstrou a participação de um miRNA presente em microvesículas derivadas de uma linhagem de CC neste processo. Nela, demonstrou-se que a modulação da expressão dos genes *E6/E7* regula, por sua vez, a expressão do miR-377 em microvesículas derivadas de células cervicais tumorais. Demonstrou-se, ainda, que a cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) na presença de microvesículas superexpressando miR-377 levou à inibição da angiogênese, entre outros efeitos (ZHANG *et al.*, 2020).

Em relação ao papel dos exossomos no contexto do CC, até meados de 2019, poucos estudos investigando o envolvimento de miRNAs exossomais haviam sido publicados, sendo a grande maioria destes estudos realizada com experimentos *in vitro*. Apenas um estudo envolvendo material biológico de pacientes (fluido cérvico-

vaginal) havia sido publicado até então. Neste, os níveis exossomais de dois oncomiRs – miR-21 e miR-146a – foram avaliados em controles sem CC e sem HPV, em pacientes sem CC e HPV-positivos, assim como em pacientes com CC e HPV-positivos. Ambos miRNAs foram significativamente mais abundantes em exossomos derivados do fluido cérvico-vaginal de pacientes com CC em comparação aos outros grupos. Adicionalmente, os níveis destes foram maiores no grupo HPV-positivo em comparação ao grupo HPV-negativo, sugerindo a importante contribuição da infecção viral na regulação dos níveis destes miRNAs exossomais (LIU *et al.*, 2014). Detalhes sobre os estudos mencionados acima são mais bem descritos na revisão de literatura apresentada no **APÊNDICE 3**.

Mais recentemente, novos trabalhos avaliando a expressão e/ou o papel de diferentes miRNAs exossomais *in vitro* (tecido ou linhagens celulares cervicais) reforçaram a participação destes em diferentes processos biológicos como invasão, migração, angiogênese e metástase (WU *et al.*, 2019; YOU *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2019a). De maneira semelhante, novas publicações investigando os níveis e/ou papel de miRNAs exossomais em materiais clínicos diversos (plasma, soro e fluido cérvico-vaginal) somaram-se a estes.

Objetivando-se identificar miRNAs exossomais candidatos a fim de auxiliar no rastreamento do CC e de LIE, Zheng *et al.* (2019) sequenciaram o conteúdo exossomal plasmático de voluntárias sem lesão e de pacientes com LIE ou CC. Em seguida, propuseram um painel com oito miRNAs exossomais capaz de diferenciar voluntárias saudáveis/pacientes com LIEBG de pacientes com LIEAG/CC. Por fim, os miRNAs exossomais let-7d-3p e miR-30d-5p destacaram-se como potenciais biomarcadores de diagnóstico, sendo estes significativamente menos abundantes em amostras LIEAG/CC em relação a amostras controle/LIEBG (ZHENG *et al.*, 2019).

Posteriormente, Lv *et al.* (2021) sequenciaram o conteúdo exossomal de plasma de controles e pacientes com CC. Ao total, 39 miRNAs exossomais foram reportados como diferencialmente quantificados entre os dois grupos. Posteriormente, o miRNA exossomal miR-125a-5p foi selecionado para validação em um grupo maior de participantes, sendo seus níveis significativamente mais baixos em pacientes com CC em relação a controles, sugerindo seu potencial valor para diagnóstico do CC (LV *et al.*, 2020).

Recentemente, Zhou *et al.* (2021) reportaram o papel do miRNA exossomal miR-1468-5p, derivado de células tumorais cervicais, na promoção da angiogênese,

interagindo com uma vasta gama de moléculas e células adjacentes. Além de propor um mecanismo de comunicação intercelular mediada por este miRNA, os autores também reportaram a quantificação diferencial do miR-1468-5p em exossomos derivados do soro de voluntárias sem CC e com CC (sendo a quantificação maior em pacientes com CC em relação a controles). Além disso, o nível de quantificação sérica exossomal deste miRNA foi também associado a parâmetros clínicos importantes, sendo a maior quantificação do miR-1468-5p associada ao pior prognóstico em pacientes com CC (ZHOU *et al.*, 2021b).

Adicionalmente, mudanças nos níveis de miRNAs presentes em exossomos derivados de fluido cérvico-vaginal foram observadas em resposta à infecção pelo HPV16. Um total de 100 miRNAs exossomais foi diferencialmente quantificado entre amostras HPV16-negativas e HPV16-positivas. Diferentes miRNAs tiveram níveis aumentados (incluindo o miR-6865-5p, miR-3190-3p, miR-6815-5p e miR-802) ou diminuídos (incluindo o miR-363-5p, miR-548-5p, miR-621 e miR-645) em amostras HPV16-positivas quando comparadas a amostras HPV16-negativas, evidenciando mais uma vez a influência da infecção viral (nesse caso, pelo HPV16) sobre o transcriptoma da célula hospedeira, e sobre os miRNAs exossomais empacotados e liberados pela mesma. Curiosamente, análises *in silico* subsequentes demonstraram que muitos desses miRNAs parecem estar ativamente envolvidos em vias cruciais para a tumorigênese cervical (WU *et al.*, 2020).

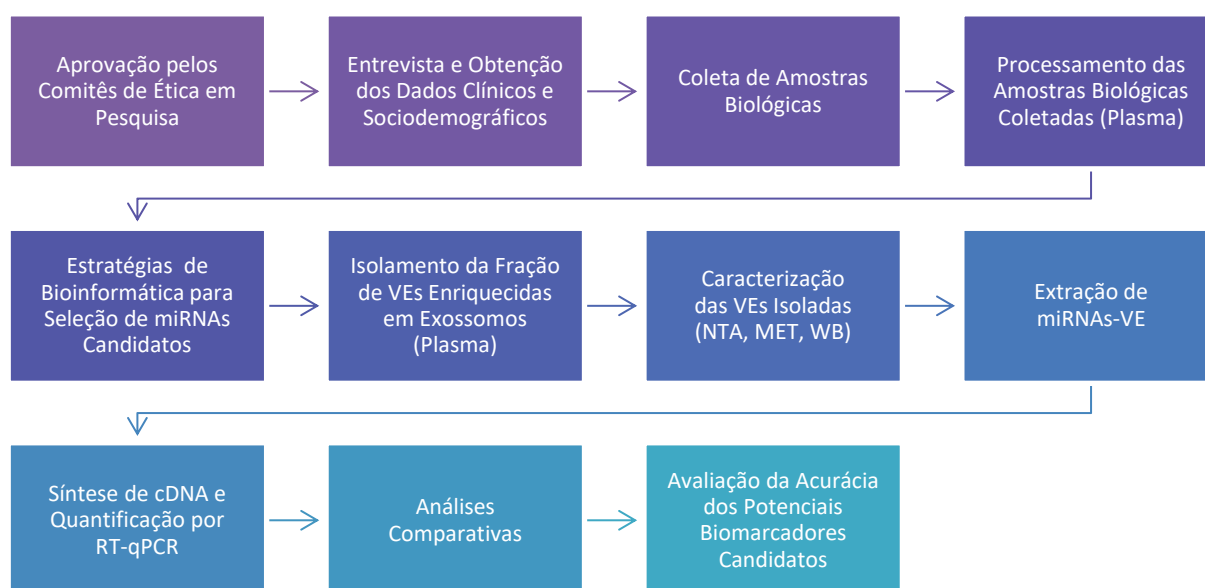
Ainda, outros trabalhos apresentando evidências de associação entre níveis desregulados de miRNAs exossomais isolados do soro (ZHOU *et al.*, 2021a) ou plasma (CHO; KIM; CHEONG, 2021a, 2021b) e parâmetros clínicos, como resposta ao tratamento, progressão e metástase, foram recentemente publicados. Considerando-se conjuntamente tais evidências, é possível perceber o potencial desses miRNAs-VE no contexto do CC como um todo, seja como potenciais biomarcadores de diagnóstico, progressão e resposta ao tratamento, seja como moléculas funcionalmente ativas no microambiente tumoral cervical e sistemicamente distribuídas. Nesse sentido, os miRNAs-VE representam um campo de estudo promissor para o avanço do entendimento e manejo do CC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 METODOLOGIA

De maneira geral, a metodologia utilizada na presente tese seguiu os passos apresentados abaixo (**FIGURA 5**), sendo estes mais bem detalhados ao longo dos tópicos apresentados na sequência.

FIGURA 5 - ETAPAS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



LEGENDA: cDNA, DNA complementar; MET, Microscopia Eletrônica de Transmissão; NTA, Análise de Rastreamento de Nanopartículas; PCR, reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR, transcrição reversa seguida de PCR Quantitativa em Tempo Real; VE, vesículas extracelulares. WB, *Western Blotting*. FONTE: A autora (2022).

3.2 Amostras Biológicas – Aprovação Ética e Coleta

Durante o período de doutoramento, realizou-se a coleta de amostras biológicas, dando início à construção do banco de amostras de plasma, soro e secreção cervical de controles e pacientes com lesões precursoras/CC, do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH). Os dados apresentados nesta tese resultam da avaliação de parte dessas amostras. As coletas foram realizadas no Hospital Erasto Gaertner (HEG) (CAAE: 62542616.7.0000.0098, aprovação em: 07-05-2017); e na UBS Nossa Senhora Aparecida, com a concordância da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Curitiba (CAAE: 02385318.4.3001.0101, aprovação em: 02-22-

2019). Participam deste estudo mulheres voluntárias, atendidas nos respectivos serviços de saúde citados acima (HEG ou UBS Nossa Senhora Aparecida); com idade acima de 18 anos (preferencialmente entre 25 e 64 anos); e sem diagnóstico clínico e/ou citopatológico e/ou histopatológico para LIEBG, ou LIEAG ou CC – controles sem lesão; ou com diagnóstico clínico e/ou citopatológico e/ou histopatológico para LIEBG, ou LIEAG ou CC – pacientes. Não foram incluídas gestantes ou mulheres amamentando, nem mulheres com diagnóstico de doenças/infecções graves (a exemplo das portadoras de infecção pelo HIV).

Após consentimento livre e esclarecido das participantes (**APÊNDICES 4 e 5**), alíquotas de sangue foram coletadas logo após a realização do exame colposcópico² e/ou citopatológico e/ou histopatológico (biópsia), e antes de qualquer tipo de intervenção (cirurgia de alta frequência ou qualquer tipo de tratamento). Adicionalmente, aplicou-se questionário para coleta de informações (sociodemográficas, clínicas, saúde global, saúde da mulher, hábitos sexuais e aspectos gerais) (**APÊNDICE 6**). As amostras foram coletadas por venipuntura, utilizando-se de tubos a vácuo contendo EDTA (2 tubos de 4 mL). O transporte das amostras foi realizado imediatamente após a coleta, sendo estas transportadas para o LGMH (UFPR). Realizou-se então o processamento do material coletado: a) centrifugação a 1.000xg por 15 minutos a temperatura ambiente; b) seguida de separação do plasma; c) além de etapa adicional de centrifugação (13.500xg por 15 minutos a temperatura ambiente) para clarificação deste. Por fim, as amostras de plasma que foram utilizadas no presente estudo foram armazenadas a -80°C.

Esclarece-se que no serviço de Patologia Cervical do HEG, realizou-se exame colposcópico e citopatológico de todas as pacientes, sendo o exame histopatológico (biópsia) apenas realizado quando da identificação de lesões no colo uterino. Por sua vez, na UBS Nossa Senhora Aparecida realizou-se apenas exame citopatológico das participantes. Dessa forma, considerou-se como diagnóstico final os resultados emitidos pelos laboratórios credenciados aos respectivos serviços de saúde, considerando os resultados referentes aos exames histopatológico e/ou citopatológico e/ou colposcópico (no caso de discrepâncias, priorizou-se o resultado do exame

² Exame colposcópico (colposcopia): procedimento ginecológico diagnóstico para avaliar o colo do útero e os tecidos da vagina e vulva por via de um instrumento que amplia e ilumina estas estruturas.

histopatológico ao citopatológico e/ou colposcópico; e do exame citopatológico ao colposcópico).

3.3 Classificação das Amostras

Neste estudo foram incluídas amostras de mulheres sem lesão no colo uterino (SL) (n=23), assim como de mulheres apresentando diferentes estágios de lesões precursoras [NIC1 (n=16), NIC2 (n=09), e NIC3 (n=10)] ou com CC (n=16). As comparações entre os diferentes grupos foram feitas considerando-se a classificação citológica e/ou histológica, sendo então as amostras agrupadas da seguinte maneira: a) SL+LIEBG (n=39) *versus* LIEAG+CC (n=35); b) SL (n=23) *versus* CC (n=16); c) SL (n=23) *versus* LIE (n=35) *versus* CC (n=16); e d) SL (n=23) *versus* LIEBG (n=16) *versus* LIEAG+CC (n=35). A **TABELA 1** descreve as diferentes classificações de acordo com os agrupamentos propostos.

TABELA 1 - ALOCAÇÃO DAS AMOSTRAS EM DIFERENTES GRUPOS A PARTIR DE DIAGNÓSTICO INICIAL CONSIDERANDO DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES PROPOSTAS

DIAGNÓSTICO INICIAL	GRUPOS PROPOSTOS			
	SL+LIEBG (n=39) <i>versus</i> LIEAG+CC (n=35)	SL (n=23) <i>versus</i> CC (n=16)	SL (n=23)	SL (n=23)
			<i>versus</i>	<i>versus</i>
			LIE (n=35)	LIEBG (n=16)
			<i>versus</i> CC (n=16)	<i>versus</i> LIEAG+CC (n=35)
SL	SL+LIEBG	SL	SL	SL
NIC1	SL+LIEBG	-	LIE	LIEBG
NIC2	LIEAG+CC	-	LIE	LIEAG+CC
NIC3	LIEAG+CC	-	LIE	LIEAG+CC
CC	LIEAG+CC	CC	CC	LIEAG+CC

LEGENDA: A partir do diagnóstico inicial, determinada amostra pôde ser alocada em diferentes grupos de acordo com as diferentes classificações propostas. Na comparação SL *versus* CC, algumas amostras não foram classificadas, sendo então excluídas da comparação em questão (representada por "-"). CC, câncer cervical; LIE, lesão intraepitelial escamosa; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

As classificações acima foram propostas objetivando-se melhor estabelecer a distribuição dos níveis relativos dos diferentes miRNAs, nos diferentes estágios de lesões precursoras e CC. Adicionalmente, optou-se por incluir a classificação das amostras nos grupos SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC, uma vez que um dos estudos de referência para as análises de bioinformática (próxima seção) alocou as amostras respeitando essa classificação. Esta se mostra interessante, uma vez que se baseia na conduta clínica adotada atualmente; enquanto mulheres sem lesão no colo uterino ou com LIEBG são apenas acompanhadas pela(o) ginecologista (conduta observacional, sem intervenção), mulheres com diagnóstico de LIEAG ou CC serão submetidas a tratamento adequado (conduta com intervenção), salvo algumas exceções. Assim, buscou-se definir grupos que viessem a ter significado clínico mais relevante, com potencial aplicação na prática clínica.

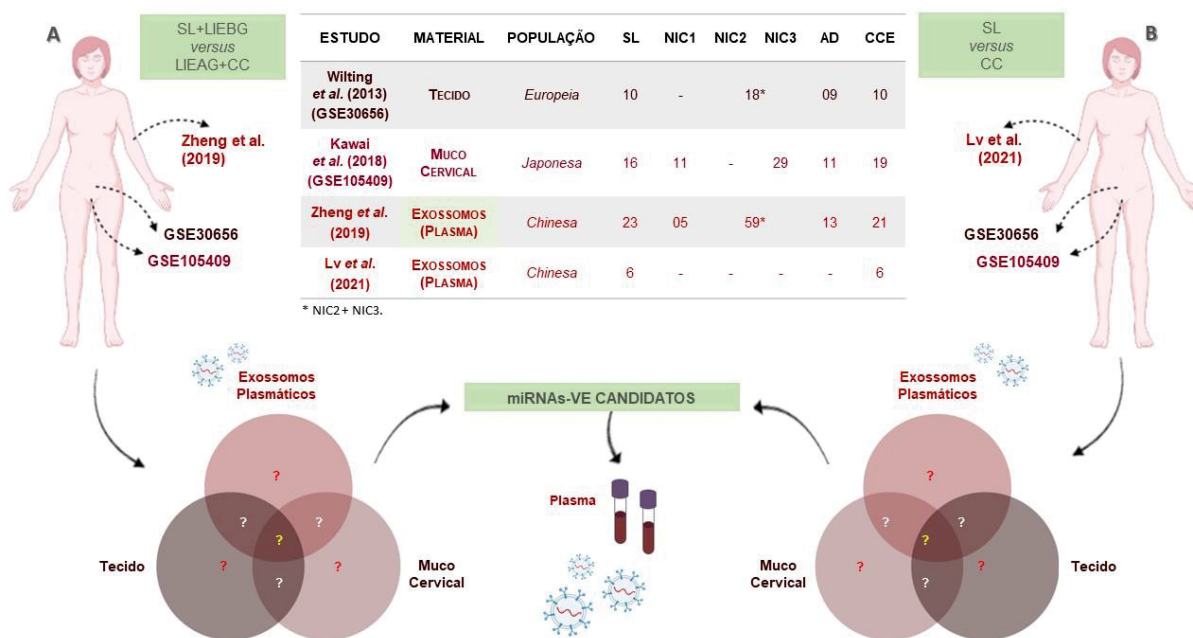
3.4 Estratégias – Seleção de miRNAs-VE Candidatos

Inicialmente, a fim de definir potenciais miRNAs-VE candidatos para o diagnóstico de CC, assim como de lesões precursoras, buscou-se selecionar alguns miRNAs já relatados como tendo potencial diagnóstico/prognóstico para discriminar diferentes estágios de LIE e CC. A estratégia priorizou selecionar miRNAs diferencialmente expressos³ em diferentes materiais biológicos – tecido, muco cervical e exossomos plasmáticos. A **FIGURA 6** apresenta uma visão esquemática das estratégias adotadas neste estudo. Ao todo, quatro estudos foram incluídos na presente análise, contemplando diferentes materiais biológicos: tecido cervical (WILTING *et al.*, 2013), muco cervical (KAWAI *et al.*, 2018) e exossomos plasmáticos (LV *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2019). No momento em que as análises foram realizadas, os dados de apenas dois estudos estavam disponíveis, ambos depositados no banco de dados públicos *Gene Expression Omnibus* (GEO) (KAWAI *et al.*, 2018; WILTING *et al.*, 2013). Por sua vez, os dados referentes aos dois estudos investigando os níveis de quantificação relativa de diversos miRNAs em exossomos plasmáticos não estavam disponíveis publicamente. Todavia, acessando os

³ O termo “expresso” (e suas variações) será utilizado neste documento para se referir à quantificação (níveis) de miRNAs em diferentes materiais biológicos, incluindo o tecido (onde o evento de expressão gênica ocorre de fato).

resultados apresentados em ambas as publicações, foi possível elencar os miRNAs diferencialmente quantificados nos mesmos (LV *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2019).

FIGURA 6 - VISÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA A SELEÇÃO DE POTENCIAIS miRNAs-VE CANDIDATOS



LEGENDA: A partir de diferentes estudos investigando miRNAs diferencialmente expressos em diferentes materiais biológicos – tecido (WILTING *et al.*, 2013), muco cervical (KAWAI *et al.*, 2018) e exossomos plasmáticos (LV *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2019) propôs-se definir miRNAs comuns diferencialmente expressos nos diversos tipos de materiais biológicos avaliados. Os dados referentes aos estudos de Wilting *et al.* (2013) e Kawai *et al.* (2018) estavam disponíveis no momento da análise, enquanto os estudos de Zheng *et al.* (2019) e Lv *et al.* (2021) não estavam publicamente disponíveis (todavia, acessando os resultados apresentados em ambas as publicações, foi possível elencar os miRNAs diferencialmente expressos nos grupos propostos pelos mesmos). Assim, tomando estes dois últimos como referência e respeitando-se a divisão de grupos propostas em cada um, reanalisou-se os dois primeiros *datasets* quanto à expressão diferencial de miRNAs (pacote Limma; $p < 0,01$). Uma vez reanalisados, realizou-se a intersecção dos miRNAs comuns diferencialmente expressos nos diversos materiais biológicos. Conforme demonstrado acima, os seguintes grupos de controles e pacientes foram selecionados: (A) Abordagem A – controles e pacientes foram divididos em dois grupos: SL+LIEBG (agrupando-se amostras SL e LIEBG); e LIEAG+CC (agrupando-se amostras LIEAG e CC), utilizando o estudo de Zheng *et al.* (2019) como estudo de referência. (B) Abordagem B - controles e pacientes foram divididos igualmente em dois grupos: SL e CC, utilizando o estudo de Lv *et al.* (2021) como estudo de referência. AD, adenocarcinoma; CC, câncer cervical; CCE, carcinoma de células escamosas; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

Considerando os grupos propostos pelos dois estudos adotados como referência, realizou-se duas abordagens de análise a fim de definir miRNAs comuns diferencialmente expressos nos diferentes materiais avaliados. Os seguintes grupos de pacientes foram selecionados: a) Abordagem A – os controles e pacientes foram divididos em: SL+LIEBG (agrupando-se amostras SL e LIEBG) e LIEAG+CC

(agrupando-se amostras LIEAG e CC), utilizando o estudo de Zheng *et al.* (2019) como estudo de referência (ZHENG *et al.*, 2019); b) Abordagem B – os controles e pacientes foram divididos em: SL e CC, utilizando o estudo de Lv *et al.* (2021) como estudo de referência (LV *et al.*, 2020). Uma vez possível o acesso às sequências de ambos os estudos que investigaram os perfis de expressão de miRNAs em tecido cervical (GSE30656) e no muco cervical (GSE105409), realizou-se a reanálise destes conjuntos de dados, respeitando-se as comparações propostas nos respectivos artigos de referência. A análise de expressão diferencial de miRNAs foi realizada no ambiente R, utilizando-se o pacote Limma ($p < 0,01$). Posteriormente, realizou-se a intersecção dos resultados obtidos nas análises para tecido e muco cervical, com os respectivos resultados apresentados pelos estudos de referência (envolvendo exossomos plasmáticos). Dessa forma, definiu-se miRNAs comuns diferencialmente expressos nos diferentes tipos de materiais biológicos avaliados. Baseando-se nestes dados, e somado a evidências presentes na literatura, selecionou-se potenciais miRNAs-VE candidatos para o diagnóstico de LIE/CC.

3.5 Isolamento da Fração Enriquecida em Exossomos

As VEs plasmáticas (fração enriquecida em exossomos) foram isoladas de amostras de plasma utilizando-se o kit *Total Exosome Isolation Kit* (from plasma) (Invitrogen™; número de catálogo: 4484450). Basicamente, 300 µL de plasma clarificado descongelado foram transferidos para um microtubo limpo, adicionando-se então 150 µL de tampão fosfato salino (PBS) 1 x filtrado. Em seguida, misturou-se bem a amostra (em vórtex), e adicionou-se 15µL de proteinase K (20 mg/mL), misturando-se novamente. A amostra foi então incubada a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, 90 µL do reagente de precipitação foram adicionados ao plasma tratado com proteinase K, misturando-se novamente. A mistura foi incubada a 2-8°C, durante a noite. Após período de incubação, as amostras foram centrifugadas (a 10.000xg; por 10 minutos a temperatura ambiente). O sobrenadante (fração restante não-precipitada) foi descartado cuidadosamente, obtendo-se um *pellet* opaco (enriquecido em exossomos plasmáticos). Após isolamento, algumas amostras (*pellet* e sobrenadante) foram utilizadas para caracterização por diferentes técnicas, sendo processadas, conforme mencionado na seção seguinte. Por sua vez, as amostras

destinadas à extração de miRNAs-VE, tiveram suas VEs plasmáticas isoladas imediatamente antes da extração de RNA, conforme mencionado na seção 3.7.

3.6 Caracterização das VEs Plasmáticas Isoladas

Diferentes técnicas foram adotadas a fim de se caracterizar o perfil das VEs plasmáticas isoladas, seguindo os requisitos da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY *et al.*, 2018), incluindo: a) Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), b) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e c) *Western Blotting* (WB).

3.6.1 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A fim de caracterizar o tamanho/distribuição e concentração das VEs isoladas, realizou-se a técnica de NTA. *Pellets* de VEs isoladas a partir do plasma de 10 amostras (SL, n=3; LIEBG, n= 3; LIEAG, n=3; CC, n=1) foram avaliadas por esta técnica; o sobrenadante de duas amostras (SL, n=1; LIEAG, n=1) foi igualmente analisado. Essencialmente, esta metodologia se baseia nas propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano de partículas analisadas (nanopartículas entre 20-1.000 nm de diâmetro), obtendo parâmetros como distribuição de tamanho destas em amostras em suspensão líquida, sendo as mesmas visualizadas em microscópio ótico. Através do monitoramento do movimento delas, parâmetros como concentração de partículas/mL, média, moda e mediana são fornecidos. Frações referentes ao *pellet* e ao sobrenadante foram ressuspensas em PBS filtrado (diluição 1:1.000 e 1:300, respectivamente); em seguida, infundidas no equipamento lentamente. Basicamente, três vídeos de 60s foram gravados para cada amostra particular (*pellet* e sobrenadante), e a distribuição do tamanho das VEs e os parâmetros mencionados, acessados. As análises foram realizadas utilizando-se o equipamento *Nano-Sight LM10* (Malvern Panalytical, Malvern, UK), pertencente ao Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ), Paraná, Curitiba, Brasil.

3.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Esta técnica foi realizada objetivando-se verificar as características morfológicas e o tamanho das VEs isoladas. Para tanto, uma amostra de VEs isoladas a partir do plasma de paciente com LIEAG (n=1) foi analisada. Basicamente, o *pellet* proveniente de VEs isoladas a partir de 150 µL de plasma com proteinase K (20 mg/mL) (conforme descrito acima, respeitando as proporções utilizadas) foi diluído em 10 µL de PBS filtrado. Em seguida, a 7,5 µL desta solução foram adicionados 22,5 µL de paraformaldeído a 4%. Posteriormente, a preparação foi adicionada a uma superfície recoberta de parafilme, sendo sobre esta posicionada uma grade de cobre revestida com carbono Formvar (própria para fixação de material de amostras em suspensão para leitura em microscópio eletrônico de transmissão). Em seguida, foram realizadas três “lavagens” repousando a grade em gotas de PBX 1 x filtrado, a fim de retirar o excesso de solução. Por fim, a grade contendo a amostra foi incubada com acetato de uranila a 5% (por 1 minuto) objetivando o contraste entre as estruturas fixadas. Após nova lavagem com PBS 1 x filtrado, a amostra foi visualizada ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II (JEOL, Akishima, Tokyo, JP), disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, Brasil.

3.6.3 Western Blotting (WB)

A técnica de WB foi utilizada a fim de identificar as proteínas presentes na fração isolada (proteínas vesiculares). *Pellet* isolado a partir do plasma de uma amostra (LIEAG, n=1) e sobrenadante foram analisadas por esta técnica. Ao *pellet* proveniente da precipitação de VEs a partir de 150 µL de plasma sem proteinase K (conforme descrito acima, respeitando as proporções utilizadas) e ao sobrenadante (plasma depletado de VEs) foram adicionados 150 µL de tampão de lise celular [(50 mM de tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1% triton X 100 a pH 7,4 contendo inibidores de proteases (1 mM PMSF, 1 mM fenantrolina, 1 mM N-etilmaleimida (NEM), 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)]. As amostras foram centrifugadas (a 13.500xg por 10 minutos a temperatura ambiente) e os sobrenadantes contendo as proteínas lisadas, transferidos para novos microtubos. Em seguida, realizou-se a quantificação de proteínas totais através do ensaio de Bradford (*Bio-Rad, Hercules*

CA, EUA); 80 µg de proteína proveniente da amostra de VEs plasmáticas isoladas (*pellet*) e da fração resultante (sobrenadante) foram analisadas.

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% (1,5 mm a 15-25 mA, 150 V). Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em cuba de eletroforese contendo gelo e tampão de transferência (48 mM de tris base, 39 mM de glicina, 0,037% de SDS, 20% de metano, a pH 8,3) gelado em banho de gelo, sob agitação magnética (a 100 V por 1 hora com miliamperagem máxima de 220 mA). Após a transferência, incubou-se a membrana em solução Ponceau a 0,2% (coloração vermelha), sendo então possível a observação das bandas de proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão salino TBST a 0,05% (tampão tris-salino com tween 20), até a remoção completa do corante. Adicionalmente, realizou-se o bloqueio com solução contendo leite em pó desnatado e TBST a 0,05% (por 1 hora a temperatura ambiente). Após bloqueio, a membrana foi incubada, durante período noturno, com os respectivos anticorpos primários, respeitando-se as condições apropriadas: a) anti-TSG101 (*Thermo Scientific*, EUA) (1:4.000), em condições redutoras; b) anti-CD9 (*Biologend*, EUA) (1:2.000), anti-CD63 (*Invitrogen*, EUA) (1:4.000), e anti-calnexina (*BD*, EUA) (1:1.000), em condições não redutoras. Após lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário [*Goat anti-Mouse horseradish peroxidase (HRP)*] (*Invitrogen*, EUA) (1:5.000) por 1 hora (exceto para marcação da Calnexina, 1:4.000). Por fim, as bandas de proteínas foram detectadas utilizando-se o substrato quimioluminescente *SuperSignal™ West Pico PLUS* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) e capturadas com Amersham Hyperfilm ECL (*GE Healthcare Life Science*, EUA).

3.7 Extração de miRNAs-VE

Os miRNAs foram extraídos do *pellet* obtido a partir de 300 µL de plasma clarificado utilizando-se o kit *miRVana™ miRNA Isolation Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA; número de catálogo: AM1560), segundo especificações do fabricante para o enriquecimento de pequenos RNAs [Adaptações ao protocolo: ao *pellet* de VEs, adicionou-se 300 µL do tampão de lise (*Lysis/ Binding Buffer*), misturando-se vigorosamente; em seguida, adicionou-se 0,025 pg do *spike-in* cel-miR-39 (equivalente a $1,5 \times 10^{10}$ cópias) (*Qiagen*, DE; número de catálogo: 219610) como controle exógeno]. As amostras foram eluídas em um volume final de 40 µL (20 µL +

20 µL). As concentrações finais e a pureza foram determinadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, EUA). Os eluídos contendo pequenos RNAs foram armazenadas a -80°C até análise posterior.

3.8 Síntese de cDNA e Quantificação por RT-qPCR

A fim de quantificar os miRNAs-VE alvos (e controle) foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Inicialmente, realizou-se a transcrição reversa dos miRNAs em cDNA, utilizando-se o *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription kit* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA; número de catálogo: 4366597), segundo especificações do fabricante [Adaptações ao protocolo: utilizou-se 4,5 µL do eluído obtido na etapa anterior (volume final de reação de 7,5 µL)]. Esta etapa foi realizada por alvo (em microtubos diferentes), gerando cDNAs alvo específicos. Os cDNAs foram então diluídos com água livre de nucleases (diluição 1:5) e acondicionados a -20°C.

Posteriormente, realizou-se a quantificação dos alvos selecionados, utilizando-se as seguintes sondas de hidrólise TaqMan® (TaqMan® MicroRNA Assays, *Thermo Fisher Scientific*, EUA): miR-10b-5p (ID do ensaio: 002218, número de catálogo: 4427975); miR-148a-3p (ID do ensaio: 000470, número de catálogo: 4427975); miR-181b-5p (ID do ensaio: 001098, número de catálogo: 4427975); e cel-miR-39 (ID do ensaio: 000200, número de catálogo: 4427975). As reações foram realizadas segundo especificações do fabricante [Adaptações ao protocolo: a quantidade de entrada de cDNA (1:5) foi de 4,5 µL por reação de qPCR de volume final de 10 µL]. Os ensaios qPCR foram realizados em placas de 384 poços, no equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, EUA), em duplicata (alvos e controle exógeno). Replicatas com desvio padrão superior a 1 Cq foram descartadas. A quantidade relativa (QR) de cada miRNA-VE foi calculada utilizando-se o método comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). A normalização das quantificações foi realizada a partir dos valores de Cq do controle técnico cel-miR-39 (controle exógeno), inserido anteriormente à etapa de extração do RNA.

3.9 Análises Estatísticas

Dados contínuos foram testados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnoff com correção Lilliefors/ou Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (homogeneidade de variâncias) (Teste de Levene). Uma vez verificada a normalidade e homocedasticidade das mesmas, testes estatísticos paramétricos foram empregados; caso contrário, testes não paramétricos foram adotados. Dados sóciodemográficos/clínicos foram comparados entre os diferentes grupos propostos da seguinte maneira: a) para comparação de variáveis contínuas entre dois grupos ou entre três ou mais utilizou-se o teste *t* de *Student* para amostras independentes ou a Análise de Variância (ANOVA), respectivamente; b) para comparação de variáveis categóricas foi utilizado o Teste do Qui-quadrado com correção de Yates. Dados de quantificação relativa dos miRNAs-VE analisados, obtidos a partir do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), foram comparados entre os grupos propostos, utilizando-se os testes não-paramétricos: a) Mann-Whitney, para comparações entre dois grupos; b) Kruskal-Wallis, para comparações entre três ou mais grupos). Adicionalmente, a fim de se avaliar o potencial diagnóstico dos miRNAs-VE selecionados e diferencialmente quantificados nos diferentes grupos, construiu-se curvas ROC individuais (do inglês, *Receiver Operator Characteristic*) a fim de se obter as respectivas áreas sob a curva (do inglês, *area under the curve*; AUC). Os cálculos e obtenção das curvas ROC individuais foram realizados baseando-se nos valores de QR, sendo realizados no programa GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software Inc.*, EUA). Os valores de corte, sensibilidade e especificidade foram calculados utilizando o Índice de Youden [(sensibilidade + especificidade) – 100], baseados em valores fornecidos pelo programa. Todas as análises foram realizadas no ambiente R (com exceção das curvas ROC, realizadas no GraphPad Prism 6). Todas as comparações foram analisadas adotando-se como nível de significância o valor de $p < 0,050$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente, incluindo: os resultados referentes aos ensaios de caracterização das VEs isoladas; a caracterização da população estudada (quanto aos aspectos sociodemográficos, relacionados à hábitos de vida, saúde global/da mulher); os resultados de predição a partir das estratégias para seleção de miRNAs-VE candidatos para diagnóstico de lesões precursoras/CC; os resultados referentes às quantificações relativas para os diferentes miRNAs-VE estudados, assim como a avaliação do seus potenciais diagnósticos, quando aplicável.

4.1 Caracterização das VEs Isoladas

Inicialmente, VEs isoladas de plasma de controles e pacientes foram examinadas individualmente através da técnica de NTA. Parâmetros obtidos como tamanho médio, moda e concentração (partículas/mL) para as amostras analisadas são apresentadas na **TABELA 2**.

TABELA 2 - PARÂMETROS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS

Amostra/Parâmetro	Grupo Amostral			p
	SL (n=3)	LIEBG (n=3)	LIEAG + CC (n=4)	
VEs isoladas (pellet)				
Tamanho Médio (nm)	130,20	139,23	121,23	0,265 ^a
Moda (nm)	105,27	99,60	101,20	0,664 ^a
Concentração (partículas/mL)	6,20E+11	4,49E+11	4,20E+11	0,751 ^a

LEGENDA: Valores de p obtidos pelo teste de ANOVA^a. Dados apresentados como média para os diferentes parâmetros avaliados, para amostras de VEs isoladas de plasma (*pellet*). CC, câncer cervical; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; SL, sem lesão; VEs, vesículas extracelulares. FONTE: A autora (2022).

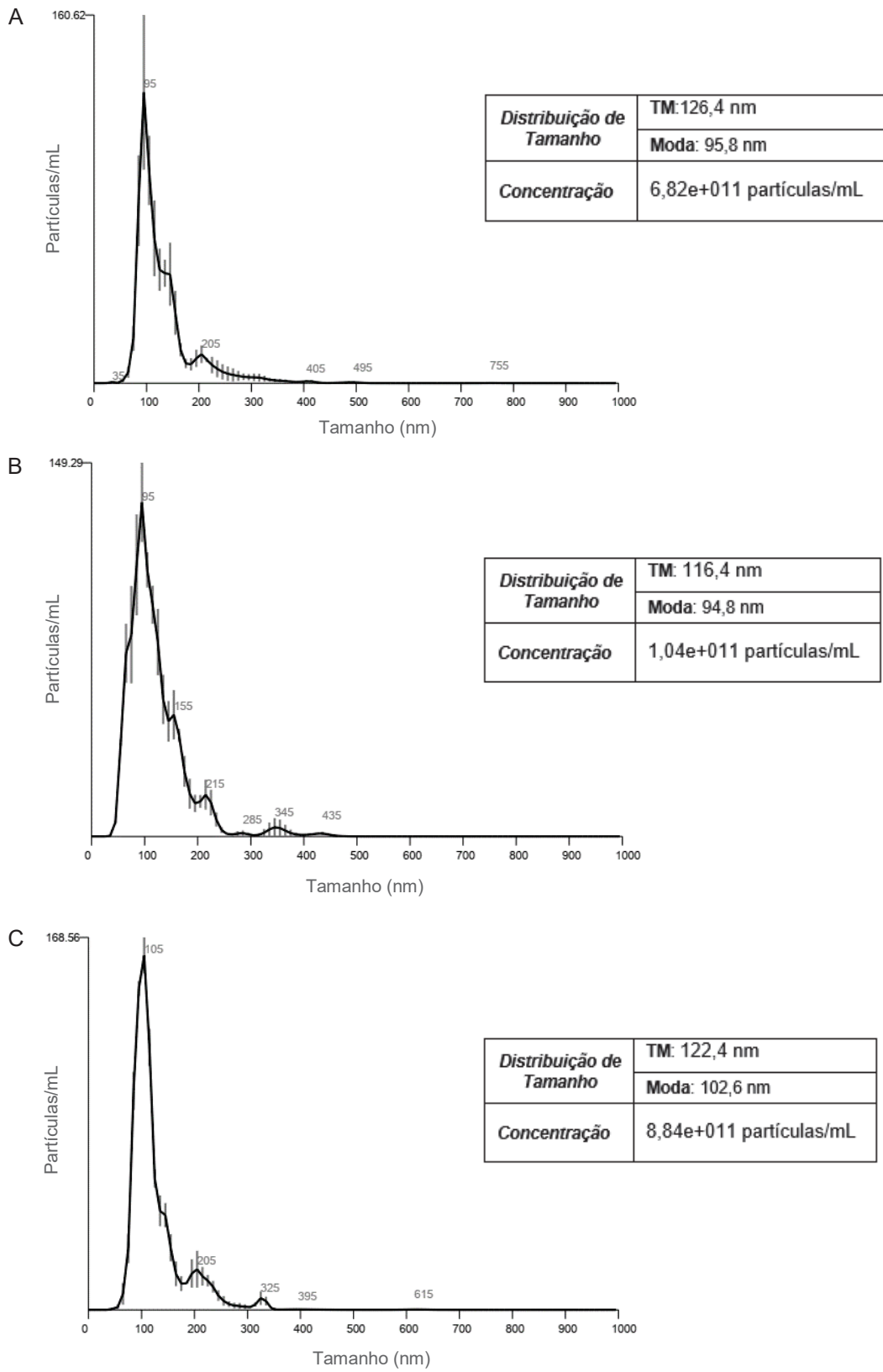
Na análise de NTA verificou-se que a população de nanopartículas é heterogênea, de aproximadamente 30-400 nm, com distribuição semelhante entre as amostras analisadas, e entre os diferentes grupos comparados. A **FIGURA 7** exemplifica os resultados obtidos (exibidos em histogramas demonstrando a distribuição de tamanho das nanopartículas), a partir de três amostras analisadas individualmente, cada uma representando um grupo amostral (A, amostra de controle

SL; B, amostra de paciente com LIEBG; C, amostra de paciente com CC). Não houve diferença significativa com relação ao tamanho médio ($p=0,265$), moda ($p=0,664$) e concentração ($p=0,751$) das partículas entre os grupos avaliados (conforme apresentado na **TABELA 2**). O tamanho médio das VEs isoladas nas diferentes amostras foi de aproximadamente 130 nm, estando dentro da faixa esperada para exossomos (50 a 150 nm, em média) (GARDINER *et al.*, 2013; VESTAD *et al.*, 2017), enquanto a concentração variou entre $1,04 \times 10^{11}$ a $8,84 \times 10^{11}$ partículas/mL, valores igualmente esperados para VEs isoladas a partir de plasma, considerando a metodologia utilizada (SERRANO-PERTIERRA *et al.*, 2019).

Realizou-se também a análise dos sobrenadantes resultantes do isolamento de VEs plasmáticas provenientes de duas amostras. Tais amostras foram formadas igualmente por população heterogênea de nanopartículas, variando entre aproximadamente 100-900 nm (**APÊNDICE 7; FIGURA SUPLEMENTAR 1**), tendo estas tamanho médio superior a 300 nm, e concentração entre $4,15 \times 10^8$ a $5,20 \times 10^8$ partículas/mL. Tais resultados sugerem que o isolamento de VEs plasmáticas a partir da metodologia utilizada tende a concentrar a fração enriquecida em exossomos no *pellet* isolado. Todavia, há certa perda de nanopartículas com tamanho entre 100-150 nm (encontradas no sobrenadante).

Posteriormente, avaliou-se a morfologia e o tamanho das VEs isoladas a partir da análise de MET. Apenas uma amostra foi analisada por essa técnica. Nas imagens obtidas, observou-se a presença de nanopartículas esféricas, com membranas duplas e tamanhos compatíveis aos observados pela análise de NTA (**FIGURA 8 A-C**). São apresentadas imagens referentes a diferentes aumentos, conforme recomendado pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY *et al.*, 2018). Não foi realizada MET de fração sobrenadante.

FIGURA 7 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE NTA DE VEs PLASMÁTICAS ISOLADAS DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE CONTROLE E PACIENTES



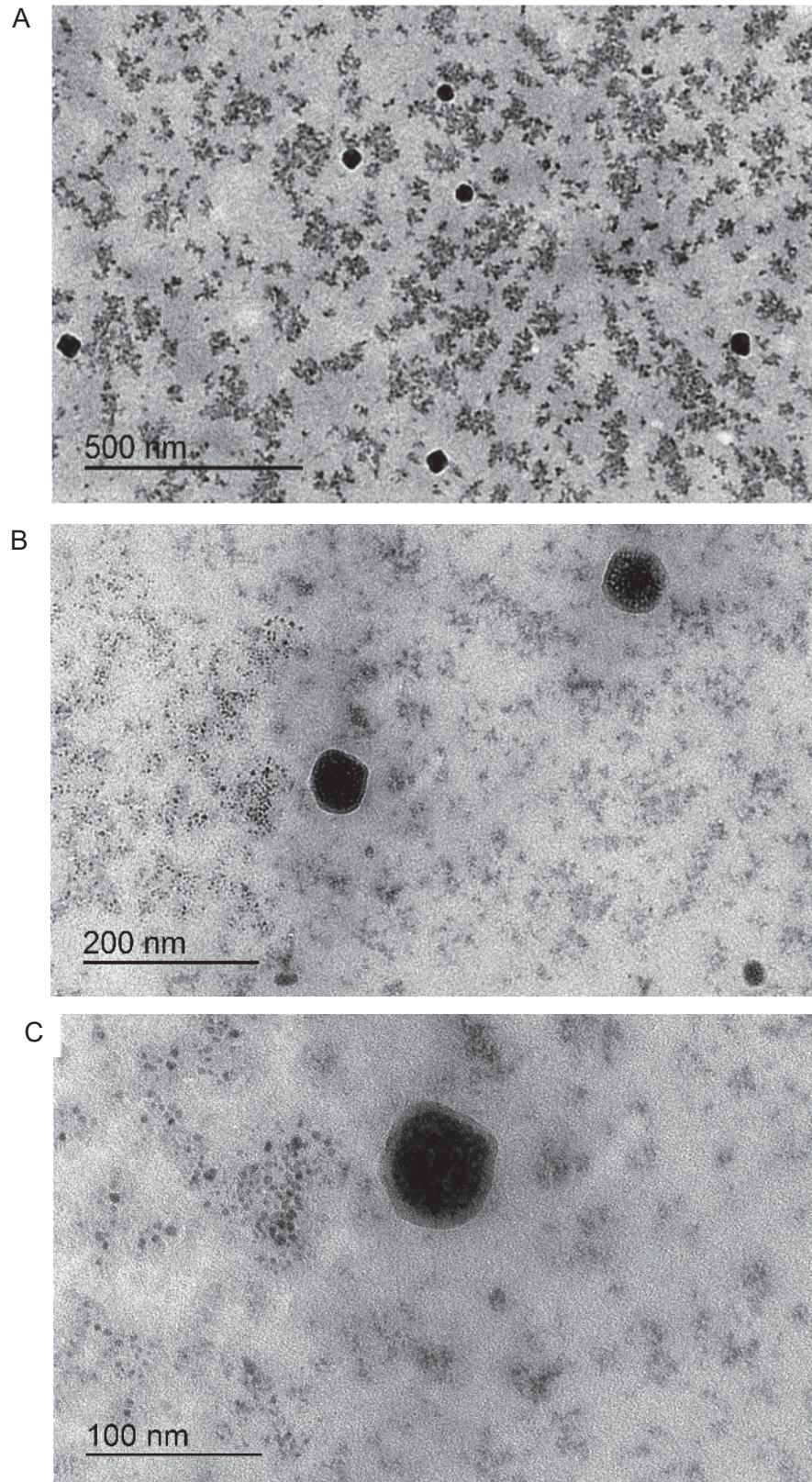
LEGENDA: Histogramas demonstrando a distribuição de tamanho das nanopartículas, pela técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), de VEs isoladas do plasma de: amostra de controle SL (A); amostra de paciente com LIEBG (B); e de amostra de paciente com CC (C). Nos quadros à direita são

apresentados parâmetros referentes a amostra analisada (individualmente), como distribuição de tamanho (tamanho médio e moda) e concentração das partículas em suspensão. TM, tamanho médio; CC, câncer cervical; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

Por fim, a presença/ausência de marcadores proteicos exossomais (positivos e negativo) foi avaliada pela técnica de WB. Uma amostra foi analisada por essa técnica, porém ambas as frações da mesma foram examinadas: a) *pellet* proveniente da precipitação de VEs e; b) sobrenadante resultante do isolamento das VEs plasmáticas. A presença/ausência dos seguintes marcadores positivos foi avaliada: TSG101 (proteína citosólica utilizada como marcador positivo); CD9 e CD63 (proteínas transmembrana conhecidas como tetraspaninas, utilizadas como marcadores positivos); e Calnexina (proteína celular presente no retículo plasmático, utilizada como marcador negativo); conforme recomendações da última edição do MISEV (2018) (THÉRY *et al.*, 2018). Nesta, sugere-se a utilização de pelos menos três marcadores proteicos positivos para VEs, e pelo menos um marcador negativo (marcador com propósito de identificar componentes não vesiculares, porém co-isolados com as VEs).

Os resultados obtidos pela técnica de WB confirmaram a presença dos marcadores positivos - TSG101, CD9 e CD63 - no *pellet* de VEs isoladas a partir do plasma; e adicionalmente, confirmou-se a ausência de Calnexina (marcador negativo) neste. Por sua vez, no sobrenadante não se observou marcação para os marcadores positivos avaliados, nem para o marcador negativo (**FIGURA 9**). Adicionalmente, a presença de Calnexina foi avaliada para uma amostra adicional – células HeLa – utilizada como controle positivo (controle técnico).

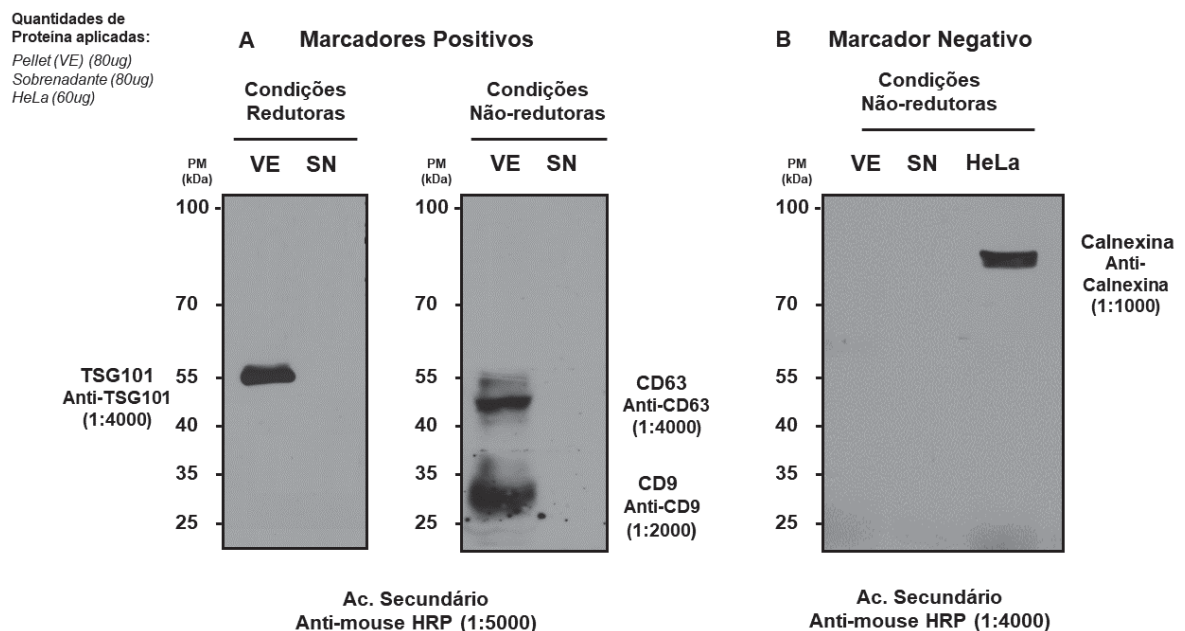
FIGURA 8 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE VEs PLASMÁTICAS ISOLADAS



LEGENDA: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de VEs isoladas do plasma de paciente diagnosticada com LIEAG, em diferentes aumentos (A, 15.000x; B, 30.000x; C, 50.000x). FONTE: A autora (2022).

Conjuntamente, os resultados obtidos através das três técnicas avaliadas confirmam o isolamento de VEs, em sua maioria com tamanho, morfologia e composição proteica concordantes com o observado em exossomos. Todavia, considerando a técnica utilizada para isolamento de VEs, percebe-se que, conforme esperado, há perda de exossomos no sobrenadante. Adicionalmente, considerando-se que os marcadores positivos CD9 e TSG101 podem estar presentes na membrana ou no lúmen, respectivamente, de exossomos ou de microvesículas, a presença destas no *pellet* isolado não pode ser descartada. Por conta disso, adotou-se neste trabalho o termo “fração enriquecida em exossomos” ou “VEs”, a fim de se respeitar tal limitação, além de considerar as recomendações do MISEV (2018) (THÉRY *et al.*, 2018). Ressalta-se que, apesar da recuperação de exossomos não ser completa com esta técnica, trabalhos recentes vêm mostrando que nenhuma das técnicas de isolamento permite recuperação completa dessa fração, inclusive sendo sugerida a combinação de técnicas a fim de se obter maior pureza e concentração (STAM *et al.*, 2021).

FIGURA 9 - MARCADORES PROTEÍCOS ANALISADOS POR WESTERN BLOTTING



LEGENDA: Marcação de proteínas exossomais em *pellet* (contendo VEs isoladas do plasma) e sobrenadante de amostra de paciente diagnosticada com LIEAG. **A.** Como marcadores positivos incluiu-se: TSG101 (proteína citosólica); CD9 e CD63 (proteínas transmembrana conhecidas como tetraspaninas). A presença/ausência destas proteínas foi avaliada para ambas as frações (*pellet*/sobrenadante) obtidas da mesma amostra. **B.** Como marcador negativo incluiu-se: Calnexina (proteína celular presente no retículo plasmático). A presença/ausência da proteína Calnexina foi avaliada para ambas as frações obtidas da mesma amostra, assim como para uma amostra adicional

utilizada como controle positivo (HeLa). *HRP*, *Horseradish peroxidase*; SN, sobrenadante; VE, vesículas extracelulares. FONTE: A autora (2022).

Apesar da técnica de ultracentrifugação (UC) ainda ser a mais comumente utilizada para enriquecimento de VEs em geral, quando são considerados diferentes biofluidos, como o plasma, percebe-se desvantagens inerentes a esta que podem influenciar na decisão de metodologia de isolamento alternativa. Por exemplo, comparando-se três métodos para enriquecimento de VEs a partir de plasma de controles saudáveis – UC, reagente de precipitação *ExoQuick™* (*System Biosciences*) e reagente de precipitação *Total Exosome Isolation* (*Invitrogen*) – demonstrou-se maior eficiência dos reagentes de precipitação em recuperar VEs em comparação à UC. Além disso, o volume inicial de plasma a ser utilizado necessita ser substancialmente maior na primeira técnica (UC = 1 mL de plasma; reagentes de precipitação = 250 uL de plasma), e ainda assim a porcentagem de VEs recuperadas é significativamente inferior à obtida utilizando-se o *ExoQuick™* ou *Total Exosome Isolation* (SERRANO-PERTIERRA *et al.*, 2019). Adicionalmente, as populações de VEs plasmáticas obtidas através da utilização destes se mostraram mais homogêneas em comparação à obtida pela técnica de UC (SERRANO-PERTIERRA *et al.*, 2019), a qual parece favorecer a agregação de VEs (LINARES *et al.*, 2015). Somado ao exposto acima, os reagentes de precipitação se apresentam como alternativas de isolamento mais práticas, requerendo menos tempo para execução, podendo representar boas alternativas à técnica de UC (SERRANO-PERTIERRA *et al.*, 2019).

Apesar das evidências apresentadas acima, ainda são inúmeros os desafios associados à pesquisa envolvendo VEs. A classificação e a caracterização de VEs têm sido motivo de debate entre os pesquisadores da área, em parte devido às variações observadas em diferentes materiais biológicos (reflexo da complexidade de VEs liberadas por diversos tipos celulares), assim como devido às limitações metodológicas que ainda precisam ser superadas a fim de obter isolados ideais, reprodutíveis e bem caracterizados (SHURTLEFF; TEMOCHE-DIAZ; SCHEKMAN, 2018; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

4.2 Caracterização da Amostra Populacional Estudada

Neste estudo foram incluídas amostras de mulheres sem e com lesão no colo uterino, assim como de pacientes diagnosticadas com CC. A partir do questionário

aplicado (**APÊNDICE 6**) diversas características sócio-demográficas, assim como características gerais referentes à saúde das mulheres envolvidas foram acessadas. Ressalta-se que tais características foram obtidas através de autodeclaração, com exceção da idade (confirmada através do prontuário médico). Destaca-se ainda que alguns parâmetros como renda mensal, escolaridade, entre outros, foram coletados apenas para um número reduzido de amostras, impossibilitando a análise para todas ou algumas comparações. Ainda, alguns dados (a exemplo, da informação sobre prática de atividade física regular ou sobre menopausa) são apresentados em todas as tabelas, porém considerados apenas em algumas comparações, devido ao baixo número amostral de determinados grupos. Optou-se por incluí-los a fim de registrar os dados existentes, porém não se pode garantir a representatividade dos mesmos.

Considerando-se a amostra populacional como um todo ($n=74$), traça-se o seguinte perfil: mulheres predominantemente de cor branca (83,78%), com idades variando entre 19 e 70 anos (média de idade $40,85 \pm 12,69$), tendo a maioria ensino médio completo (36,36%), renda mensal de aproximadamente 1-3 salários-mínimos (61,90%). Em relação à cor autodeclarada, esta parece estar de acordo com o esperado, uma vez que o estado do Paraná tem população predominantemente europeia (IBGE, 2012). São mulheres de renda mensal baixa, pertencendo às classes sociais D e E, de acordo com o Critério por Faixas de Salário-Mínimo, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2020) e com escolaridade média, o que também parece estar em consonância (direta ou indireta) com o fato das mesmas buscarem serviços de saúde públicos integrados ao Sistema Único de Saúde (SUS). Adicionalmente, a maioria destas relatou ser casada (62,86%), tendo tido um(a) filho(a) (80,0%) nascido(a) vivo(a). Tais características refletem o perfil da mulher moderna, reflexo da transição de um modelo tradicional com proles numerosas, para um modelo atual, com poucos filhos (SCAVONE, 2001). Estas mudanças nos padrões de maternidade são também reflexo do acesso facilitado a métodos contraceptivos (FESTIN, 2020). Inclusive, a maioria das participantes relatou fazer uso de algum método contraceptivo hormonal (oral, injetável ou DIU) (52,70%).

Ainda, a maioria das participantes declarou: não estar na menopausa (78,33%), não apresentar outra IST (81,70%), nem outra doença associada (61,64%); além de nunca ter fumado (64,87%), não praticar atividade física regular (60,0%), apresentando sobrepeso, com Índice de Massa Corporal (IMC) variando entre 18,87 e $40,06 \text{ kg/m}^2$ (média de $27,55 \pm 4,69 \text{ kg/m}^2$). Tais dados relacionados à saúde da

mulher, adicionalmente à média de idade observada ($40,85 \pm 12,69$ anos), parecem refletir uma população de meia idade – casadas, com poucos filhos, em idade reprodutiva, sem outra(s) doença(s) associada(s). Hábitos relacionados à saúde, como a não prática de atividade física regular, e o IMC (em média, acima do esperado) parecem estar de acordo com os hábitos associados à vida moderna e ao sedentarismo (GONZÁLEZ-GROSS; MELÉNDEZ, 2013). Não se pode excluir também as consequências do baixo *status* (ou nível) socioeconômico destas pacientes – resultado de uma gama de fatores educacionais, ocupacionais, entre outros (GONZAGA ALVES; SOARES, 2009) – sobre tais achados. Comumente, indivíduos com baixo *status* socioeconômico tendem a ingerir menos frutas, verduras, peixes e fibras (ALLEN *et al.*, 2017), além de se exercitar menos (ou não praticar esportes) e consumir mais tabaco e álcool em comparação a indivíduos com elevado nível socioeconômico (PAMPEL; KRUEGER; DENNEY, 2010).

Posteriormente, analisou-se os dados de acordo com os diferentes grupos propostos (conforme apresentado na **TABELA 1**), a fim de avaliar se há ou não diferenças estatisticamente significativas para os diversos parâmetros avaliados entre estes. Na sequência, as características sociodemográficas e de saúde global/saúde da mulher dos grupos propostos são apresentadas: SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC (**TABELA 3**), SL *versus* CC (**TABELA 4**), SL *versus* LIE *versus* CC (**TABELA 5**), e SL *versus* LIEBG *versus* LIEAG+CC (**TABELA 6**).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC

Característica	Grupo		p
	SL+LIEBG (n=39)	LIEAG+CC (n=35)	
Cor Autodeclarada			
<i>Branca</i>	33 (84,62%)	29 (87,88%)	0,436 ^a
<i>Preta</i>	03 (7,69%)	03 (9,09%)	
<i>Parda</i>	0	01 (3,03%)	
<i>Indígena</i>	02 (5,13%)	0	
<i>Branca + Indígena</i>	01 (2,56%)	0	
Idade (anos)	40,00 ± 12,36 [19-64]	41,80 ± 13,36 [23-70]	0,546 ^b
IMC (kg/m²)	28,30 ± 4,73 [18,87 – 37,80]	26,20 ± 5,36 [19,72 – 40,06]	0,129 ^b
AF. Regular^{c*}			
<i>Não</i>	17 (58,62%)	07 (63,64%)	1,000 ^a
<i>Sim</i>	12 (41,38%)	04 (36,36%)	
Tabagismo^d			
<i>Nunca fumou</i>	26 (66,67%)	22 (62,86%)	0,131 ^a
<i>Ex-fumante</i>	03 (7,69%)	08 (22,86%)	
<i>Fumante</i>	10 (25,64%)	05 (14,29%)	
Outras Doenças^e			
<i>Não</i>	15 (39,47%)	30 (85,71%)	< 0,001 ^a
<i>Sim</i>	23 (60,53%)	05 (14,29%)	
Contracepção Hormonal			
<i>Não</i>	23 (58,97%)	13 (37,14%)	0,092 ^a
<i>Sim, oral</i>	09 (23,08%)	18 (51,43%)	
<i>Sim, injetável</i>	04 (10,26%)	02 (5,71%)	
<i>Sim, DIU</i>	03 (7,69%)	02 (5,71%)	
Idade da Primeira Relação Sexual (anos)			
≤17	18 (47,37%)	23 (69,70%)	0,097 ^a
≥18	20 (52,63%)	10 (30,30%)	
Parceiros Sexuais (durante toda vida)*			
0	0	0	0,072 ^a
1	07 (21,21%)	02 (9,52%)	
2	06 (18,18%)	0	
3	05 (15,15%)	03 (14,29%)	
≥ 4	15 (45,46%)	16 (76,19%)	
Gestações^f			
0	05 (13,51%)	02 (6,06%)	0,485 ^a
1	10 (27,03%)	13 (39,39%)	
2	11 (29,73%)	09 (27,27%)	
3	07 (18,92%)	04 (12,12%)	
4	02 (5,41%)	0	
≥ 5	02 (5,41%)	05 (15,15%)	
Idade do Primeiro Parto (anos)*			
≤17	06 (20,69%)	08 (28,57%)	0,7015 ^a
≥18	23 (79,31%)	20 (71,43%)	

Abortos			
0	32 (86,49%)	27 (93,10%)	0,368 ^a
1	05 (13,51%)	02 (6,90%)	
4	0	0	
Histórico IST^g			
Não	27 (75,00%)	31 (88,57%)	0,241 ^a
Sim	09 (25,00%)	04 (11,43%)	
Cauterização Prévia (Colo Uterino)			
Não	27 (69,23%)	33 (94,29%)	0,014^a
Sim	12 (30,77%)	02 (5,71%)	
Menopausa			
Não	26 (68,42%)	21 (95,45%)	0,034^a
Sim	12 (31,58%)	01 (4,55%)	
Histórico Familiar de Câncer^h			
Não	09 (24,32%)	06 (17,65%)	0,691 ^a
Sim	28 (75,68%)	28 (82,35%)	

LEGENDA: Valores de p obtidos pelo ^ateste do Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates ou ^bteste *t* de Student para amostras independentes. ^cAF. Regular = pelo menos uma hora/ duas vezes por semana); ^dTabagismo = Nunca fumou, reportou nunca ter fumado; Ex-fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no passado, mas não fumou no último ano; Fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no ano anterior à coleta; ^eOutras doenças associadas, incluindo doenças cardiovasculares (como hipertensão arterial sistêmica e hipercolesterolemia), doenças metabólicas (como diabetes *mellitus* tipo II e hipotireoidismo) e doenças psíquicas (ansiedade e depressão). ^fGestações = gestações com parto (*i.e.*, excluindo-se abortos); ^gHistórico ISTs = histórico de outras infecções sexualmente transmissíveis [reportou antecedente(s) de ISTs]; ^hHistórico Familiar de Câncer (qualquer grau de parentesco). *Optou-se por incluir os dados referentes a este parâmetro, porém o mesmo pode não ser representativo, uma vez que o número amostral de um (ou mais) grupo(s) é reduzido. AF, atividade física; CC, câncer cervical; DIU, dispositivo intrauterino; IMC, Índice de Massa Corporal; ISTs, infecções sexualmente transmissíveis; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL *versus* CC

Característica	Grupo		p
	SL (n=23)	CC (n=16)	
Cor Autodeclarada			
<i>Branca</i>	21 (91,30%)	15 (100,00%)	0,502 ^a
<i>Preta</i>	01 (4,35%)	0	
<i>Parda</i>	0	0	
<i>Indígena</i>	01 (4,35%)	0	
<i>Branca + Indígena</i>	0	0	
Idade (anos)	42,26 ± 13,58 [20-64]	47,06 ± 14,31 [27-70]	0,295 ^b
IMC (kg/m²)	28,59 ± 4,09 [22,49 – 35,84]	25,27 ± 2,59 [22,23 – 27,78]	0,139 ^b
AF. Regular^{c*}			
<i>Não</i>	08 (44,44%)	02 (66,67%)	0,929 ^a
<i>Sim</i>	10 (55,56%)	01 (33,33%)	
Tabagismo^d			
<i>Nunca fumou</i>	15 (65,22%)	09 (56,25%)	0,152 ^a
<i>Ex-fumante</i>	01 (4,35%)	04 (25,00%)	
<i>Fumante</i>	07 (30,43%)	03 (18,75%)	
Outras Doenças^e			
<i>Não</i>	07 (31,82%)	13 (81,25%)	0,007^a
<i>Sim</i>	15 (68,18%)	03 (18,75%)	
Contracepção Hormonal			
<i>Não</i>	15 (65,22%)	03 (18,75%)	0,004^a
<i>Sim, oral</i>	04 (17,39%)	12 (75,00%)	
<i>Sim, injetável</i>	02 (8,70%)	0	
<i>Sim, DIU</i>	02 (8,70%)	01 (6,25%)	
Idade da Primeira Relação Sexual (anos)			
≤17	07 (31,82%)	09 (60,00%)	0,174 ^a
≥18	15 (68,18%)	06 (40,00%)	
Parceiros Sexuais (durante toda vida)[*]			
0	0	0	0,262 ^a
1	05 (27,78%)	01 (20,00%)	
2	04 (22,22%)	0	
3	03 (16,67%)	0	
≥ 4	06 (33,33%)	04 (80,00%)	
Gestações^f			
0	02 (8,70%)	01 (6,25%)	0,222 ^a
1	06 (26,09%)	08 (50,00%)	
2	07 (30,43%)	02 (12,50%)	
3	05 (21,74%)	01 (6,25%)	
4	02 (8,70%)	0	
≥ 5	01 (4,35%)	04 (25,00%)	
Idade do Primeiro Parto (anos)[*]			
≤17	02 (10,53%)	03 (23,08%)	0,6422 ^a
≥18	17 (89,47%)	10 (76,92%)	

Abortos			
0	19 (82,61%)	14 (77,78%)	0,119 ^a
1	04 (17,39%)	0	
4	0	04 (22,22%)	
Histórico IST^g			
Não	14 (66,67%)	15 (93,75%)	0,114 ^a
Sim	07 (33,33%)	01 (6,25%)	
Cauterização Prévia (Colo Uterino)			
Não	13 (56,52%)	15 (93,75%)	0,029^a
Sim	10 (43,48%)	01 (6,25%)	
Menopausa[*]			
Não	12 (52,17%)	06 (100,00%)	0,094 ^a
Sim	11 (47,83%)	0	
Histórico Familiar de Câncer^h			
Não	03 (14,29%)	01 (6,67%)	0,858 ^a
Sim	18 (85,71%)	14 (93,33%)	

LEGENDA: Valores de p obtidos pelo ^ateste do Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates ou ^bteste *t* de Student para amostras independentes. ^cAF. Regular = pelo menos uma hora/ duas vezes por semana); ^dTabagismo = Nunca fumou, reportou nunca ter fumado; Ex-fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no passado, mas não fumou no último ano; Fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no ano anterior à coleta; ^eOutras doenças associadas, incluindo doenças cardiovasculares (como hipertensão arterial sistêmica e hipercolesterolemia), doenças metabólicas (como diabetes *mellitus* tipo II e hipotireoidismo) e doenças psíquicas (ansiedade e depressão). ^fGestações = gestações com parto (*i.e.*, excluindo-se abortos); ^gHistórico ISTs = histórico de outras infecções sexualmente transmissíveis [reportou antecedente(s) de ISTs]; ^hHistórico Familiar de Câncer (qualquer grau de parentesco). ^{*}Optou-se por incluir os dados referentes a este parâmetro, porém o mesmo pode não ser representativo, uma vez que o número amostral de um (ou mais) grupo(s) é reduzido. AF, atividade física; CC, câncer cervical; DIU, dispositivo intrauterino; IMC, Índice de Massa Corporal; ISTs, infecções sexualmente transmissíveis; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL *versus* LIE *versus* CC

Característica	Grupo			p
	SL (n=23)	LIE (n=35)	CC (n=16)	
Cor Autodeclarada				
<i>Branca</i>	21 (91,30%)	26 (76,47%)	15 (100,00%)	0,539 ^a
<i>Preta</i>	01 (4,35%)	05 (14,71%)	0	
<i>Parda</i>	0	01 (2,94%)	0	
<i>Indígena</i>	01 (4,35%)	01 (2,94%)	0	
<i>Branca + Indígena</i>	0	01 (2,94%)	0	
Idade (anos)	42,26 ± 13,58 [20-64]	37,08 ± 10,10 [19-61]	47,06 ± 14,31 [27-70]	0,072 ^b
IMC (kg/m²)	28,59 ± 4,09 [22,49 – 35,84]	27,15 ± 5,22 [18,87 – 40,06]	25,27 ± 2,59 [22,23 – 27,78]	0,363 ^b
AF. Regular^{c*}				
<i>Não</i>	08 (44,44%)	14 (73,68%)	02 (66,67%)	0,187 ^a
<i>Sim</i>	10 (55,56%)	05 (26,32%)	01 (33,33%)	
Tabagismo^d				
<i>Nunca fumou</i>	15 (65,22%)	24 (68,57%)	09 (56,25%)	0,287 ^a
<i>Ex-fumante</i>	01 (4,35%)	06 (17,14%)	04 (25,00%)	
<i>Fumante</i>	07 (30,43%)	05 (14,29%)	03 (18,75%)	
Outras Doenças^e				
<i>Não</i>	07 (31,82%)	25 (71,43%)	13 (81,25%)	0,002^a
<i>Sim</i>	15 (68,18%)	10 (28,57%)	03 (18,75%)	
Contracepção Hormonal				
<i>Não</i>	15 (65,22%)	18 (51,43%)	03 (18,75%)	0,018^a
<i>Sim, oral</i>	04 (17,39%)	11 (31,43%)	12 (75,00%)	
<i>Sim, injetável</i>	02 (8,70%)	04 (11,43%)	0	
<i>Sim, DIU</i>	02 (8,70%)	02 (5,71%)	01 (6,25%)	
Idade da Primeira Relação Sexual (anos)				
≤17	07 (31,82%)	25 (73,53%)	09 (60,00%)	0,008^a
≥18	15 (68,18%)	09 (26,47%)	06 (40,00%)	
Parceiros Sexuais (durante toda vida)*				
0	0	0	0	0,168 ^a
1	05 (27,78%)	03 (9,68%)	01 (20,00%)	
2	04 (22,22%)	02 (6,45%)	0	
3	03 (16,67%)	05 (16,13%)	0	
≥ 4	06 (33,33%)	21 (67,74%)	04 (80,00%)	
Gestações^f				
0	02 (8,70%)	04 (12,90%)	01 (6,25%)	0,236 ^a
1	06 (26,09%)	09 (29,03%)	08 (50,00%)	
2	07 (30,43%)	11 (35,48%)	02 (12,50%)	
3	05 (21,74%)	05 (16,13%)	01 (6,25%)	
4	02 (8,70%)	02 (6,45%)	0	
≥ 5	01 (4,35%)	0	04 (25,00%)	
Idade do Primeiro Parto (anos)*				
≤17	02 (10,53%)	09 (36,00%)	03 (23,08%)	0,1495 ^a
≥18	17 (89,47%)	16 (64,00%)	10 (76,92%)	

Abortos				
0	19 (82,61%)	26 (89,66%)	14 (77,78%)	0,183 ^a
1	04 (17,39%)	03 (10,34%)	0	
4	0	0	04 (22,22%)	
Histórico IST^g				
Não	14 (66,67%)	29 (85,29%)	15 (93,75%)	0,081 ^a
Sim	07 (33,33%)	05 (14,71%)	01 (6,25%)	
Cauterização Prévia (Colo Uterino)				
Não	13 (56,52%)	32 (91,43%)	15 (93,75%)	0,001^a
Sim	10 (43,48%)	03 (8,57%)	01 (6,25%)	
Menopausa[*]				
Não	12 (52,17%)	29 (93,55%)	06 (100,00%)	< 0,001^a
Sim	11 (47,83%)	02 (6,45%)	0	
Histórico Familiar de Câncer^h				
Não	03 (14,29%)	11 (31,43%)	01 (6,67%)	0,095 ^a
Sim	18 (85,71%)	24 (68,57%)	14 (93,33%)	

LEGENDA: Valores de *p* obtidos pelo ^ateste do Qui-quadrado (χ^2) com correção de *Yates* ou ^bANOVA. ^cAF. Regular = pelo menos uma hora/ duas vezes por semana); ^dTabagismo = Nunca fumou, reportou nunca ter fumado; Ex-fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no passado, mas não fumou no último ano; Fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no ano anterior à coleta; ^eOutras doenças associadas, incluindo doenças cardiovasculares (como hipertensão arterial sistêmica e hipercolesterolemia), doenças metabólicas (como diabetes *mellitus* tipo II e hipotireoidismo) e doenças psíquicas (ansiedade e depressão). ^fGestações = gestações com parto (*i.e.*, excluindo-se abortos); ^gHistórico ISTs = histórico de outras infecções sexualmente transmissíveis [reportou antecedente(s) de ISTs]; ^hHistórico Familiar de Câncer (qualquer grau de parentesco). ^{*}Optou-se por incluir os dados referentes a este parâmetro, porém o mesmo pode não ser representativo, uma vez que o número amostral de um (ou mais) grupo(s) é reduzido. AF, atividade física; CC, câncer cervical; DIU, dispositivo intrauterino; IMC, Índice de Massa Corporal; ISTs, infecções sexualmente transmissíveis; LIE, lesão intraepitelial escamosa; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE SAÚDE GLOBAL/ SAÚDE DA MULHER DOS GRUPOS SL *versus* LIEBG *versus* LIEAG+CC

Característica	Grupo			p
	SL (n=23)	LIEBG (n=16)	LIEAG+CC (n=35)	
Cor Autodeclarada				
<i>Branca</i>	21 (91,30%)	12 (75,00%)	29 (87,88%)	0,473 ^a
<i>Preta</i>	01 (4,35%)	02 (12,50%)	03 (9,09%)	
<i>Parda</i>	0	0	01 (3,03%)	
<i>Indígena</i>	01 (4,35%)	01 (6,25%)	0	
<i>Branca + Indígena</i>	0	01 (6,25%)	0	
Idade (anos)	42,26 ± 13,58 [20-64]	36,75 ± 9,89 [19-60]	41,8 ± 13,16 [23-70]	0,346 ^b
IMC (kg/m²)	28,59 ± 4,09 [22,49 – 35,84]	27,89 ± 5,68 [18,87 – 37,8]	26,20 ± 4,43 [19,72 – 40,06]	0,294 ^b
AF. Regular^{c*}				
<i>Não</i>	08 (44,44%)	09 (81,82%)	07 (63,64%)	0,132 ^a
<i>Sim</i>	10 (55,56%)	02 (18,18%)	04 (36,36%)	
Tabagismo^d				
<i>Nunca fumou</i>	15 (65,22%)	11 (68,75%)	22 (62,86%)	0,132 ^a
<i>Ex-fumante</i>	01 (4,35%)	02 (12,50%)	08 (22,86%)	
<i>Fumante</i>	07 (30,43%)	03 (18,75%)	05 (14,29%)	
Outras Doenças^e				
<i>Não</i>	07 (31,82%)	08 (50,00%)	30 (85,71%)	< 0,001 ^a
<i>Sim</i>	15 (68,18%)	08 (50,00%)	05 (14,29%)	
Contracepção Hormonal				
<i>Não</i>	15 (65,22%)	08 (50,00%)	13 (37,14%)	0,265 ^a
<i>Sim, oral</i>	04 (17,39%)	05 (31,25%)	18 (51,43%)	
<i>Sim, injetável</i>	02 (8,70%)	02 (12,50%)	02 (5,71%)	
<i>Sim, DIU</i>	02 (8,70%)	01 (6,25%)	02 (5,71%)	
Idade da Primeira Relação Sexual (anos)				
≤17	07 (31,82%)	11 (68,75%)	23 (69,70%)	0,012 ^a
≥18	15 (68,18%)	05 (31,25%)	10 (30,30%)	
Parceiros Sexuais (durante toda vida)[*]				
0	0	0	0	0,108 ^a
1	05 (27,78%)	02 (13,33%)	02 (9,52%)	
2	04 (22,22%)	02 (13,33%)	0	
3	03 (16,67%)	02 (13,33%)	03 (14,29%)	
≥ 4	06 (33,33%)	09 (60,01%)	16 (76,19%)	
Gestações^f				
0	02 (8,70%)	03 (21,43%)	02 (6,06%)	0,767 ^a
1	06 (26,09%)	04 (28,57%)	13 (39,39%)	
2	07 (30,43%)	04 (28,57%)	09 (27,27%)	
3	05 (21,74%)	02 (14,29%)	04 (12,12%)	
4	02 (8,70%)	0	0	
≥ 5	01 (4,35%)	01 (7,14%)	05 (15,15%)	
Idade do Primeiro Parto (anos)[*]				
≤17	02 (10,53%)	04 (40,00%)	08 (28,57%)	0,1695 ^a
≥18	17 (89,47%)	06 (60,00%)	20 (71,43%)	

Abortos				
0	19 (82,61%)	13 (92,86%)	27 (90,00%)	0,514 ^a
1	04 (17,39%)	01 (7,14%)	02 (6,67%)	
4	0	0	01 (3,33%)	
Histórico IST^g				
Não	14 (66,67%)	13 (86,67%)	31 (88,57%)	0,104 ^a
Sim	07 (33,33%)	02 (13,33%)	04 (11,43%)	
Cauterização Prévia (Colo Uterino)				
Não	13 (56,52%)	07 (87,50%)	33 (94,29%)	< 0,001 ^a
Sim	10 (43,48%)	08 (12,50%)	02 (5,71%)	
Menopausa				
Não	12 (52,17%)	14 (93,33%)	21 (95,45%)	< 0,001 ^a
Sim	11 (47,83%)	01 (6,67%)	01 (4,55%)	
Histórico Familiar de Câncer^h				
Não	03 (14,29%)	06 (37,50%)	06 (17,65%)	0,182 ^a
Sim	18 (85,71%)	10 (62,50%)	28 (82,35%)	

LEGENDA: Valores de *p* obtidos pelo ^ateste do Qui-quadrado (χ^2) com correção de *Yates* ou ^bANOVA. ^cAF. Regular = pelo menos uma hora/ duas vezes por semana; ^dTabagismo = Nunca fumou, reportou nunca ter fumado; Ex-fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no passado, mas não fumou no último ano; Fumante, reportou fumar em média pelo menos um cigarro/ dia no ano anterior à coleta; ^eOutras doenças associadas, incluindo doenças cardiovasculares (como hipertensão arterial sistêmica e hipercolesterolemia), doenças metabólicas (como diabetes *mellitus* tipo II e hipotireoidismo) e doenças psíquicas (ansiedade e depressão). ^fGestações = gestações com parto (*i.e.*, excluindo-se abortos); ^gHistórico ISTs = histórico de outras infecções sexualmente transmissíveis [reportou antecedente(s) de ISTs]; ^hHistórico Familiar de Câncer (qualquer grau de parentesco). *Optou-se por incluir os dados referentes a este parâmetro, porém o mesmo pode não ser representativo, uma vez que o número amostral de um (ou mais) grupo(s) é reduzido. AF, atividade física; CC, câncer cervical; DIU, dispositivo intrauterino; IMC, Índice de Massa Corporal; ISTs, infecções sexualmente transmissíveis; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

De maneira geral, em todas as comparações propostas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a maioria dos parâmetros avaliados, incluindo: cor autodeclarada, idade, IMC, prática ou não de atividade física regular, tabagismo, número de parceiros sexuais, número de gestações e aborto(s), idade do primeiro parto, histórico de IST ou histórico familiar de câncer. Por sua vez, observou-se variação significativa, em uma ou mais comparações para os seguintes parâmetros: presença ou ausência de doenças associadas, uso ou não de contraceptivos hormonais, idade da primeira relação sexual, histórico de cauterização prévia no colo uterino, e menopausa. Estes são melhor apresentados e discutidos na sequência.

Considerando-se as diferentes comparações propostas, foi observada maior frequência de participantes sem outras doenças associadas no(s) grupo(s): LIEAG+CC em relação ao SL+LIEBG ($p<0,001$); CC em relação ao grupo SL ($p=0,007$); LIE e CC em relação ao grupo SL ($p=0,002$); e LIEAG+CC em relação aos grupos SL e LIEBG ($p<0,001$). Em conjunto estes dados mostram que a maioria das mulheres diagnosticadas com LIEAG+CC participantes do presente estudo não tem outra doença associada (pelo menos não diagnosticada e conhecida/ informada pelas mesmas) (**TABELAS 3-6**). Por sua vez, a proporção de mulheres com e sem doença associada é semelhante entre mulheres diagnosticadas com LIEBG (**TABELA 6**), enquanto há frequência aumentada de mulheres com doença associada no grupo SL (**TABELAS 4-6**).

Tais resultados parecem controversos inicialmente, uma vez que, de maneira geral, tende-se a pensar que mulheres com outras comorbidades tenderiam a desenvolver lesões em estágios mais avançados, por razões diversas, incluindo alterações no estado imunológico ou alterações sistêmicas, geradas em consequência da presença de outra(s) doença(s). Em função disso, buscou-se identificar parâmetros adicionais que poderiam explicar tal discrepância, como a idade. Todavia, não houve diferença entre as médias de idade dos diferentes grupos (em todas as comparações), nem em outro parâmetro que pudesse justificar tais resultados baseado no que se tem descrito na literatura. Assim, acredita-se que tais achados possam refletir características particulares do grupo amostral, ou podem ser explicados por outros fatores não avaliados. Outra explicação, ainda que meramente especulativa, seria a possibilidade de mulheres diagnosticadas com lesões mais avançadas terem o perfil de não buscarem atendimento médico, o que poderia justificar o fato de

desconhecerem a presença de outras doenças (as quais poderiam existir, porém, sem diagnóstico). Como a informação referente à presença ou ausência de doenças associadas foi baseada na autodeclaração pelas participantes e não em análise de prontuário para verificação do diagnóstico associado, não se pode descartar esta possibilidade.

Adicionalmente, foi observada maior frequência de participantes em uso de contraceptivo oral no grupo CC em relação ao SL ($p=0,004$), assim como no grupo com CC em relação aos grupos SL e LIE ($p=0,018$) (**TABELAS 4 e 5**). Em contrapartida, as proporções de mulheres SL e com LIE que não utilizam método contraceptivo ou utilizam o contraceptivo oral não diferiram estatisticamente (**TABELA 5**). Ainda, considerando-se o uso de “contracepção hormonal” como a união das participantes que utilizam pílula, injeção ou DIU, observou-se igualmente diferença significativa entre os grupos SL *versus* CC ($p=0,011$) e SL *versus* LIE *versus* CC ($p=0,015$) (dados não tabulados). Enquanto a frequência de participantes em uso de qualquer contraceptivo hormonal é maior entre mulheres diagnosticadas com CC (81,25%), a frequência de mulheres que não usam qualquer método é maior entre pacientes SL (65,22%). No grupo com LIE não houve variação expressiva na proporção de mulheres que usam ou não qualquer método contraceptivo hormonal (48,57% e 51,43%, respectivamente).

A maior frequência de mulheres em uso de contraceptivo oral (ou “hormonal”, em geral) no grupo com CC pode estar associada à influência de fatores hormonais no risco aumentado de desenvolver CC (ROURA *et al.*, 2016). Estima-se, por exemplo, que o uso de contraceptivos orais por 10 anos, por volta dos 20 a 30 anos, aumente consideravelmente a incidência de CC invasivo aos 50 anos (de 7,3 para 8,3 mulheres por 1000, em países menos desenvolvidos; de 3,8 para 4,5 mulheres por 1000 nos países mais desenvolvidos). Este risco aumenta com o tempo de uso do contraceptivo, e diminui ao longo dos anos após sua administração ser interrompida (APPLEBY *et al.*, 2007). A possível associação do uso de contraceptivos injetáveis ou do DIU com aumento de risco de CC ainda não está bem consolidada, mas existem evidências da mesma (APPLEBY *et al.*, 2007; LOOPIK *et al.*, 2020).

Igualmente, observou-se associação significativa entre a idade da primeira relação sexual e os diferentes graus de lesão. Enquanto a maioria das participantes do grupo SL iniciou sua atividade sexual após os 18 anos (18 ou mais), observou-se maior a frequência de mulheres que iniciaram a atividade sexual antes dos 17 anos

(17 ou menos) nos grupos com LIE e CC em comparação ao grupo SL, assim como nos grupos LIEBG e LIEAG+CC em comparação ao grupo SL. O início precoce da atividade sexual é bem descrito como importante fator de risco para o CC, sendo, em geral, maior a incidência de CC em mulheres que iniciaram a atividade sexual antes dos 18 anos de idade (PLUMMER *et al.*, 2012; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

Aditivamente, foi observada maior frequência de participantes sem histórico de cauterização no colo uterino no grupo LIEAG+CC em relação ao SL+LIEBG ($p=0,014$), assim como no grupo com CC em relação ao grupo SL ($p=0,029$), nos grupos LIE e CC em relação ao grupo SL ($p=0,001$) e nos grupos LIEAG+CC e LIEBG em relação ao grupo SL ($p<0,001$). Conjuntamente, tais dados demonstram que a maioria das mulheres diagnosticadas com LIE e CC, participantes do presente estudo, não tem histórico prévio de cauterização (**TABELAS 4 e 5**). Além disso, a proporção de mulheres sem cauterização prévia nos grupos com LIE e CC parece aumentar, de certa maneira, proporcionalmente ao grau de lesão apresentado. Tais achados podem indicar a falta de acompanhamento ginecológico dessas pacientes.

Considerando a história natural da infecção pelo HPV e o desenvolvimento do CC, é importante ressaltar que este é um processo lento, levando anos ou até mesmo décadas para ocorrer (MOSCICKI *et al.*, 2012; ZSEMLYE, 2008). Portanto, em geral, uma paciente com LIE (especialmente LIEAG) ou CC, provavelmente já apresenta tal lesão há um tempo considerável, demonstrando que ou não teve acompanhamento ginecológico ou este não foi adequado (de maneira geral, pacientes com LIEAG são encaminhadas para cauterização e são acompanhadas, salvo em algumas situações). É interessante ressaltar que no grupo SL nota-se porcentagens semelhantes entre mulheres sem e com histórico de cauterização. Assim, nas que apresentam histórico de cauterização prévia, esta parece ter sido eficaz na prevenção de novas lesões, evitando a recorrência. Esta, por sua vez, é sempre um risco para essas pacientes, uma vez que muitos fatores como idade (especialmente acima de 50 anos), persistência de HPV-AR, tabagismo, multiparidade e imunocomprometimento, muitas vezes se mantém mesmo após a cauterização de uma lesão prévia, favorecendo o surgimento de uma nova lesão (INCA, 2011).

Por fim, considerando-se as diferentes comparações propostas, observou-se maior frequência de mulheres que ainda não passaram pela menopausa no grupo LIEAG+CC em relação ao SL+LIEBG ($p=0,034$), assim como nos grupos LIEAG+CC e LIEBG em relação ao grupo SL ($p<0,001$) (**TABELAS 3 e 6**). Outras comparações

propostas foram realizadas, porém podem não ser representativas devido ao reduzido número de participantes com CC apresentando tal informação. Considerando a menopausa como a fase de transição do período reprodutivo para o não reprodutivo na vida da mulher, marcada por mudanças hormonais, fisiológicas e sociais, frequentemente associada à disfunção sexual (THORNTON; CHERVENAK; NEAL-PERRY, 2015), tais resultados sugerem que os grupos compostos por mulheres com LIE e CC têm em sua maioria integrantes em idade reprodutiva, possivelmente mais ativas sexualmente. Assim, têm maior risco de infecção por um HPV-AR, e consequentemente, maior chance de desenvolver LIE e CC (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

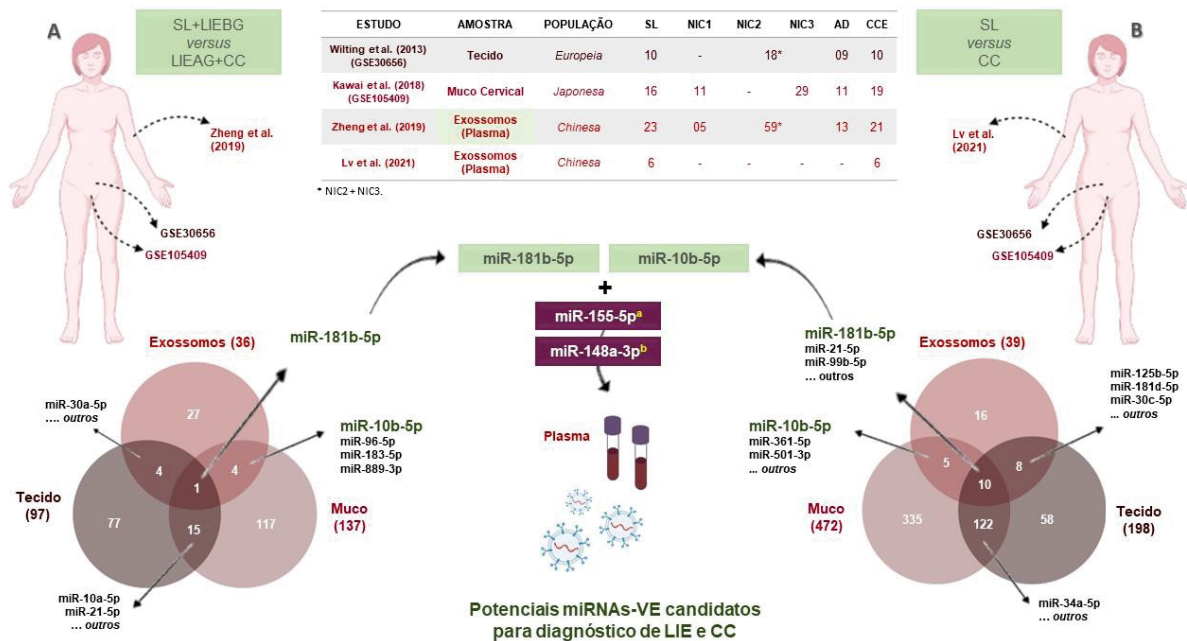
Conjuntamente, os parâmetros analisados acima auxiliam em uma melhor caracterização da população estudada. Tal caracterização é de extrema importância, uma vez que diferenças significativas entre os grupos estudados podem impactar os níveis de quantificação relativa avaliados no presente estudo. Diversos estudos vêm mostrando que alterações nos níveis de diferentes miRNAs circulantes, incluindo miRNAs-VEs, podem estar associados a fatores como IMC, idade, prática de atividade física, tabagismo, entre outros (FLOWERS; WON; FUKUOKA, 2015; MORI *et al.*, 2019; ROME, 2015; WANG *et al.*, 2015; WHITHAM *et al.*, 2018). Sendo assim, é importante se considerar a potencial influência destes diversos fatores quando se quantifica miRNAs circulantes, de maneira geral. Dessa forma, além de apresentar parâmetros satisfatórios (como adequada especificidade e sensibilidade), um bom biomarcador/painel de biomarcadores precisa necessariamente transpor estas potenciais influências, garantindo assim sua acurácia.

4.3 MiRNAs-VE Candidatos Selecionados

A partir da reanálise dos dados – respeitando-se as duas abordagens adotadas – e realizada a intersecção dos resultados obtidos nas análises para tecido e muco cervical com os respectivos resultados apresentados pelos estudos de referência (envolvendo exossomos plasmáticos), definiu-se miRNAs comuns diferencialmente expressos nos diferentes materiais biológicos avaliados. A **FIGURA 10** apresenta os principais resultados observados. Ressalta-se que nesta análise são considerados miRNAs “diferencialmente expressos” de maneira geral. Para esta

análise inicial, os níveis de expressão (como mais ou menos expressos em relação aos grupos propostos), nos diferentes materiais, não foram considerados.

FIGURA 10 - POTENCIAIS miRNAs-VE CANDIDATOS PARA DIAGNÓSTICO DE LIE E CC



LEGENDA: A partir de dados de diferentes estudos investigando miRNAs diferencialmente expressos em diferentes materiais biológicos – tecido (WILTING *et al.*, 2013), muco cervical (KAWAI *et al.*, 2018) e exossomos plasmáticos (LV *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2019) – definiu-se miRNAs comuns diferencialmente expressos, por análise de bioinformática. Curiosamente, em ambas as abordagens, o miR-181b-5p apresentou-se diferencialmente expresso em exossomos plasmáticos, tecido e muco cervical, enquanto o miR-10b-5p mostrou-se diferencialmente expresso tanto no muco cervical, quanto em exossomos plasmáticos. Dessa forma, ambos foram selecionados como potenciais miRNAs-VE plasmáticos candidatos para diagnóstico de CC e lesões precursoras. Adicionalmente, incluem-se dois miRNAs – miR-155-5p^a e miR-148a-3p^b – ambos descritos na literatura como presentes em exossomos plasmáticos, apresentando potencial diagnóstico/prognóstico no CC. ^aEste miRNA, além de escolhido por seu potencial papel baseado em dados da literatura, também foi encontrado diferencialmente expresso no muco cervical, em ambas as abordagens descritas acima. ^bEste miRNA, além de escolhido por seu potencial papel baseado em dados da literatura, também foi encontrado diferencialmente expresso no tecido cervical, quando comparou-se amostras SL versus CC (Abordagem B). AD, adenocarcinoma; CC, câncer cervical; CCE, carcinoma de células escamosas; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; SL, sem lesão. **FONTE:** A autora (2022).

Considerando-se a abordagem A, apenas um miRNA – miR-181b-5p – apresentou-se diferencialmente expresso em todos os materiais biológicos analisados (tecido, muco e exossomos plasmáticos); quatro miRNAs – miR-10b-5p, miR-96-5p, miR-183-5p e miR-889-3p – encontraram-se diferencialmente expressos no muco e em exossomos plasmáticos; quatro no tecido e em exossomos plasmáticos, incluindo o miR-30a-5p; e quinze no tecido e no muco cervicais, incluindo os miR-10a-5p e miR-

21-5p (**FIGURA 10; APÊNDICE 7, TABELA SUPLEMENTAR 1**). Por sua vez, considerando-se a abordagem B, dez miRNAs apresentaram-se diferencialmente expressos em todos os materiais biológicos analisados (tecido, muco e exossomos plasmáticos), incluindo os miR-181b-5p, miR-21-5p e miR-99b-5p; cinco miRNAs encontraram-se diferencialmente expressos no muco e em exossomos plasmáticos, incluindo os miR-10b-5p, miR-361-5p e miR-501-3p; oito no tecido e em exossomos plasmáticos, incluindo os miR-30c-5p; e 122 no tecido e no muco cervical, incluindo o miR-34a-5p (**FIGURA 10; APÊNDICE 7, TABELA SUPLEMENTAR 2**).

Curiosamente, o miR-181b-5p mostrou-se diferencialmente expresso em todos os tipos de materiais biológicos avaliados (tecido, muco cervical e exossomos plasmáticos), tanto entre amostras SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC (Abordagem A), quanto entre amostras SL *versus* CC (Abordagem B). Por sua vez, o miR-10b-5p mostrou-se diferencialmente expresso tanto no muco cervical, quanto em exossomos plasmáticos, entre amostras SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC (Abordagem A), assim como entre amostras SL *versus* CC (Abordagem B). Dessa forma, ambos foram selecionados como potenciais miRNAs-VE plasmáticos candidatos para diagnóstico de CC e lesões precursoras.

De maneira complementar, baseado em dados da literatura, selecionou-se dois miRNAs candidatos – miR-148a-3p e miR-155-5p. Ambos são descritos como presentes em exossomos plasmáticos (CHEN *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2019b; WU *et al.*, 2020), apresentando potencial diagnóstico/prognóstico no CC (HAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2018a), apesar de ainda não funcionalmente bem descritos nesse contexto. Destaca-se que o miR-155-5p foi encontrado diferencialmente expresso no muco cervical em ambas as abordagens adotadas. Por sua vez, o miR-148a-3p foi encontrado diferencialmente expresso no tecido cervical, quando foram comparadas amostras SL *versus* CC (Abordagem B).

Posteriormente à seleção de miRNAs candidatos, considerou-se os níveis de expressão destes nos diferentes materiais avaliados (**TABELA 7**). Na sequência, são melhor apresentados e discutidos os resultados obtidos através da análise dos dados pela estratégia de bioinformática, adotando-se as duas abordagens propostas. São também discutidas e apresentadas as evidências que reforçaram a escolha desses miRNAs como candidatos a terem seus níveis avaliados em VEs isoladas a partir do plasma de amostras de controles e pacientes brasileiras.

TABELA 7 - PERFIS DE EXPRESSÃO DOS DIFERENTES miRNAs SELECIONADOS EM DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS

miRNA	Abordagem A		Abordagem B	
	SL+LIEBG	LIEAG+CC	SL	CC
miR-10b-5p				
Tecido	-	-	-	-
Muco	↓	↑	↑	↓
Exossomos (Plasma)	↑	↓	↑	↓
miR-148a-3p				
Tecido	-	-	↓	↑
Muco	-	-	-	-
Exossomos (Plasma)	-	-	-	-
miR-155-5p				
Tecido	-	-	-	-
Muco	↓	↑	↑	↓
Exossomos (Plasma)	-	-	-	-
miR-181b-5p				
Tecido	↑	↓	↑	↓
Muco	↓	↑	↑	↓
Exossomos (Plasma)	↑	↓	↓	↑

LEGENDA: A partir da reanálise dos conjuntos de dados disponíveis publicamente, referentes aos dois estudos investigando a expressão diferencial de diversos miRNAs no tecido (WILTING *et al.*, 2013) e no muco cervical (KAWAI *et al.*, 2018), obteve-se os diferentes perfis de expressão de todos ou alguns dos miRNAs selecionados como potenciais candidatos, nestes materiais. Por sua vez, os perfis de expressão dos miRNAs selecionados em exossomos plasmáticos foram obtidos acessando os resultados apresentados em ambas as publicações selecionadas para as duas abordagens adotadas (LV *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2019). ↑, expressão aumentada; ↓, expressão diminuída. CC, câncer cervical; LIEBG, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIEAG, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).

4.3.1 miR-10b-5p

Apesar de não ter sido reportado como diferencialmente expresso no tecido cervical em nenhuma das abordagens adotadas, este miRNA apresentou níveis diferentes tanto em exossomos plasmáticos, quanto no muco cervical, em ambas as abordagens. No muco, observou-se variação nos níveis deste miRNA, sendo este menos abundante em amostras SL+LIEBG em relação a amostras LIEAG+CC; por sua vez, mais abundante em amostras SL em relação a amostras com CC (**TABELA 7**). Tais diferenças podem estar associadas às diferentes classificações adotadas, uma vez que no muco analisou-se o mesmo conjunto amostral, porém agrupando-se as amostras de maneiras diferentes. Assim, pode haver fatores que estão influenciando tais resultados, e que acabam sendo evidenciados quando as amostras são alocadas de maneira diferente.

Apesar dos resultados divergentes acima mencionados, os níveis do miR-10b-5p foram coincidentes em exossomos plasmáticos, sendo este mais abundante no

grupo SL+LIEBG e SL em relação ao grupo LIEAG+CC e CC, respectivamente. Tais resultados, conjuntamente, podem sugerir sua potencial ação como um miRNA supressor tumoral, tendendo este a ser menos expresso em estágios mais avançados. Esta tendência a ter sua expressão diminuída durante a progressão para o CC vem, inclusive, sendo reportada na literatura. Investigando a expressão tecidual deste em controles e pacientes com diversos graus de lesão cervical, demonstrou-se que esta vai diminuindo ao longo da progressão para o CC, tendo seus níveis mais diminuídos em amostras com fenótipo tumoral mais agressivo (ZOU *et al.*, 2016).

Tais achados têm sido reproduzidos por diversos pesquisadores (HOU; WANG; LU, 2017; HUANG *et al.*, 2012; SOMMEROVA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018), sugerindo de maneira consistente seu papel como supressor tumoral no CC, pelo menos a nível tecidual. Embora ainda pouco descrito na literatura no contexto do câncer em geral, este miRNA tem como alvo genes chave na regulação do ciclo celular, proliferação celular e apoptose, entre eles *BIRC5*, *E2F2*, *FOXM1*, *MCM5*, *p21* e *TP53* (LU *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019).

Em exossomos, já se observou níveis aumentados do miR-10b-5p no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular em estágios iniciais (CHO *et al.*, 2020), assim como em pacientes com leucemia mieloide aguda, estando estes associados à redução na sobrevida global destes pacientes (FANG *et al.*, 2020). Igualmente, já foi reportado aumento significativo nos níveis deste miRNA em exossomos isolados do plasma de pacientes com outros tipos de tumores, incluindo o de pulmão (LIU *et al.*, 2017a) e o adenocarcinoma ductal pancreático (LAI *et al.*, 2017).

Assim, apesar dos perfis não coincidentes observados para o muco, os resultados relacionados à abundância deste em exossomos plasmáticos obtidos através da análise de bioinformática, somado aos dados da literatura, especialmente no contexto do CC, tornam o miR-10b-5p um candidato interessante a ser avaliado em exossomos.

4.3.2 miR-148a-3p

Apesar de não reportado como um dos miRNAs comuns diferencialmente expressos em dois ou mais diferentes materiais biológicos, através da análise de bioinformática, pode-se observar a expressão diferencial do miR-148a-3p no tecido cervical. Seus níveis de expressão tecidual foram maiores em amostras com CC em comparação às SL (**TABELA 7**). Tais achados são contrários aos reportados na literatura. De maneira geral, este miRNA é descrito como um miRNA supressor tumoral, responsável por inibir a progressão de diversos tipos de tumores (BAO; GUO, 2020; FU *et al.*, 2020; NERSISYAN *et al.*, 2021; PACZKOWSKA *et al.*, 2020). De maneira semelhante, no CC, este é descrito como um supressor tumoral, pelo menos a nível celular/tecidual (CHEN *et al.*, 2021b; HAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019b). Todavia, a expressão aumentada deste miRNA em alguns tumores, tem sugerido que este possa igualmente atuar como um oncomiR (LI *et al.*, 2016). Dentre importantes genes alvo regulados pelo miR-148a-3p, envolvidos na carcinogênese cervical, destacam-se os genes *DNMT1*, *E2F7* e *MET* (CHEN *et al.*, 2021; ZONG *et al.*, 2019).

Na sua forma circulante, o miR-148a-3p já foi descrito como significativamente diminuído no soro de pacientes com câncer colorretal em comparação a controles (PENG *et al.*, 2020), assim como no plasma de pacientes com câncer gástrico (BAO; GUO, 2020) ou câncer de mama (LI *et al.*, 2020). A quantificação variável deste miRNA também vem sendo descrita em exossomos. Comparando-se os níveis do miR-148a-3p em exossomos isolados de soro entre controles, pacientes com tumores benignos e com câncer de mama, observou-se uma diminuição gradativa na quantificação deste, sendo esta significativamente menor em pacientes com câncer de mama (LI *et al.*, 2020). Igualmente, demonstrou-se a redução significativa deste miRNA em exossomos isolados do soro de pacientes com câncer de tireoide em comparação aos níveis observados em amostras de pacientes com tumores benignos ou controles (LI *et al.*, 2021). Por sua vez, os níveis exossomais séricos do miR-148a-3p mostraram-se significativamente aumentados em pacientes com carcinoma hepatocelular em relação aos observados em exossomos provenientes de pacientes com cirrose hepática e controles (WANG *et al.*, 2018b).

Estudos investigando os perfis de quantificação exossomais do miR-148a-3p no CC ainda não foram reportados. Assim, considerando o potencial envolvimento

deste no CC, somado às evidências acima apresentadas, optou-se por incluí-lo como candidato a ter seu potencial avaliado experimentalmente.

4.3.3 *miR-155-5p*

Devido à extensa rede de sinalização associada ao *miR-155-5p*, seu papel na regulação do sistema imunológico, no processo de inflamação e na hematopoiese, este miRNA vem se destacando no cenário clínico. Atualmente, este tem sido cotado como um dos miRNAs mais importantes no contexto do câncer em geral (GULEI *et al.*, 2019; MAHESH; BISWAS, 2019). O *miR-155-5p* é bem descrito na literatura como um oncomiR, tendo sua expressão aumentada em uma vasta gama de neoplasias hematológicas e tumores sólidos. Inclusive, inúmeros protocolos de pesquisa estão focados na modulação pré-clínica deste para fins terapêuticos, além da investigação de sua expressão dinâmica para avaliações diagnósticas/prognósticas, objetivando incluí-lo no cenário clínico (GULEI *et al.*, 2019). No contexto do CC, diferentes estudos mostram os efeitos pró-tumorais associados a este miRNA, entre eles: estímulo à proliferação celular (LAO *et al.*, 2014) e à transição epitélio-mesênquimal (TEM) (YANG *et al.*, 2020), favorecendo a ocorrência de metástases (LI *et al.*, 2019c). Dentre os alvos regulados pelo *miR-155-5p*, envolvidos na carcinogênese cervical, incluem-se os genes *PDK1* e *TP53INP1* (LI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018).

A expressão aumentada do *miR-155-5p* em amostras tumorais cervicais em comparação a controles é reportada (GOCZE *et al.*, 2013), sendo esta associada a um pior prognóstico em pacientes com CC (FANG *et al.*, 2016). Adicionalmente, analisando-se os perfis de expressão do *miR-155-5p* a partir de células cervicais (obtidas pelo exame preventivo), observou-se aumento significativo dos níveis desse miRNA nos estágios de LIE em relação ao SL (AZIMI *et al.*, 2021). Níveis aumentados de *miR-155-5p* circulante também foram associados a estágios mais avançados de lesão em outros materiais biológicos, entre eles no soro (OKOYE *et al.*, 2019) e na urina (AFTAB *et al.*, 2021). Até o presente momento, não há estudos publicados investigando os perfis de *miR-155-5p* em VEs isoladas de mulheres com LIE e/ou CC. Porém, a presença deste miRNA em exossomos já foi descrita (CHEN *et al.*, 2021a; GONZALEZ-VILLASANA *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2021; NIU *et al.*, 2021).

No presente estudo, através da análise de bioinformática, observou-se quantificação diferencial do *miR-155-5p* no muco cervical em ambas as abordagens

adotadas. Todavia, seus perfis de expressão variaram, sendo este menos abundante em amostras SL+LIEBG em relação a amostras LIEAG+CC; porém, mais expresso em amostras SL em relação a amostras com CC (**TABELA 7**). Conforme discutido acima, essa discrepância observada para os resultados obtidos a partir das amostras de muco (também observada para miR-10b-5p) podem estar associadas à realocação das amostras em diferentes grupos, uma vez que o mesmo conjunto amostral foi analisado. Não obstante, baseando-se nas evidências reportadas na literatura demonstrando a importância deste miRNA no câncer, assim como no CC, optou-se por incluir o miR-155-5p como um dos candidatos a ser quantificado em exossomos e que pode vir a compor um futuro painel.

4.3.4 miR-181b-5p

Por sua vez, o miR-181b-5p se destacou sendo diferencialmente expresso em todos os três materiais biológicos avaliados, e em ambas as abordagens. No tecido, este miRNA esteve mais expresso no grupo SL+LIEBG e SL em relação ao grupo LIEAG+CC e CC, respectivamente. Assim, sugere-se seu potencial papel supressor tumoral no microambiente cervical a nível tecidual. Adicionalmente, considerando-se os dados conjuntamente, pode-se sugerir que este miRNA passe a ser menos expresso a medida em que ocorre a progressão para LIEAG e CC. A diminuição dos níveis desse miRNA a nível tecidual nesta etapa poderia então favorecer a carcinogênese cervical.

Em relação aos níveis no muco e em exossomos plasmáticos, pode-se observar resultados discrepantes entre as diferentes abordagens (**TABELA 7**). No caso da avaliação em exossomos plasmáticos, é importante ressaltar que aqui considera-se dois estudos diferentes. Estes apresentam número amostral bastante diverso, além de incluírem amostras que podem apresentar características distintas (apesar de ambos incluírem mulheres chinesas). Já os níveis no muco foram obtidos analisando-se a mesma o mesmo conjunto amostral, porém agrupando-se as amostras de maneiras diferentes. Aqui não se consegue inferir um padrão como se sugeriu para a expressão desse miRNA a nível tecidual. Além disso, podem haver fatores que estão influenciando tais resultados conforme discutido acima (também observados para os miR-10b-5p e miR-155-5p, no muco).

O papel do miR-181b-5p em diferentes tipos de tumores ainda é bastante controverso. A nível tecidual, seu papel como miRNA oncogênico parece ser melhor estabelecido em alguns tumores, como os de mama (MARYAM; NAEMI; HASANI, 2021; TAHA *et al.*, 2020) e colorretal (GU *et al.*, 2018; SABERINIA *et al.*, 2020), enquanto sua ação como supressor tumoral parece ser consistente em gliomas (SHI *et al.*, 2008, 2013; YIN *et al.*, 2020). Em outros, como nos tumores de pulmão (BRAICU *et al.*, 2019), os padrões de expressão deste miRNA ainda não são claros. Igualmente, ainda são poucos os genes-alvo deste miRNA descritos na literatura, assim como são poucos os estudos investigando os níveis deste miRNA em exossomos no câncer (LAI *et al.*, 2021; YUN *et al.*, 2019).

Semelhantemente, são poucos os trabalhos publicados investigando o papel do miR-181b-5p na carcinogênese cervical. Sabe-se, até o presente momento, que este parece estimular a proliferação celular e inibir a apoptose em células cervicais tumorais (YANG *et al.*, 2014), modulando a expressão de inúmeros genes envolvidos nestes processos celulares (HE *et al.*, 2010). Tais dados já contrastam com os dados preditos no presente estudo, quando considerado o padrão de expressão deste miRNA a nível tecidual (menos expresso em lesões mais avançadas). Conjuntamente, todas as informações apresentadas reforçam o interesse em melhor estudar e entender o papel deste miRNA no contexto do CC, inclusive em exossomos.

4.4 Quantificação Relativa dos miRNAs-VE Candidatos

Os diferentes miRNAs-VE selecionados como potenciais candidatos⁴, foram quantificados e comparados entre os diferentes grupos propostos, conforme apresentado na **TABELA 1**. Dessa forma, buscou-se determinar potenciais biomarcadores dos diferentes estágios de LIE e/ou CC para a amostra populacional estudada.

⁴ Exceto do miR-155-5p, que ainda será avaliado.

4.4.1 miR-10b-5p

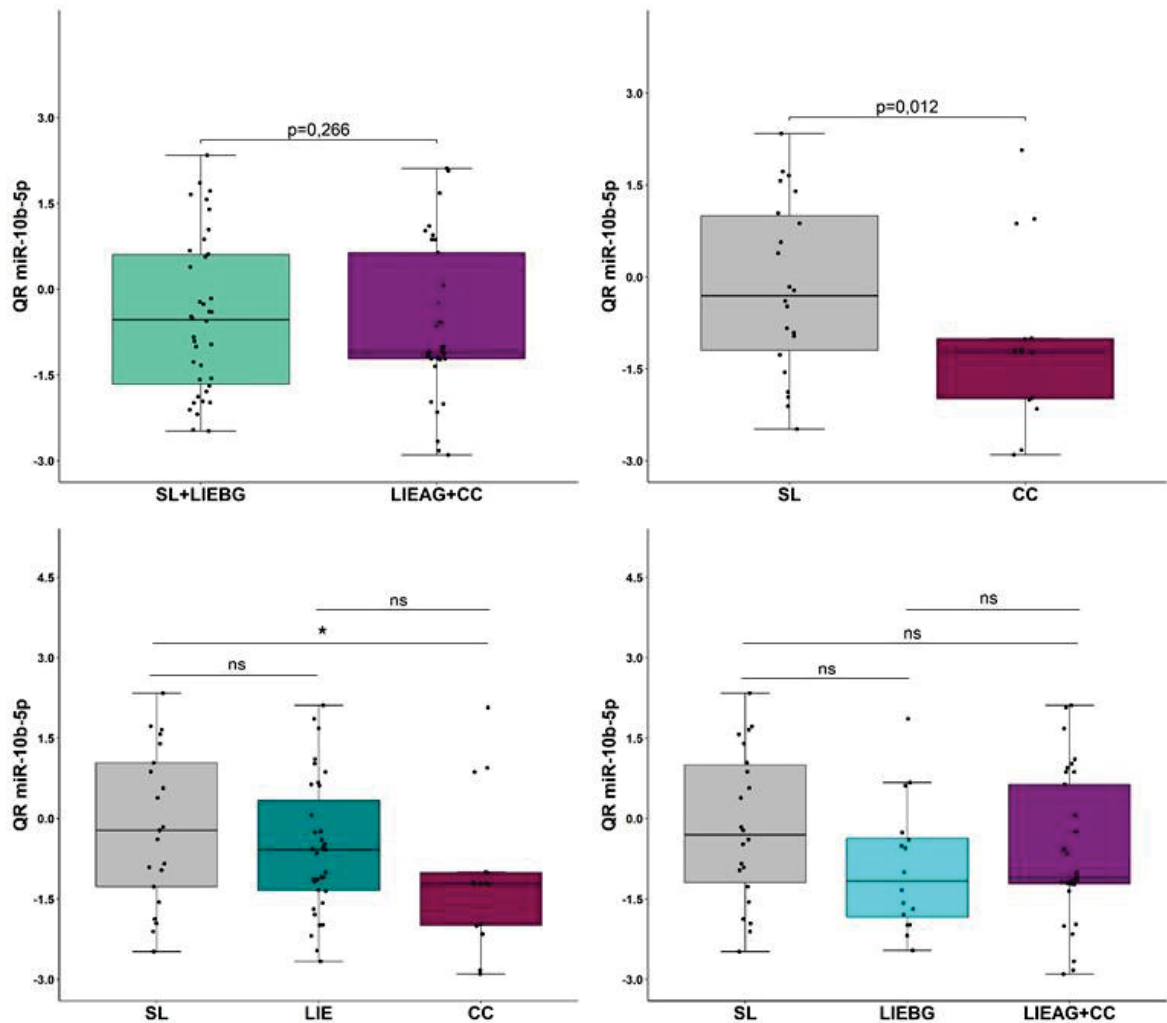
Comparando-se os grupos SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,266$) considerando-se o miR-10b-5p. Todavia, comparando-se os valores de QR apenas entre amostras SL *versus* CC, observou-se níveis aumentados deste miRNA-VE em amostras SL em relação a amostras com CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,012$; *fold-change*_{SL x CC} = 1,883) (**FIGURA 11**). Igualmente, conforme esperado, observou-se diferença significativa entre estes dois grupos, quando comparados os grupos SL *versus* LIE *versus* CC, conjuntamente (*Kruskal-Wallis*; $p=0,041$) (p ajustado=0,047; *fold-change*_{SL x CC} = 1,883). Por fim, comparando-se os grupos SL *versus* LIEBG *versus* LIEAG+CC, não foi observada diferença significativa. Em conjunto, os perfis de quantificação relativa observados sugerem que, em mulheres brasileiras, este miRNA tenha seus níveis diminuídos em VEs plasmáticas no estágio de CC.

Comparando-se os resultados acima apresentados, com os resultados dos dois artigos adotados como referência (LV *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2019), observa-se perfis semelhantes, com os níveis deste miRNA-VE tendendo a diminuir em estágios mais avançados de lesão (sendo este mais abundante em VEs plasmáticas isoladas de amostras SL+LIEBG e amostras SL do que em VEs isoladas de amostras LIEAG+CC e CC, respectivamente). No entanto, observou-se diferenças relacionadas ao estágio onde esta diminuição parece ocorrer. No estudo conduzido por Zheng *et al.* (2019), demonstrou-se que a diminuição dos níveis desse miRNA-VE ocorre já a partir do estágio de LIEAG. Experimentalmente, observou-se diminuição significativa apenas a partir do estágio de CC, sendo este aproximadamente duas vezes mais abundante em VEs plasmáticas de controles SL em relação a VEs plasmáticas isoladas de pacientes com CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,012$; *fold-change*_{SL x CC} = 1,883).

Alguns fatores poderiam explicar tais discrepâncias. Entre eles, pode-se citar: as diferenças referentes ao conjunto amostral analisado, incluindo diferentes populações estudadas (mulheres chinesas *versus* brasileiras); diferenças quanto ao número amostral total (121 *versus* 74, respectivamente), assim como na proporção de controles e pacientes com LIE (SL: 19,1% *versus* 31,08%; LIEBG: 4,13% *versus* 21,62%; LIEAG: 48,76% *versus* 25,68%, respectivamente). Ainda, fatores

relacionados a características intrínsecas ao conjunto amostral analisado (incluindo diferenças em fatores sociodemográficos, clínicos, entre outros) podem também contribuir para as diferenças observadas.

FIGURA 11 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO miR-VE-10b-5p NOS DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS



LEGENDA: Quantificação relativa do miR-VE-10b-5p presente em VEs plasmáticas de controles e pacientes, de acordo com diferentes classificações propostas. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação deste miRNA entre os grupos SL+LIEBG versus LIEAG+CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,266$), nem comparando os grupos SL versus LIEBG versus LIEAG+CC (*Kruskal-Wallis*; $p=0,186$). Por sua vez, comparando-se os valores de QR entre os grupos SL versus CC, observou-se maior quantificação deste miR-VE em no grupo SL em relação ao com CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,012$; *fold-change*_{SL x CC}=1,883). Igualmente, foi observada diferença significativa entre estes dois grupos, quando comparados os grupos SL versus LIE versus CC, conjuntamente (*Kruskal-Wallis*; $p=0,041$) (p ajustado=0,047; *fold-change*_{SL x CC}=1,883). Os valores de QR foram calculados com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$). Para fins de melhor visualização, estes estão dispostos no eixo y (representados como log2). CC = câncer cervical; LIEAG = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; QR = quantidade relativa; SL = sem lesão; ns, não significativo ($p>0.05$); * $p<0.05$. FONTE: A autora (2022).

Adicionalmente, as evidências acima sugerem sua importância no contexto da carcinogênese cervical, tanto a nível tecidual, quanto a nível sistêmico associado a VEs plasmáticas. Curiosamente, os perfis de expressão deste parecem ser consonantes em ambos os compartimentos biológicos, apresentando certa tendência a ter seus níveis diminuídos em estágios mais avançados de lesão cervical (HOU; WANG; LU, 2017; HUANG *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2020; SOMMEROVA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2019).

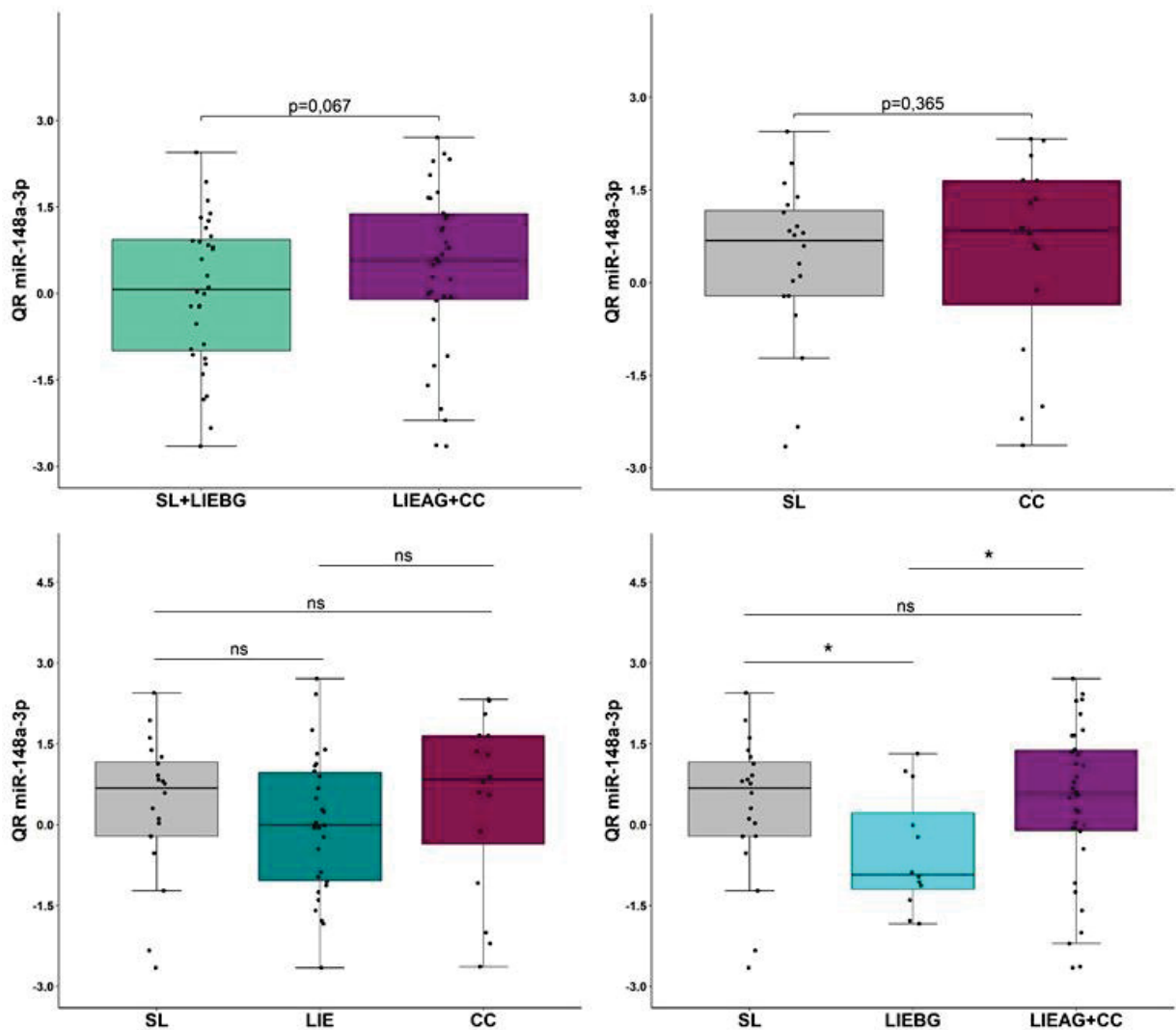
Assim, acredita-se que sendo melhor avaliado em diferentes conjuntos amostrais, envolvendo diferentes populações bem caracterizadas, poderá se definir melhor o estágio em que os níveis deste miRNA-VE sofrem variação significativa (e esta, certamente, pode vir a variar em diferentes populações e condições estudadas), além de consolidar (ou não) seu potencial uso como biomarcador a compor futuros painéis que discriminem estágios mais avançados de lesão cervical.

4.4.2 miR-148a-3p

Comparando-se os perfis de quantificação relativa do miR-148a-3p em VEs plasmáticas nos diferentes grupos, não foram observadas diferenças significativas entre: SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,067$); SL *versus* CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,365$); SL *versus* LIE *versus* CC, conjuntamente (*Kruskal-Wallis*; $p=0,201$). Todavia, comparando-se os valores de QR entre os grupos SL *versus* LIEBG *versus* LIEAG+CC (*Kruskal-Wallis*; $p=0,014$), observou-se diferença significativa entre os grupos SL e LIEBG (p ajustado= $0,036$; *fold-change*_{SL x LIEBG} = 3,437), assim como entre os grupos LIEBG e LIEAG+CC (p ajustado= $0,018$; *fold-change*_{(LIEAG+CC) x LIEBG} = 3,006) (**FIGURA 12**).

Dessa forma, demonstrou-se que em mulheres brasileiras, este miRNA-VE plasmático tem seus níveis inicialmente diminuídos em mulheres com LIEBG em relação às SL; posteriormente, seus níveis parecem aumentar em pacientes com lesões mais avançadas (LIEAG+CC) em relação às com LIEBG. Tais resultados podem refletir um papel “dinâmico” deste miRNA-VE em particular, tendendo este a diminuir em estágios iniciais, e aumentar nos estágios mais avançados de lesão. Este pode ser particular à população estudada, ou comum em diferentes populações.

FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO miR-VE-148a-3p NOS DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS



LEGENDA: Quantificação relativa do miR-VE-148a-3p presente em VEs plasmáticas de controles e pacientes, de acordo com diferentes classificações propostas. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação deste miRNA entre os grupos: SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,067$); SL *versus* CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,365$); SL *versus* LIE *versus* CC (*Kruskal-Wallis*; $p=0,201$). Todavia, comparando-se os valores de QR entre os grupos SL *versus* LIEBG *versus* LIEAG+CC (*Kruskal-Wallis*; $p=0,014$), observou-se diferença significativa entre os grupos SL e LIEBG (p ajustado=0,036; *fold-change*_{SL x LIEBG} = 3,437), assim como entre os grupos LIEBG e LIEAG+CC (p ajustado=0,018; *fold-change*_{(LIEAG+CC) x LIEBG} = 3,006). Os valores de QR foram calculados com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$). Para fins de melhor visualização, estes estão dispostos no eixo y (representados como log2). CC = câncer cervical; LIEAG = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; QR = quantidade relativa; SL = sem lesão; ns, não significativo ($p>0.050$); * $p<0.050$. FONTE: A autora (2022).

Considerando as evidências discutidas anteriormente sobre seu papel em diferentes tumores (seção 4.3.2), percebe-se que apesar de ser descrito a nível tecidual como um miRNA supressor tumoral no CC (CHEN *et al.*, 2021b; HAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019b), ainda não há estudos

investigando o miR-148a-3p a nível sistêmico (nem livre, nem associado a VEs). Sendo assim, ainda são escassas as evidências que possam explicar tais achados, reforçando a necessidade de se melhor compreender seu papel no CC e as aparentes flutuações dinâmicas de seus níveis nos diferentes estágios de LIE/CC.

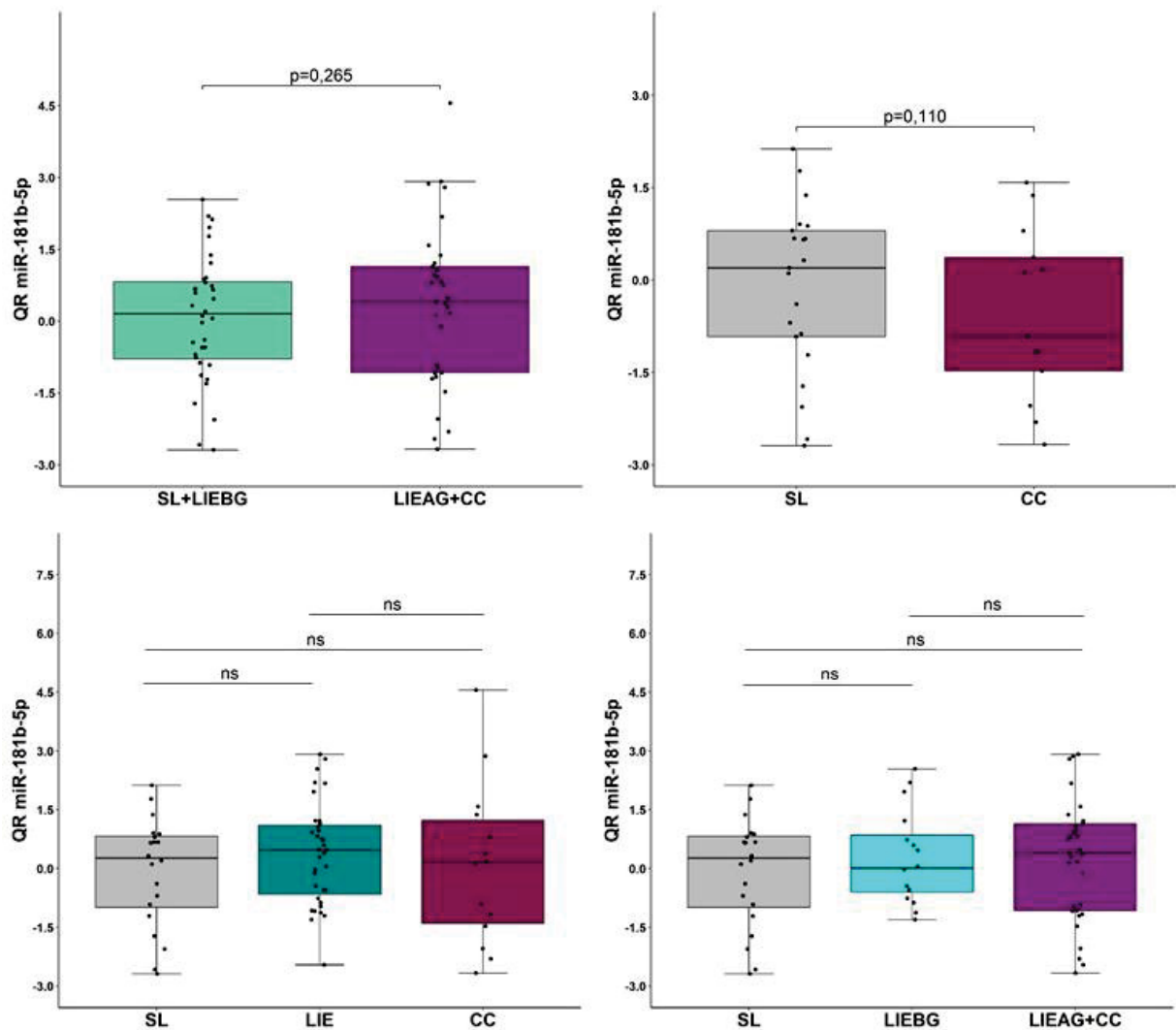
4.4.3 *miR-181b-5p*

Nas análises prévias realizadas, este miRNA-VE se destacou como diferencialmente expresso em todos os três materiais biológicos avaliados, e em ambas as abordagens. Apenas a nível tecidual observou-se maior expressão desse no grupo SL+LIEBG e SL em relação ao grupo LIEAG+CC e CC, respectivamente, sugerindo seu potencial aumento a medida em que ocorre a progressão para a LIEAG e o CC. No entanto, seus níveis em exossomos plasmáticos e no muco não foram coincidentes. Por sua vez, nas amostras provenientes de mulheres brasileiras SL e com LIE/CC, não se observou quantificação diferencial deste miRNA-VE entre os grupos, em nenhuma das comparações realizadas (**FIGURA 13**).

Dentre todos os miRNAs selecionados neste estudo, o miR-181b-5p apresenta-se como o menos “estudado”, sendo seu papel no câncer ainda bastante inconclusivo e, de certa forma, controverso. E, conforme mencionado, seu papel no CC ainda está começando a ser explorado. Dessa forma, existe a possibilidade deste miRNA-VE não apresentar quantificação diferencial em diferentes estágios de lesão e CC, na população estudada (brasileira), mas sim em outras populações. Porém, podem haver outras razões pelas quais não se observaram variações nos níveis desse miRNA.

Por exemplo, mudanças nos níveis de determinados miRNAs e VEs circulantes parecem ser moduladas por diversos fatores, incluindo o IMC, assim como parâmetros bioquímicos como os níveis de HDL-colesterol/triglicerídeos (MORI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015). Igualmente, hábitos relacionados ao estilo de vida, entre eles a prática de exercícios e a dieta, parecem influenciar os níveis circulantes de diferentes miRNAs (FLOWERS; WON; FUKUOKA, 2015; ROME, 2015). Curiosamente, algumas publicações demonstraram a alteração nos níveis circulantes do miR-181b-5p em resposta ao exercício (BANZET *et al.*, 2013; RADOM-AIZIK *et al.*, 2010) e à dieta (TOMÉ-CARNEIRO *et al.*, 2013).

FIGURA 13 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO miR-VE-181b-5p NOS DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS



LEGENDA: Quantificação relativa do miR-VE-181b-5p presente em VEs plasmáticas de controles e pacientes, de acordo com diferentes classificações propostas. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação deste miRNA entre os grupos: SL+LIEBG *versus* LIEAG+CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,265$); SL *versus* CC (*Mann-Whitney*, unicaudal; $p=0,110$); SL *versus* LIE *versus* CC (Kruskal-Wallis; $p=0,536$); SL *versus* LIE *versus* LIEAG+CC (Kruskal-Wallis; $p=0,745$). Os valores de QR foram calculados com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$). Para fins de melhor visualização, estes estão dispostos no eixo y (representados como $\log_2$). CC = câncer cervical; LIEAG = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; QR = quantidade relativa; SL = sem lesão; ns, não significativo ($p>0.050$). FONTE: A autora (2022).

Comparando-se os diferentes grupos quanto à prática de atividade física regular ou não (**TABELAS 3-6**), não foram observadas diferenças. Certamente, neste estudo, a informação referente à prática de exercício não é detalhada, além de ser autodeclarada. Ainda, a proporção de mulheres para a qual tal informação foi obtida é baixa, especialmente quando consideramos o grupo LIEAG+CC. Igualmente, os valores de IMC não variaram entre os diferentes grupos comparados.

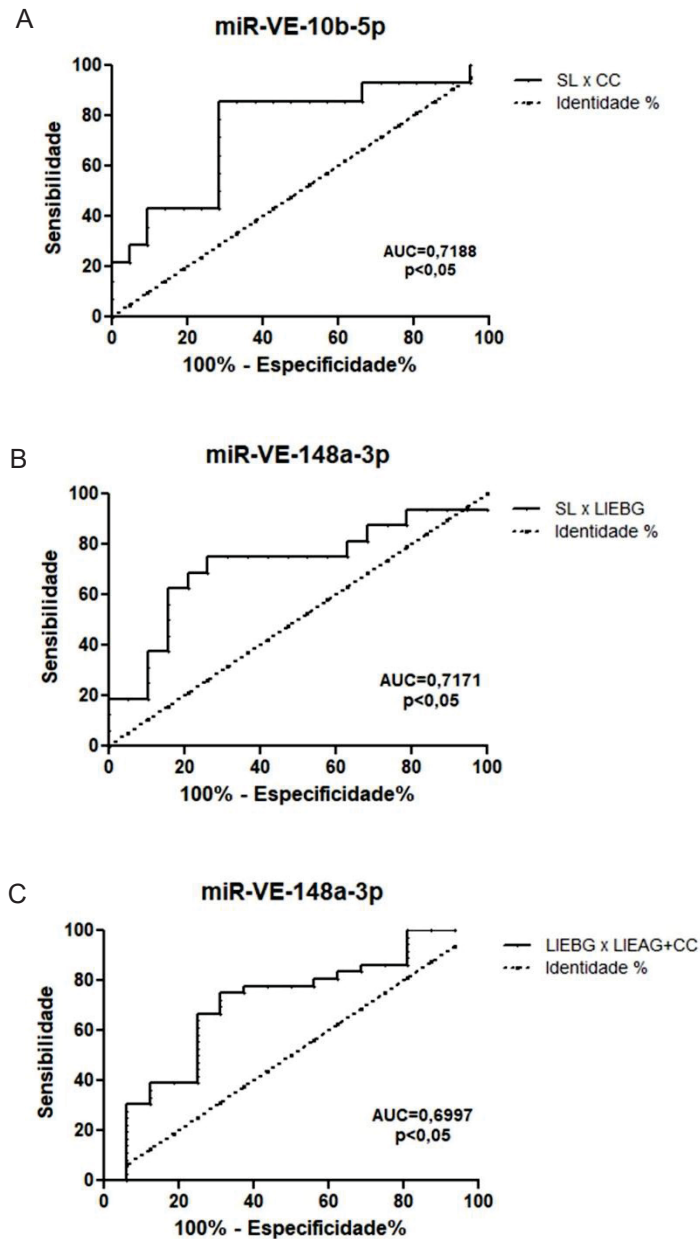
Assim, é importante que mais estudos sejam conduzidos, em diferentes populações bem caracterizadas, a fim de definir o papel do miR-181b-5p no CC. Assim será possível validar ou excluir seu potencial papel como biomarcador, podendo este igualmente ser variável em diferentes populações estudadas.

4.5 Potencial Diagnóstico dos miRNAs-VE Diferencialmente Quantificados

A partir dos resultados apresentados na subseção anterior, alguns miRNAs foram diferencialmente quantificados em algumas comparações: a) miR-10b-5p (potencial em discriminar amostras SL *versus* CC); b) miR-148a-3p (potencial em discriminar amostras SL *versus* LIEBG); e c) miR-148a-3p (potencial em discriminar amostras com LIEBG *versus* LIEAG+CC). Sendo assim, a fim de verificar o potencial diagnóstico destes, realizou-se a construção de curvas ROC individuais, determinando-se assim sua acurácia, através da obtenção de parâmetros como sensibilidade e especificidade. Na **FIGURA 14** são apresentadas as curvas ROC referentes aos dois miRNAs-VE, considerando-se as comparações propostas. Os parâmetros obtidos através das mesmas são apresentados na **TABELA 8**.

De maneira geral, ao acessar a acurácia de um teste diagnóstico (ou biomarcador), diversos parâmetros são avaliados, entre eles a AUC. Os valores de AUC variam entre 0,5 e 1. Valor igual a 1 indica que este pode classificar corretamente todo e qualquer indivíduo no seu respectivo grupo, sendo um “teste/biomarcador perfeito”. Valores próximos a 0,5 refletem a inabilidade deste em fornecer informações para classificação dos indivíduos. Por sua vez, diferentes valores de AUC refletem diferentes graus de acurácia, da seguinte maneira: entre 0,90 e 1,00 (excelente); entre 0,80 e 0,90 (boa); entre 0,70 e 0,80 (razoável); entre 0,60 e 0,70 (ruim); e de 0,50 a 0,60 (insatisfatória) (HAJIAN-TILAKI, 2013; LI; HE, 2018).

FIGURA 14 - POTENCIAL DIAGNÓSTICO DO miR-VE-10b-5p e miR-VE-148a-3p EM DISCRIMINAR DIFERENTES GRUPOS PROPOSTOS



LEGENDAS: Curvas ROC individuais calculadas a partir dos valores de QR obtidos para: o miR-VE-10b-5p, avaliando seu potencial em discriminar amostras SL de amostras com CC (A); o miR-VE-148a-3p, avaliando seu potencial em discriminar amostras SL *versus* amostras com LIEBG (B) e LIEBG *versus* LIEAG+CC (C). AUC = área sob a curva (do inglês, *area under the curve*); CC = câncer cervical; LIEAG = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; QR = quantidade relativa; SL = sem lesão. FONTE: A autora (2022).

TABELA 8 - PARÂMETROS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE CURVAS ROC INDIVIDUAIS

miRNA-VE	Grupos	AUC	p	Cutoff	SENS.	ESP.
miR-VE-10b-5p	SL x CC	0,7188	0,02286	<0,5060	81,25%	72,73%
miR-VE-148a-3p	SL x LIEBG	0,7171	0,02890	>0.8845	75,00%	68,75%
miR-VE-148a-3p	LIEBG x LIEAG+CC	0,6997	0,02265	<1.005	75,00%	73,68%

LEGENDAS: Parâmetros calculados a partir das curvas ROC construídas para os diferentes miRNAs-VE. AUC = área sob a curva (do inglês, *area under the curve*); CC = câncer cervical; ESP. = especificidade; LIEAG = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LIEBG = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; SENS. = sensibilidade; SL = sem lesão. FONTE: A autora (2022).

Adicionalmente, sensibilidade e especificidade também são parâmetros obtidos a partir da análise de curvas ROC. A sensibilidade de determinado teste diagnóstico (ou biomarcador) corresponde à capacidade que este apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes ou com determinada condição clínica. Por sua vez, a especificidade de determinado teste diagnóstico (ou biomarcador) corresponde à capacidade que este apresenta de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos que não apresentam a doença ou a condição clínica investigada (GHAALIQ *et al.*, 2008). Ambos variam de 0 a 1, com 1 indicando que o teste diagnóstico (ou biomarcador) pode classificar corretamente todos os indivíduos com teste positivo como doentes (ou com determinada condição), assim como todos os indivíduos com teste negativo como de fato não doentes (ou sem determinada condição) (GHAALIQ *et al.*, 2008; LI; HE, 2018).

A título de exemplo, tomando como base o observado para o miR-VE-10b-5p, que apresentou AUC de 0,7188, sensibilidade de 81,25% e especificidade de 72,73% em discriminar amostras SL *versus* CC, podemos dizer que: a) baseado nos valores de AUC, este apresenta potencial diagnóstico razoável; b) baseado na sensibilidade de 81,25%, este teste classifica corretamente 81,25% das mulheres com CC, porém classifica incorretamente 18,75% dessas mulheres (como SL, enquanto deveria classificar como com CC); e c) baseado na especificidade de 72,73%, este classifica corretamente 72,73% das mulheres SL, porém classifica incorretamente 27,27% dessas mulheres (como CC, enquanto deveria classificar como SL). Assim, todos esses parâmetros, em conjunto, irão definir a acurácia de determinado teste diagnóstico (ou biomarcador).

Assim, os valores obtidos através das curvas ROC individuais revelaram que o miR-VE-10b-5p tem potencial diagnóstico razoável em discriminar amostras SL de amostras com CC; enquanto o miR-VE-148a-3p apresenta potencial diagnóstico razoável e ruim em discriminar os grupos LIEBG *versus* SL e LIEAG+CC *versus* LIEBG, respectivamente. Em relação aos valores de sensibilidade e especificidade, apesar de alguns autores classificarem determinado teste diagnóstico (ou biomarcador) como tendo “boa”, ou “moderada” ou “baixa” sensibilidade e/ou especificidade, não se encontrou referência que definisse claramente intervalos associados a tais parâmetros. Assim, preferiu-se restringir-se aos valores observados. Ainda, é importante ressaltar que, de acordo com o objetivo a ser atingido com determinado teste diagnóstico (ou biomarcador), pode-se admitir maior sensibilidade e menor especificidade, ou o contrário. Inclusive, destaca-se que o teste ideal, com 100% de sensibilidade e especificidade dificilmente existe na prática, pois a tentativa de melhorar a sensibilidade, em geral, tem o efeito de diminuir a especificidade (GHAALIQ *et al.*, 2008).

Sendo assim, apesar de tais parâmetros não se aproximarem dos parâmetros ideais esperados para um “teste/biomarcador perfeito”, estes não invalidam a avaliação e potencial utilização destes combinados a outros biomarcadores, por exemplo, em painéis diagnósticos. Muitas vezes, diferentes biomarcadores com graus de acurácia diversos podem compor determinado painel diagnóstico com acurácia elevada e satisfatória (SCHÜTTE *et al.*, 2017). Especialmente no caso do miR-VE-10b-5p, se considerarmos sua potencial utilização no rastreamento de CC, parece razoável ou até mesmo satisfatória sua sensibilidade (de 81,25%) em discriminar amostras com CC de amostras SL. Dessa forma, sugere-se que este possa vir a compor futuros painéis diagnósticos para discriminar diferentes estágios de LIE/CC. Seu potencial papel na carcinogênese cervical, seus perfis de quantificação em exossomos e os resultados aqui obtidos corroboram esta possibilidade. Combinado a outros biomarcadores associados a VEs (sejam outros miRNAs ou diferentes moléculas), este pode vir a agregar valor e acurácia a futuros potenciais painéis que discriminem adequadamente os estágios de CC e/ou as lesões precursoras.

Por fim, acrescenta-se ainda outros requisitos importantes a serem considerados quando se avalia o desempenho de um potencial biomarcador, sendo: boa estabilidade e obtenção de maneira relativamente simples e não invasiva. Não surpreendentemente, muitos grupos de pesquisa têm focado em miRNAs

extracelulares (livres ou miRNAs-VE) como potenciais biomarcadores, uma vez que estes são estáveis, podendo ser detectados em diferentes biofluidos (sangue, urina, entre outros) através de ensaios relativamente baratos e de simples realização, apresentando boa sensibilidade (MORI *et al.*, 2019). Assim, apesar de se esperar que um bom biomarcador apresente elevado valor de AUC, alta sensibilidade e alta especificidade, ao final, o potencial diagnóstico de determinado biomarcador acaba sendo determinado através da combinação de parâmetros diversos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as moléculas que ganharam destaque nos últimos anos como potenciais biomarcadores, incluem-se os miRNAs, pequenos ncRNAs com amplo potencial regulatório (GEBERT; MACRAE, 2018), expressos virtualmente por todas as células nucleadas e presentes em diversos compartimentos e fluidos corporais (BARTEL, 2018; LUDWIG *et al.*, 2016). Adicionalmente, aqueles secretados em VEs – os miRNAs-VE – parecem o ser de maneira seletiva (VAN DEN BOORN *et al.*, 2013), tendo papel importante na comunicação intercelular, podendo modular a expressão gênica e diferentes funções de células próximas ou distais. Ainda, podem refletir a condição clínica de determinado indivíduo (MORI *et al.*, 2019). Estas evidências, somadas a boa estabilidade apresentada pelos miRNAs-VE, assim como a possibilidade de fácil obtenção destes a partir de diferentes biofluidos, destacam o potencial uso destas moléculas como biomarcadores em diversas doenças, como no câncer (KAI; DITTMAR; SEN, 2018b; WANG; CHEN; SEN, 2016). No contexto do CC, isso não é diferente (CHEUNG *et al.*, 2012; PARDINI *et al.*, 2018).

Baseando-se em tais evidências, e partindo da necessidade de se identificar e validar novos biomarcadores em biópsia líquida para o diagnóstico do CC, assim como de seus estágios precursores, propôs-se este estudo. Aqui, pretendeu-se avaliar o potencial de miRNAs-VE plasmáticos candidatos como biomarcadores para o diagnóstico de CC e lesões precursoras em amostras de controles e pacientes brasileiras. Para tanto, adotou-se estratégias (análise de bioinformática e a busca na literatura científica) a fim de se identificar miRNAs-VE candidatos para o diagnóstico de CC e de lesões precursoras em biópsia líquida, selecionando-se ao final quatro miRNAs-VE candidatos – miR-10b-5p, miR-148a-3p, miR-181b-5p e miR-155-5p – tendo os três primeiros seus níveis avaliados.

Em conjunto, os resultados obtidos mostraram que, em mulheres brasileiras, o miR-VE-10b-5p tem seus níveis diminuídos em VEs plasmáticas no estágio de CC (em comparação a controles SL), tendo potencial diagnóstico razoável em discriminar tais estágios. Certamente, considerando-se o CC como uma doença com progressão em diferentes etapas, existe uma certa lacuna quando se propõe discriminar controles SL de pacientes CC. Com os resultados obtidos na presente tese, não foi possível definir com clareza em que momento, durante a progressão de um estágio SL para o CC, ocorrem mudanças nos níveis deste miRNA-VE, mesmo que de forma

intermediária. Todavia, analisando-se conjuntamente os dados dos artigos de referência e os dados experimentais aqui apresentados, somado ao papel desse miRNA no CC, hipotetiza-se que este tenha seus níveis diminuídos em estágios mais avançados de lesão (LIEAG para CC). Dessa forma, acredita-se que este apresente potencial para ser inserido em futuros painéis diagnósticos a fim de discriminar diferentes estágios de LIE/CC. Por sua vez, na amostra populacional estudada os perfis de quantificação relativa do miR-VE-181b-5p não variaram significativamente entre os grupos avaliados, enquanto os do miR-VE-148a-3p apresentaram “flutuações” significativas entre SL, LIEBG e LIEAG+CC. Todavia, o potencial diagnóstico deste em discriminar os diferentes estágios avaliados não se mostrou satisfatório, o que não exclui sua avaliação futura de forma combinada (em painéis).

Adicionalmente, ressalta-se que todos os resultados acima apresentados são exploratórios, sendo de extrema importância que novos estudos sejam conduzidos, tanto incluindo participantes brasileiras (inclusive de outros estados brasileiros, uma vez que a população aqui representada não reflete a realidade da população brasileira em sua totalidade), quanto representantes de outras populações. Assim, será possível confirmar ou excluir o potencial destes diferentes miRNAs em identificar diferentes estágios de lesão cervical. Ainda, certamente existe a possibilidade de determinado miRNA-VE ter níveis significativamente variados em diferentes populações avaliadas.

Como limitações do presente estudo, pode-se citar o tamanho amostral, sendo interessante aumentar o número de pacientes com CC, assim como ter um tamanho amostral mais equitativo entre os diferentes grupos amostrais para as diferentes comparações propostas. Outra limitação é a normalização dos dados de quantificação relativa, realizada apenas com o controle exógeno (cel-miR-39). Recomenda-se que seja utilizado também um gene de referência, com detecção estável e quantidade adequada em VEs de plasma.

Como ponto forte do presente estudo, destaca-se o fato deste incluir mulheres brasileiras, podendo vir a ser o primeiro estudo publicado a identificar o perfil de miRNAs-VE em amostras de controles e pacientes brasileiras com LIE/CC. Este fato, inclusive, pode vir a ter relevância “global”, uma vez que, em sua maioria, os estudos investigando miRNAs circulantes (livres ou em VEs) no contexto do CC incluem apenas participantes chinesas ou japonesas. Adicionalmente, o presente conjunto amostral poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, tanto para a confirmação dos dados preliminares aqui obtidos, como para a busca de novos biomarcadores. Apenas

a medida em que novos estudos, bem conduzidos e caracterizados, forem publicados é que padrões contrastantes serão melhor entendidos, e padrões consonantes e válidos, consolidados.

6 CONCLUSÃO

MiRNAs circulantes, em especial miRNAs-VE, apresentam potencial como biomarcadores em biópsia líquida, podendo refletir a condição clínica de determinado indivíduo. Neste estudo, demonstrou-se que, em mulheres brasileiras, o miR-VE-10b-5p tem seus níveis diminuídos em VEs plasmáticas no estágio de CC (em comparação a controles SL), tendo potencial diagnóstico razoável em discriminar tais estágios. Os dados da literatura reportando seu papel no CC, somado aos níveis de expressão em exossomos plasmáticos observados nos estudos de referência aqui analisados, assim como os resultados experimentais obtidos, sugerem que este tenha seus níveis diminuídos em estágios mais avançados (LIEAG e/ou CC). Assim, este apresenta potencial para discriminar diferentes estágios de LIE/CC, podendo vir a compor futuros painéis diagnósticos. Por sua vez, os níveis de miR-VE-181b-5p não variaram significativamente entre os grupos avaliados, enquanto os níveis do miR-VE-148a-3p apresentaram flutuações significativas entre amostras SL, LIEBG e LIEAG+CC, porém apresentando potencial diagnóstico razoável/ruim para discriminar tais grupos. Por fim, ressalta-se a necessidade de validação adicional em grupos amostrais maiores, incluindo diferentes amostras populacionais, a fim de se confirmar a potencial utilização destes biomarcadores para futura aplicação clínica diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; MEHDI, A.; KHAN, F. H.; VERMA, S.; AHMAD, A.; KHATOON, F.; RAZA, S. T.; AFREEN, S.; GLYNN, S. A.; MAHDI, F. Role of miRNAs in cervical cancer: A comprehensive novel approach from pathogenesis to therapy. **Journal Of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 50, n. 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JOGOH.2021.102159>. Acesso em: 21 dez. 2021.
- ACEVEDO-SÁNCHEZ, V.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, R. M.; AGUILAR-RUIZ, S. R.; TORRES-AGUILAR, H.; ROMERO-TLALOLINI, M. de los A. Extracellular Vesicles in Cervical Cancer and HPV Infection. **Membranes**, v. 11, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES11060453>. Acesso em: 22 dez. 2021.
- AFTAB, M.; POOJARY, S. S.; SESHAN, V.; KUMAR, S.; AGARWAL, P.; TANDON, S.; ZUTSHI, V.; DAS, B. C. Urine miRNA signature as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarker in cervical cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10323, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89388-W>. Acesso em: 19 jan. 2022.
- ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 5, p. 479–491, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>. Acesso em: 14 dez. 2021.
- ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. **Cancer Discovery**, v. 11, n. 4, p. 858–873, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>. Acesso em: 21 dez. 2021.
- ALLAN, D.; THOMAS, P.; LIMBRICK, A. R. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. **Biochemical Journal**, v. 188, n. 3, p. 881, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ1880881>. Acesso em: 21 dez. 2021.
- ALLEN, L.; WILLIAMS, J.; TOWNSEND, N.; MIKKELSEN, B.; ROBERTS, N.; FOSTER, C.; WICKRAMASINGHE, K. Socioeconomic status and non-communicable disease behavioural riskfactors in low-income and lower-middle-income countries: a systematic review. **The Lancet**, v. 5, n. 3, p. e277, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30058-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30058-X). Acesso em: 16 jan. 2022.
- AMELIO, I. *et al.* Liquid biopsies and cancer omics. **Cell Death Discovery**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00373-0>. Acesso em: 14 dez. 2021.
- APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT, T. C. The 2001 Bethesda System terminology. **American Family Physician**, v. 68, n. 10, p. 1992–8, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14655809>. Acesso em: 27 set. 2018.
- APPLEBY, P.; BERAL, B.; BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A.; COLIN, D.; FRANCESCHI, S.; GOODHILL, A.; GREEN, J.; PETO, J.; PLUMMER, M.; SWEETLAND, S. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative

reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61684-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61684-5). Acesso em: 1 fev. 2022.

ARACELI OYERVIDES-MUÑOZ, M.; ALÍ PÉREZ-MAYA, A.; FRECIA RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, H.; SOFÍA GÓMEZ-MACIAS, G.; RAÚL FAJARDO-RAMÍREZ, O.; TREVIÑO, V.; ALBERTO BARRERA-SALDAÑA, H.; LOURDES GARZA-RODRÍGUEZ, M.; PEQUEÑO, A. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 134–144, 2017.. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.003>. Acesso em: 19 dez. 2021.

ARDEKANI, A. M.; NAEINI, M. M. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 161, 2010. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3558168/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3558168/). Acesso em: 20 dez. 2021.

ARMAND-LABIT, V.; PRADINES, A. Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. **Biomolecular Concepts**, v. 8, n. 2, p. 61–81, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/BMC-2017-0002>. Acesso em: 14 dez. 2021.

ARROYO, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 5003–5008, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1019055108>. Acesso em: 14 dez. 2021.

AZIMI, T.; PARYAN, M.; MONDANIZADEH, M.; SARMADIAN, H.; ZAMANI, A. Pap Smear miR-92a-5p and miR-155-5p as Potential Diagnostic Biomarkers of Squamous Intraepithelial Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 4, p. 1271, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.4.1271>. Acesso em: 19 jan. 2022.

BALASUBRAMANIAM, S. D.; BALAKRISHNAN, V.; OON, C. E.; KAUR, G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. **Medicina**, v. 55, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MEDICINA55070384>. Acesso em: 19 dez. 2021.

BANDOLIN, L.; BORSETTO, D.; FUSSEY, J.; DA MOSTO, M. C.; NICOLAI, P.; MENEGALDO, A.; CALABRESE, L.; TOMMASINO, M.; BOSCOLO-RIZZO, P. Beta human papillomaviruses infection and skin carcinogenesis. **Reviews in Medical Virology**, v. 30, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/RMV.2104>. Acesso em: 18 dez. 2021.

BANZET, S.; CHENNAOUI, M.; GIRARD, O.; RACINAIS, S.; DROGOU, C.; CHALABI, H.; KOULMANN, N. Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 9, p. 1237–1244, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00075.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0211308110007.JPEG>. Acesso em: 22 jan. 2022.

BAO, C.; GUO, L. MicroRNA- 148a- 3p inhibits cancer progression and is a novel

screening biomarker for gastric cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JCLA.23454>. Acesso em: 19 jan. 2022.

BARDELLI, A.; PANTEL, K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). **Cancer Cell**, v. 31, n. 2, p. 172–179, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2017.01.002>. Acesso em: 17 dez. 2021.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–97, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>. Acesso em: 15 out. 2018.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–33, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>. Acesso em: 27 set. 2018.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20–51, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>. Acesso em: 15 out. 2018.

BEDELL, S. L.; GOLDSTEIN, L. S.; GOLDSTEIN, A. R.; GOLDSTEIN, A. T. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. **Sexual Medicine Reviews**, v. 8, n. 1, p. 28–37, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SXMR.2019.09.005>. Acesso em: 18 dez. 2021.

BERTI, F. C. B.; SALVIANO-SILVA, A.; BECKERT, H. C.; DE OLIVEIRA, K. B.; CIPOLLA, G. A.; MALHEIROS, D. From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1872, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.08.001>

BIANKIN, A. V.; PIANTADOSI, S.; HOLLINGSWORTH, S. J. Patient-centric trials for therapeutic development in precision oncology. **Nature**, v. 526, n. 7573, p. 361–370, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NATURE15819>. Acesso em: 14 dez. 2021.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **BMJ**, v. 55, n. 4, p. 244–265, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>

BRAATEN, K. P.; LAUFER, M. R. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, v. 1, n. 1, p. 2–10, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701931>. Acesso em: 27 set. 2018.

BRAICU, C.; GULEI, D.; COJOCNEANU, R.; RADULY, L.; JURJ, A.; KNUTSEN, E.; CALIN, G. A.; BERINDAN-NEAGOE, I. miR-181a/b therapy in lung cancer: reality or myth? **Molecular Oncology**, v. 13, n. 1, p. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12420>. Acesso em: 18 jan. 2022.

BRAVO, I. G.; FELEZ-SANCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOV003>. Acesso em: 18 dez.

2021.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; 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**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BURK, R. D. *et al.* Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature21386>. Acesso em: 3 jul. 2020.

CABEL, L. *et al.* HPV ctDNA detection of high-risk HPV types during chemoradiotherapy for locally advanced cervical cancer. **ESMO Open**, v. 6, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2021.100154>. Acesso em: 22 dez. 2021.

CAFFORIO, P.; PALMIROTTA, R.; LOVERO, D.; CICINELLI, E.; CORMIO, G.; SILVESTRIS, E.; PORTA, C.; D'ORONZO, S. Liquid Biopsy in Cervical Cancer: Hopes and Pitfalls. **Cancers**, v. 13, n. 16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS13163968>. Acesso em: 14 dez. 2021.

CASTLE, P. E.; SCHIFFMAN, M.; WHEELER, C. M.; SOLOMON, D. Evidence for Frequent Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia-Grade 2. **Obstetrics and Gynecology**, v. 113, n. 1, p. 18, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/AOG.0B013E31818F5008>. Acesso em: 19 dez. 2021.

CASTLE, P. E.; STOLER, M. H.; SOLOMON, D.; SCHIFFMAN, M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 127, n. 5, p. 805–815, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1309/PT3PNC1QL2F4D2VL>. Acesso em: 19 dez. 2021.

CHARGARI, C. *et al.* Increasing global accessibility to high-level treatments for cervical cancers. **Gynecologic Oncology**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2021.10.073>. Acesso em: 18 dez. 2021.

CHEN, C. M.; CHU, T. H.; CHOU, C. C.; CHIEN, C. Y.; WANG, J. S.; HUANG, C. C. Exosome-derived microRNAs in oral squamous cell carcinomas impact disease prognosis. **Oral Oncology**, v. 120, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ORALONCOLOGY.2021.105402>. Acesso em: 19 jan. 2022.

CHEN, Q.; WANG, Y.; DANG, H.; WU, X. MicroRNA-148a-3p inhibits the proliferation of cervical cancer cells by regulating the expression levels of DNMT1 and UTF1. **Oncology Letters**, v. 22, n. 2, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/OL.2021.12878>. Acesso em: 6 dez. 2021.

CHEN, Y.; LI, G.; LIU, M. L. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 50–62, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2017.03.006>

CHEN, Z.; TERAU, M.; FU, L.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome

analyses. **Journal of Virology**, v. 79, n. 11, p. 7014–7023, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7014-7023.2005>. Acesso em: 18 dez. 2021.

CHEN. Q.; WANG, Y.; DANG, H.; WUNG, X. MicroRNA-148a-3p inhibits the proliferation of cervical cancer cells by regulating the expression levels of DNMT1 and UTF1. **Oncology Letters**, v. 22, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/OL.2021.12878>. Acesso em: 1 set. 2021.

CHESSON, H. W.; DUNNE, E. F.; HARIRI, S.; MARKOWITZ, L. E. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 41, n. 11, p. 660–664, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000193>. Acesso em: 18 dez. 2021.

CHEUNG, T. *et al.* Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. **Cell Cycle**, v. 11, n. 15, p. 2876–2884, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.21278>. Acesso em: 23 jul. 2018.

CHEUNG, T. H. *et al.* Liquid biopsy of HPV DNA in cervical cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 114, p. 32–36, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2019.03.005>. Acesso em: 22 dez. 2021.

CHIANTORE, M. V.; MANGINO, G.; IULIANO, M.; CAPRIOTTI, L.; DI BONITO, P.; FIORUCCI, G.; ROMEO, G. Human Papillomavirus and carcinogenesis: Novel mechanisms of cell communication involving extracellular vesicles. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 51, p. 92–98, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.12.009>. Acesso em: 21 jan. 2021.

CHIESA, I. J.; PEREZ, M. S.; NUÑEZ, G. G.; PIROLA, D. A. Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina. **Virus Disease**, v. 27, n. 1, p. 41–47, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S13337-015-0295-3>. Acesso em: 18 dez. 2021.

CHO, H. J.; EUN, J. W.; BAEK, G. O.; SEO, C. W.; AHN, H. R.; KIM, S. S.; CHO, S. W.; CHEONG, J. Y. Serum Exosomal MicroRNA, miR-10b-5p, as a Potential Diagnostic Biomarker for Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JCM9010281>. Acesso em: 19 jan. 2022.

CHO, O.; KIM, D. W.; CHEONG, J. Y. Plasma exosomal mirna levels after radiotherapy are associated with early progression and metastasis of cervical cancer: A pilot study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 10, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JCM10102110/S1>. Acesso em: 7 jan. 2022.

CHO, O.; KIM, D. W.; CHEONG, J. Y. Screening plasma exosomal RNAs as diagnostic markers for cervical cancer: An analysis of patients who underwent primary chemoradiotherapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/BIOM11111691/S1>. Acesso em: 7 jan. 2022.

CHUNG, T. K. H. *et al.* Liquid biopsy of PIK3CA mutations in cervical cancer in Hong Kong Chinese women. **Gynecologic Oncology**, v. 146, n. 2, p. 334–339, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2017.05.038>. Acesso em: 22 dez. 2021.

COHEN, P. A.; JHINGRAN, A.; OAKNIN, A.; DENNY, L. Cervical cancer. **Lancet**, v. 393, p. 169–162, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)

CONDRAT, C. E.; THOMPSON, D. C.; BARBU, M. G.; BUGNAR, O. L.; BOBOC, A.; CRETOIU, D.; SUCIU, N.; CRETOIU, S. M.; VOINEA, S. C. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. **Cells**, v. 9, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CELLS9020276>. Acesso em: 14 dez. 2021.

CORTEZ, M. A.; BUESO-RAMOS, C.; FERDIN, J.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K.; CALIN, G. A. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. **Nature Reviews - Clinical Oncology**, v. 8, n. 8, p. 467–477, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2011.76>. Acesso em: 21 dez. 2021.

DAI, J.; SU, Y.; ZHONG, S.; CONG, L.; LIU, B.; YANG, J.; TAO, Y.; HE, Z.; CHEN, C.; JIANG, Y. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>. Acesso em: 21 dez. 2021.

DARRAGH, T. M. *et al.* The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 16, n. 3, p. 205–242, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/LGT.0B013E31825C31DD>. Acesso em: 18 dez. 2021.

DARRAGH, T. M. The LAST Project and the diagnostic bottom line. **Cytopathology**, v. 26, n. 6, p. 343–345, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/CYT.12299>. Acesso em: 19 dez. 2021.

DAVEY, D. D.; NEAL, M. H.; WILBUR, D. C.; COLGAN, T. J.; STYER, P. E.; MODY, D. R. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 128, n. 11, p. 1224–9, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2004\)128<1224:BIARRP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2004)128<1224:BIARRP>2.0.CO;2). Acesso em: 27 set. 2018.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.03.033>. Acesso em: 18 dez. 2021.

DEATHERAGEA, B. L.; COOKSONA, B. T. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 1948, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>. Acesso em: 22 dez. 2021.

DENNY, L. Cervical cancer: prevention and treatment. **Discovery medicine**, v. 14, n. 75, p. 125–31, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935209>. Acesso em: 14 jan. 2019.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 Proteins. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 99, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.05.006>. Acesso em: 19 dez. 2021.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25 Suppl 1, n. Suppl Suppl 1, p. 2–23, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>. Acesso em: 27 set. 2018.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, n. SUPPL.5, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.06.083>. Acesso em: 18 dez. 2021.

DOYLE, L. M.; WANG, M. Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CELLS8070727>. Acesso em: 21 dez. 2021.

DU, K.; HUANG, Q.; BU, J.; ZHOU, J.; HUANG, Z.; LI, J. Circulating Tumor Cells Counting Act as a Potential Prognostic Factor in Cervical Cancer. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1533033820957005>. Acesso em: 22 dez. 2021.

DUNANT, Y. Hormones and neurotransmitters release: four mechanisms of secretion. **Cell Biology International**, v. 18, n. 5, p. 327–336, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/CBIR.1994.1082>. Acesso em: 22 dez. 2021.

DWIVEDI, S. K. D.; RAO, G.; DEY, A.; MUKHERJEE, P.; WREN, J. D.; BHATTACHARYA, R. Small Non-Coding-RNA in Gynecological Malignancies. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 1–52, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS13051085>. Acesso em: 20 dez. 2021.

ELEWAILY, M. I.; ELSERGANY, A. R. Emerging role of exosomes and exosomal microRNA in cancer: pathophysiology and clinical potential. **Journal of Cancer Research And Clinical Oncology**, v. 147, n. 3, p. 637–648, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00432-021-03534-5>. Acesso em: 22 dez. 2021.

ELLWANGER, J. H.; VEIT, T. D.; CHIES, J. A. B. Exosomes in HIV infection: A review and critical look. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 146–154, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.05.021>. Acesso em: 22 dez. 2021.

ESTÊVÃO, D.; COSTA, N. R.; GIL DA COSTA, R. M.; MEDEIROS, R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1862, n. 2, p. 153–162, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2019.01.001>. Acesso em: 19 dez. 2021.

FANG, H.; SHUANG, D.; YI, Z.; SHENG, H.; LIU, Y. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy - Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 83, p. 64–69, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.06.006>. Acesso em: 19 jan. 2022.

FANG, Z.; WANG, X.; WU, J.; XIAO, R.; LIU, J. High serum extracellular vesicle miR-10b expression predicts poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. **Disease Markers**, v. 27, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/CBM-190211>. Acesso em: 19 jan. 2022.

FERNÁNDEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, J. L. G.; GARCÍA, A. C.; MARTÍNEZ, A. C.; MIELGO-AYUSO, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, J. J. Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers. **Diagnostics**, v. 10, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS10040215>. Acesso em: 21 dez. 2021.

FESTIN, M. P. R. Overview of modern contraception. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 66, p. 4–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2020.03.004>. Acesso em: 16 jan. 2022.

FLOWERS, E.; WON, G. Y.; FUKUOKA, Y. MicroRNAs associated with exercise and diet: a systematic review. **Physiological Genomics**, v. 47, n. 1, p. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00095.2014>. Acesso em: 17 jan. 2022.

FORMAN, D.; DE MARTEL, C.; LACEY, C. J.; SOERJOMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; BRUNI, L.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. **Vaccine**, v. 30, p. F12–F23, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.055>. Acesso em: 27 set. 2018.

FU, X.; HONG, L.; YANG, Z.; TU, Y.; XIN, W.; ZHA, M.; TU, S.; SUN, G.; LI, Y.; XIAO, W. MicroRNA-148a-3p suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stemness properties via Wnt1-mediated Wnt/ β -catenin pathway in pancreatic cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 22, p. 13020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/JCMM.15900>. Acesso em: 19 jan. 2022.

GALLOWAY, D. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. **Current Opinion in Virology**, v. 14, p. 87–92, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.001>. Acesso em: 27 set. 2018.

GARBUGLIA, A. R. Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 1705–1726, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers6031705>. Acesso em: 07 mar. 2022.

GARCÍA-VALLVÉ, S.; ALONSO, Á.; BRAVO, I. G. Papillomaviruses: different genes have different histories. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 514–521, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2005.09.003>. Acesso em: 18 dez. 2021.

GARDINER, C.; FERREIRA, Y. J.; DRAGOVIC, R. A.; REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3402/JEV.V2I0.19671>. Acesso em: 7 dez. 2021.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>. Acesso em: 15 out. 2018.

GHAALIQ, A.; MB, L.; FRCA, C.; MCCLUSKEY, A.; MB, B. Clinical tests: sensitivity and specificity. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 8, n. 6, p. 221–223, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BJACEACCP/MKN041>. Acesso em: 21 jan. 2022.

GOCZE, K.; GOMBOS, K.; JUHASZ, K.; KOVACS, K.; KAJTAR, B.; BENCZIK, M.; GOCZE, P.; PATCZAI, B.; ARANY, I.; EMBER, I. Unique MicroRNA Expression Profiles in Cervical Cancer. **Anticancer Research**, v. 33, n. 6, 2013.

GOLDIE, S. J.; GRIMA, D.; KOHLI, M.; WRIGHT, T. C.; WEINSTEIN, M.; FRANCO, E. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV-16/18 vaccine. **International Journal of Cancer**, v. 106, n. 6, p. 896–904, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.11334>. Acesso em: 27 set. 2018.

GÓMEZ-GÓMEZ, Y.; ORGANISTA-NAVA, J.; GARIGLIO, P. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/407052>. Acesso em: 13 dez. 2021.

GONZAGA ALVES, M. T.; SOARES, J. F. Medidas de nível socioeconômico em pesquisas sociais: uma aplicação aos dados de uma pesquisa educacional. **Opinião Pública**, v. 15, n. 1, p. 1–30, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-62762009000100001>. Acesso em: 16 jan. 2022.

GONZÁLEZ-GROSS, M.; MELÉNDEZ, A. Sedentarism, active lifestyle and sport: impact on health and obesity prevention. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, p. 89–98, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.sup5.6923>. Acesso em: 16 jan. 2022.

GONZALEZ-VILLASANA, V.; RASHED, M. H.; GONZALEZ-CANTÚ, Y.; BAYRAKTAR, R.; MENCHACA-ARREDONDO, J. L.; VAZQUEZ-GUILLEN, J. M.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; RESENDEZ-PEREZ, D. Presence of Circulating miR-145, miR-155, and miR-382 in Exosomes Isolated from Serum of Breast Cancer Patients and Healthy Donors. **Disease Markers**, v. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/6852917>. Acesso em: 19 jan. 2022.

GROSS, G. Genitoanal human papillomavirus infection and associated neoplasias. **Current Problems in Dermatology**, v. 45, p. 98–122, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000358423>. Acesso em: 18 dez. 2021.

GU, X.; JIN, R.; MAO, X.; WANG, J.; YUAN, J.; ZHAO, G. Prognostic value of miRNA-181a/b in colorectal cancer: a meta-analysis. **Biomarkers in Medicine**, v. 12, n. 3, p. 299–308, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/BMM-2016-0222>. Acesso em: 18 jan. 2022.

GU, Y.; WAN, C.; QIU, J.; CUI, Y.; JIANG, T.; ZHUANG, Z. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v.

15, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0224001>. Acesso em: 22 dez. 2021.

GULEI, D.; RADULY, L.; BROSEGHINI, E.; FERRACIN, M.; BERINDAN-NEAGOE, I. The extensive role of miR-155 in malignant and non-malignant diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 70, p. 33–56, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2019.09.004>. Acesso em: 19 jan. 2022.

GULYAEVA, L. F.; KUSHLINSKIY, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 143, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>. Acesso em: 15 out. 2018.

GUO, L.; HUA, K. Cervical Cancer: Emerging Immune Landscape and Treatment. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 8037, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S264312>. Acesso em: 20 dez. 2021.

GUO, Z.; MAKI, M.; DING, R.; YANG, Y.; ZHANG, B.; XIONG, L. Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep05150>. Acesso em: 20 dez. 2021.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 627, 2013. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC3755824/>. Acesso em: 21 jan. 2022.

HAN, M.; LEE, J.; KIM, S.; KIM, J.; KIM, H. Human Papillomavirus 16 Oncoproteins Downregulate the Expression of miR-148a-3p, miR-190a-5p, and miR-199b-5p in Cervical Cancer. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1942867>. Acesso em: 1 set. 2021.

HATA, A.; KASHIMA, R. Dysregulation of MicroRNA Biogenesis Machinery in Cancer. **Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, n. 3, p. 121, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1117054>. Acesso em: 21 dez. 2021.

HE, J. *et al.* miRNA-Mediated Functional Changes through Co-Regulating Function Related Genes. **PLOS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13558, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0013558>. Acesso em: 18 jan. 2022.

HE, Y. *et al.* A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 6, p. 1312–1327, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.29618>. Acesso em: 23 jul. 2018.

HOU, R.; WANG, D.; LU, J. MicroRNA-10b inhibits proliferation, migration and invasion in cervical cancer cells via direct targeting of insulin-like growth factor-1 receptor. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 5009, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6033>. Acesso em: 19 jan. 2022.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324–334, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2008.11.017>. Acesso em: 19 dez. 2021.

HU, Z. *et al.* Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. **Nature Genetics**, v. 47, n. 2, p. 158–163, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NG.3178>. Acesso em: 19 dez. 2021.

HUANG, L.; LIN, J. X.; YU, Y. H.; ZHANG, M. Y.; WANG, H. Y.; ZHENG, M. Downregulation of Six MicroRNAs Is Associated with Advanced Stage, Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis in Small Cell Carcinoma of the Cervix. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033762>. Acesso em: 19 jan. 2022.

HUDELIST, G.; MANAVI, M.; PISCHINGER, K. I. D.; WATKINS-RIEDEL, T.; SINGER, C. F.; KUBISTA, E.; CZERWENKA, K. F. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecologic Oncology**, v. 92, n. 3, p. 873–880, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2003.11.035>. Acesso em: 19 dez. 2021.

HUTTNER, W. B. *et al.* Biogenesis of neurosecretory vesicles. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 60, p. 315–327, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/SQB.1995.060.01.036>. Acesso em: 22 dez. 2021.

IBGE. **Censo Demográfico 2010: Características gerais da população religião e pessoas com deficiência**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2012.

IBGE. **Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2020.

IGNATIADIS, M.; SLEDGE, G. W.; JEFFREY, S. S. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. **Nature reviews - Clinical Oncology**, v. 18, n. 5, p. 297–312, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41571-020-00457-X>. Acesso em: 14 dez. 2021.

ILIÉ, M.; HOFMAN, P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n. 4, p. 420–423, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/TLCR.2016.08.06>. Acesso em: 17 dez. 2021.

INCA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizes-para-rastreamento_cancer_colo_uterio-2011.pdf. Acesso em: 1 fev. 2022.

INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2022.

KAI, K.; DITTMAR, R. L.; SEN, S. Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 78, p. 22–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.12.011>. Acesso em: 21 dez. 2021.

KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. The biology, function, and biomedical applications of

exosomes. **Science**, v. 367, n. 6478, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU6977/ASSET/0D942D3E-7BB0-410E-B762-FEC151E57E74/ASSETS/GRAPHIC/367_AAU6977_FA.JPEG. Acesso em: 21 dez. 2021.

KANG, Z.; STEVANOVIC, S.; HINRICHS, C. S.; CAO, L. Circulating Cell-free DNA for Metastatic Cervical Cancer Detection, Genotyping, and Monitoring. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 22, p. 6856, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1553>. Acesso em: 22 dez. 2021.

KARTHA, R. V.; SUBRAMANIAN, S. Competing endogenous RNAs (ceRNAs): New entrants to the intricacies of gene regulation. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. JAN, p. 8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FGENE.2014.00008/BIBTEX>

KAWAI, S.; FUJII, T.; KUKIMOTO, I.; YAMADA, H.; YAMAMOTO, N.; KURODA, M.; OTANI, S.; ICHIKAWA, R.; NISHIO, E.; TORII, Y.; IWATA, A. Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7070, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25310-1>. Acesso em: 10 ago. 2018.

KELLEY, S. O.; PANTEL, K. A New Era in Liquid Biopsy: From Genotype to Phenotype. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 89–96, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2019.303339>. Acesso em: 17 dez. 2021.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853–858, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1064921>. Acesso em: 20 dez. 2021.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; YALCIN, A.; MEYER, J.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. **Current Biology**, v. 12, n. 9, p. 735–739, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00809-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00809-6)

LAI, X.; WANG, M.; MCELYEA, S. D.; SHERMAN, S.; HOUSE, M.; KORC, M. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. **Cancer Letters**, v. 393, p. 86, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.02.019>. Acesso em: 19 jan. 2022.

LAI, Y.; DONG, L.; JIN, H.; LI, H.; SUN, M.; LI, J. Exosome long non-coding RNA SOX2-OT contributes to ovarian cancer malignant progression by miR-181b-5p/SCD1 signaling. **Aging**, v. 13, n. 20, p. 23726–23738, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/AGING.203645>. Acesso em: 18 jan. 2022.

LAO, G.; LIU, P.; WU, Q.; ZHANG, W.; LIU, Y.; YANG, L.; MA, C. Mir-155 promotes cervical cancer cell proliferation through suppression of its target gene LKB1. **Tumor Biology**, v. 35, n. 12, p. 11933–11938, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S13277-014-2479-7>. Acesso em: 19 jan. 2022.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y). Acesso

em: 20 dez. 2021.

LI, D.; WANG, J.; MA, L. J.; YANG, H. B.; JING, J. F.; JIA, M. M.; ZHANG, X. J.; GUO, F.; GAO, J. N. Identification of serum exosomal miR-148a as a novel prognostic biomarker for breast cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 13, p. 7303–7309, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.26355/EURREV_202007_21889. Acesso em: 19 jan. 2022.

LI, F.; HE, H. Assessing the Accuracy of Diagnostic Tests. **Shanghai Archives of Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 207, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11919/J.ISSN.1002-0829.218052>. Acesso em: 21 jan. 2022.

LI, N.; CUI, T.; GUO, W.; WANG, D.; MAO, L. MiR-155-5p accelerates the metastasis of cervical cancer cell via targeting TP53INP1. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 3181, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S193097>. Acesso em: 21 dez. 2021.

LI, H.; CHI, X.; LI, R.; OUYANG, J.; CHEN, Y. HIV-1-infected cell-derived exosomes promote the growth and progression of cervical cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 11, p. 2438–2447, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/IJBS.38146>. Acesso em: 6 dez. 2021.

LI, H.; HONG, J.; WIJAYAKULATHILAKA, W. S. M. A. Long non-coding RNA SNHG4 promotes cervical cancer progression through regulating c-Met via targeting miR-148a-3p. **Cell Cycle**, v. 18, n. 23, p. 3313–3324, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1674071>. Acesso em: 9 nov. 2020.

LI, S.; ZHANG, S.; YANG, W.; LI, F.; LONG, H. Diagnostic Value of Exosomal miR-148a-3p in the Serum of Patients with Differentiated Thyroid Cancer. **Clinical Laboratory**, v. 67, n. 2, p. 290–297, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2020.200519>. Acesso em: 19 jan. 2022.

LI, W. *et al.* Characteristic of HPV Integration in the Genome and Transcriptome of Cervical Cancer Tissues. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/6242173>

LI, W.; TIAN, S.; WANG, P.; ZANG, Y.; CHEN, X.; YAO, Y.; LI, W. The characteristics of HPV integration in cervical intraepithelial cells. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 12, p. 2783, 2019 d. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/JCA.31450>. Acesso em: 19 dez. 2021.

LI, W.; WANG, W.; SI, M.; HAN, L.; GAO, Q.; LUO, A.; LI, Y.; LU, Y.; WANG, S.; MA, D. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 12, p. 1355–1361, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00432-008-0413-3>. Acesso em: 19 dez. 2021.

LI, X.; ZOU, W.; WANG, Y.; LIAO, Z.; LI, L.; ZHAI, Y.; ZHANG, L.; GU, S.; ZHAO, X. Plasma-based microRNA signatures in early diagnosis of breast cancer. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 8, n. 5, p. 1092, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MGG3.1092>. Acesso em: 19 jan. 2022.

LI, Y.; DENG, X.; ZENG, X.; PENG, X. The Role of Mir-148a in Cancer. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1233, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/JCA.14616>. Acesso em: 19 jan. 2022.

LIANG, L. A. *et al.* Cervical Cancer Screening: Comparison of Conventional Pap Smear Test, Liquid-Based Cytology, and Human Papillomavirus Testing as Stand-alone or Cotesting Strategies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 30, n. 3, p. 474–484, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-1003>. Acesso em: 22 dez. 2021.

LINARES, R.; TAN, S.; GOUNOU, C.; ARRAUD, N.; BRISSON, A. R. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3402/JEV.V4.29509>. Acesso em: 20 jan. 2022.

LIU, H.; LEI, C.; HE, Q.; PAN, Z.; XIAO, D.; TAO, Y. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0765-5>. Acesso em: 20 dez. 2021.

LIU, J.; SUN, H.; WANG, X.; YU, Q.; LI, S.; YU, X.; GONG, W. Increased Exosomal MicroRNA-21 and MicroRNA-146a Levels in the Cervicovaginal Lavage Specimens of Patients with Cervical Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 758–773, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms15010758>. Acesso em: 22 ago. 2018.

LIU, K.; TONG, H.; LI, T.; CHEN, Y.; MAO, X. Potential value of circulating tumor DNA in gynecological tumors. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 7, p. 3225, 2020. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC7407692/>. Acesso em: 17 dez. 2021.

LIU, Q.; YU, Z.; YUAN, S.; XIE, W.; LI, C.; HU, Z.; XIANG, Y.; WU, N.; WU, L.; BAI, L.; LI, Y. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 13048, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14369>. Acesso em: 19 jan. 2022.

LIU, Y.; PAN, Y.; GAO, W.; KE, Y.; LU, Z. Whole-genome analysis of human papillomavirus types 16, 18, and 58 isolated from cervical precancer and cancer samples in Chinese women. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00364-9>. Acesso em: 15 jul. 2020.

LO CICERO, A.; STAHL, P. D.; RAPOSO, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 35, p. 69–77, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2015.04.013>. Acesso em: 22 dez. 2021.

LOOPIK, D. L.; INTHOUT, J.; MELCHERS, W. J. G.; MASSUGER, L. F. A. G.; BEKKERS, R. L. M.; SIEBERS, A. G. Oral contraceptive and intrauterine device use and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade III or worse: a population-based study. **European Journal of Cancer**, v. 124, p. 102–109, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2019.10.009>. Acesso em: 12 dez. 2021.

LU, C.; JIANG, W.; HUI, B.; RONG, D.; FU, K.; DONG, C.; TANG, W.; CAO, H. The

circ_0021977/miR-10b-5p/P21 and P53 regulatory axis suppresses proliferation, migration, and invasion in colorectal cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 3, p. 2273-2285, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.29135>. Acesso em: 17 mar. 2021.

LUDWIG, N.; LEIDINGER, P.; BECKER, K.; BACKES, C.; FEHLMANN, T.; PALLASCH, C.; RHEINHEIMER, S.; MEDER, B.; STÄHLER, C.; MEESE, E.; KELLER, A. Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 8, p. 3865–3877, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW116>. Acesso em: 12 dez. 2021.

LV, A.; TU, Z.; HUANG, Y.; LU, W.; XIE, B. Circulating exosomal miR-125a-5p as a novel biomarker for cervical cancer. **Oncology Letters**, v. 21, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12316>. Acesso em: 21 jan. 2021.

MA, L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 210, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/BCR2720>. Acesso em: 19 jan. 2022.

MADER, S.; PANTEL, K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. **Oncology Research and Treatment**, v. 40, n. 7–8, p. 404–408, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000478018>. Acesso em: 14 dez. 2021.

MAHESH, G.; BISWAS, R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 6, p. 321, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/JIR.2018.0155>. Acesso em: 19 jan. 2022.

MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006211>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 195–208, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2009.06.008>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MEHTA, A. M.; MOOIJ, M.; BRANKOVIĆ, I.; OUBURG, S.; MORRÉ, S. A.; JORDANOVA, E. S. Cervical Carcinogenesis and Immune Response Gene Polymorphisms: A Review. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/8913860>. Acesso em: 20 dez. 2021.

MIAO, J.; REGENSTEIN, J. M.; XU, D.; ZHOU, D.; LI, H.; ZHANG, H.; LI, C.; QIU, J.; CHEN, X. The roles of microRNA in human cervical cancer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 690, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2020.108480>. Acesso em: 20 dez. 2021.

MILLER, D. M.; THOMAS, S. D.; ISLAM, A.; MUENCH, D.; SEDORIS, K. c-Myc and Cancer Metabolism. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 20, p. 5546, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MINCIACCHI, V. R.; FREEMAN, M. R.; DI VIZIO, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, p. 41–51, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.010>. Acesso em: 15 nov. 2018.

MO, M. H.; CHEN, L.; FU, Y.; WANG, W.; FU, S. W. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. **Journal of Cancer**, v. 3, n. 1, p. 432, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/JCA.4919>. Acesso em: 21 dez. 2021.

MONTANI, F.; BIANCHI, F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. **EBioMedicine**, v. 5, p. 4–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2016.02.038>. Acesso em: 14 dez. 2021.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews - Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2886>. Acesso em: 26 set. 2018.

MORI, M. A.; LUDWIG, R. G.; GARCIA-MARTIN, R.; BRANDÃO, B. B.; KAHN, C. R. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. **Cell metabolism**, v. 30, n. 4, p. 656–673, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2019.07.011>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MOSCICKI, A. B.; SCHIFFMAN, M.; BURCHELL, A.; ALBERO, G.; GIULIANO, A. R.; GOODMAN, M. T.; KJAER, S. K.; PALEFSKY, J. Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. **Vaccine**, v. 30, n. 0 5, p. F24, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.05.089>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MOURA, L. de L.; CODEÇO, C. T.; LUZ, P. M. Human papillomavirus (HPV) vaccination coverage in Brazil: spatial and age cohort heterogeneity. **Brazilian Journal of Epidemiology**, v. 24, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-549720210001>. Acesso em: 18 dez. 2021.

MUNGER, K.; GWIN, T. K.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. p16 in HPV-associated cancers. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 1864, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.1523>. Acesso em: 19 dez. 2021.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMOA021641>. Acesso em: 19 dez. 2021.

NAHAND, J. S.; VANDCHALI, N. R.; DARABI, H.; DOROUDIAN, M.; BANAFSHE, H. R.; MOGHOOFEI, M.; BABAEI, F.; SALMANINEJAD, A.; MIRZAEI, H. Exosomal microRNAs: Novel players in cervical cancer. **Epigenomics**, v. 22, n. 18, p. 1651–1660, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0026>. Acesso em: 21 jan. 2021.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Pap test and Bethesda 2014. **Cancer Cytopathology**, v. 123, n. 5, p. 271–281, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/CNCY.21521>. Acesso em: 17 dez. 2021.

NERSISYAN, S.; GALATENKO, A.; CHEKOVA, M.; TONEVITSKY, A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer.

Frontiers in Genetics, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.662468/FULL>. Acesso em: 19 jan. 2022.

NEUMANN, M. H. D.; BENDER, S.; KRAHN, T.; SCHLANGE, T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 190, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2018.05.002>. Acesso em: 22 dez. 2021.

NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L. The biology of human papillomaviruses. **Current problems in dermatology**, v. 45, p. 19–32, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000355959>. Acesso em: 18 dez. 2021.

NIU, L.-J.; ZHANG, Y.-M.; HUANG, T.; SUN, X.-F.; LUO, S.-X. Exosomal microRNA-155 as a biomarker for hepatic fibrosis diagnosis and progression. **Annals of Translational Medicine**, v. 9, n. 2, p. 137–137, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/ATM-20-7787>. Acesso em: 19 jan. 2022.

NUNOBIKI, O.; Ueda, M.; Toji, E.; Yamamoto, M.; Akashi, K.; Sato, N.; Izuma, S; Torii, K.; Tanaka, I.; Okamoto, Y.; Noda, S. Genetic Polymorphism of Cancer Susceptibility Genes and HPV Infection in Cervical Carcinogenesis. **Pathology Research International**, v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2011/364069>. Acesso em: 20 dez. 2021.

MARYAM, M.; NAEMI, M.; HASANI, S. A comprehensive review on oncogenic miRNAs in breast cancer. **Journal of Genetics**, p. 100–115, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12041-021-01265-7>. Acesso em: 18 jan. 2022.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, p. 402, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00402/BIBTEX>

OKOYE, J. O.; NGOKERE, A. A.; ONYENEKWE, C. C.; ERINLE, C. A. Comparable expression of miR-let-7b, miR-21, miR-182, miR-145, and p53 in serum and cervical cells: Diagnostic implications for early detection of cervical lesions. **International Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, p. 29, 2019. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6619463/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36619463/). Acesso em: 19 jan. 2022.

PACZKOWSKA, J.; JANISZEWSKA, J.; BEIN, J.; SCHNEIDER, M.; BEDNAREK, K.; USTASZEWSKI, A.; HARTMANN, S.; HANSMANN, M. L.; GIEFING, M. The Tumor Suppressive mir-148a Is Epigenetically Inactivated in Classical Hodgkin Lymphoma. **Cells**, v. 9, n. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CELLS9102292>. Acesso em: 19 jan. 2022.

PAL, A.; KUNDU, R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3116, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.03116/BIBTEX>

PAMPEL, F. C.; KRUEGER, P. M.; DENNEY, J. T. Socioeconomic Disparities in Health Behaviors. **Annual Review of Sociology**, v. 36, p. 349, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.SOC.012809.102529>. Acesso em: 16 jan. 2022.

PAN, L.; YAN, G.; CHEN, W.; SUN, L.; WANG, J.; YANG, J. Distribution of circulating

tumor cell phenotype in early cervical cancer. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 5531, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S198391>. Acesso em: 22 dez. 2021.

PANTEL, K.; ALIX-PANABIÈRES, C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 398–406, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2010.07.001>. Acesso em: 14 dez. 2021.

PANTEL, K.; ALIX-PANABIÈRES, C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. **Nature Reviews - Clinical Oncology**, v. 16, n. 7, p. 409–424, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41571-019-0187-3>. Acesso em: 14 dez. 2021.

PARDINI, B.; DE MARIA, D.; FRANCAVILLA, A.; DI GAETANO, C.; RONCO, G.; NACCARATI, A. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4590-4>

PEDROZA-TORRES, A.; LÓPEZ-URRUTIA, E.; GARCÍA-CASTILLO, V.; JACOBO-HERRERA, N.; HERRERA, L. A.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; LÓPEZ-CAMARILLO, C.; DE LEON, D. C.; FERNÁNDEZ-RETANA, J.; CERNA-CORTÉS, J. F.; PÉREZ-PLASENCIA, C. MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6263, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19056263>. Acesso em: 20 dez. 2021.

PENG, X.; WANG, J.; ZHANG, C.; LIU, K.; ZHAO, L.; CHEN, X.; HUANG, G.; LAI, Y. A three-miRNA panel in serum as a noninvasive biomarker for colorectal cancer detection. **International Journal of Biological Markers**, v. 35, n. 3, p. 74–82, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1724600820950740>. Acesso em: 19 jan. 2022.

PLUMMER, M.; PETO, J.; FRANCESCHI, S. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 11, p. 2638–2644, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.26250>. Acesso em: 15 mar. 2022.

PORNTHANAKASEM, W.; SHOTELERSUK, K.; TERMRUNGRUANGLERT, W.; VORAVUD, N.; MUTIRANGURA, A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 1, p. 2, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-1-2>. Acesso em: 22 dez. 2021.

RADOM-AIZIK, S.; ZALDIVAR, F.; OLIVER, S.; GALASSETTI, P.; COOPER, D. M. Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 1, p. 252–261, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.01291.2009>. Acesso em: 22 jan. 2022.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/JCB.201211138>. Acesso em: 22 dez. 2021.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, v. 445, n. 0, p.

138, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.04.013>. Acesso em: 19 dez. 2021.

ROME, S. Use of miRNAs in biofluids as biomarkers in dietary and lifestyle intervention studies. **Genes & Nutrition**, v. 10, n. 5, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S12263-015-0483-1>. Acesso em: 17 jan. 2022.

ROURA, E. *et al.* The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0147029>. Acesso em: 12 dez. 2021.

SHUHENG, L.; ZHANG, S.; YANG, W.; LI, F.; LONG, H. Diagnostic Value of Exosomal miR-148a-3p in the Serum of Patients with Differentiated Thyroid Cancer. **Clinical Laboratory**, v. 67, n. 2, p. 290–297, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7754/CLIN.LAB.2020.200519>. Acesso em: 1 set. 2021.

SABERINIA, A.; ALINEZHAD, A.; JAFARI, F.; SOLTANY, S.; AKHAVAN SIGARI, R. Oncogenic miRNAs and target therapies in colorectal cancer. **International Journal of Clinical Chemistry**, v. 508, p. 77–91, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2020.05.012>. Acesso em: 18 jan. 2022.

SADIK, N. *et al.* Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. **Methods in Molecular Biology**, v. 1740, n. 1, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7652-2_1. Acesso em: 21 dez. 2021.

SADRI NAHAND, J.; MOGHOOFEI, M.; SALMANINEJAD, A.; BAHMANPOUR, Z.; KARIMZADEH, M.; NASIRI, M.; MIRZAEI, H. R.; POURHANIFEH, M. H.; BOKHARAEI-SALIM, F.; MIRZAEI, H.; HAMBLIN, M. R. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 2, p. 305–320, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.32688>. Acesso em: 21 jan. 2021.

SALMENA, L.; POLISENO, L.; TAY, Y.; KATS, L.; PANDOLFI, P. P. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language?. **Cell**, v. 146, n. 3, p. 353–358 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>

SAMMARCO, M. L.; TAMBURRO, M.; PULLIERO, A.; IZZOTTI, A.; RIPABELLI, G. Human Papillomavirus Infections, Cervical Cancer and MicroRNAs: An Overview and Implications for Public Health. **MicroRNA**, v. 9, n. 3, p. 174–186, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/2211536608666191026115045>. Acesso em: 13 dez. 2021.

SANKARANARAYANAN, R. Screening for cancer in low- and middle-income countries. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 5, p. 412–417, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.AOGH.2014.09.014>. Acesso em: 18 dez. 2021.

SCAVONE, L. Maternidade: transformações na família e nas relações de gênero. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, v. 5, n. 8, p. 47–59, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1414-32832001000100004>. Acesso em: 16 jan. 2022.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A. C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n.

9590, p. 890–907, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61416-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61416-0). Acesso em: 27 set. 2018.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; DE SANJOSÉ, S.; FAKHRY, C.; MONK, B. J.; STANLEY, M. A.; FRANCESCHI, S. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews - Disease Primers**, v. 2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>. Acesso em: 17 jul. 2020.

SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 24, p. 2324–2331, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMCP1210379>. Acesso em: 18 dez. 2021.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 22, n. 4, p. 553–560, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1406>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SCHMITZ, M.; DRIESCH, C.; BEER-GRONDKE, K.; JANSEN, L.; RUNNEBAUM, I. B.; DÜRST, M. Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 5, p. E593–E602, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.27433>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. The cancer burden attributable to biologic agents. **Annals of Epidemiology**, v. 25, n. 3, p. 183–187, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2014.11.016>. Acesso em: 13 dez. 2021.

SCHÜTTE, M.; OGILVIE, L. A.; RIEKE, D. T.; LANGE, B. M. H.; YASPO, M. L.; LEHRACH, H. Cancer Precision Medicine: Why More Is More and DNA Is Not Enough. **Public Health Genomics**, v. 20, n. 2, p. 70–80, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000477157>. Acesso em: 22 jan. 2022.

SERRANO-PERTIERRA, E.; OLIVEIRA-RODRÍGUEZ, M.; RIVAS, M.; OLIVA, P.; VILLAFANI, J.; NAVARRO, A.; BLANCO-LÓPEZ, M. C.; CERNUDA-MOROLLÓN, E. Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study. **Bioengineering**, v. 6, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING6010008>. Acesso em: 7 dez. 2021.

SHEN, H.; WANG, L.; XIONG, J.; REN, C.; GAO, C.; DING, W.; ZHU, D.; MA, D.; WANG, H. Long non-coding RNA CCAT1 promotes cervical cancer cell proliferation and invasion by regulating the miR-181a-5p/MMP14 axis. **Cell Cycle**, v. 18, n. 10, p. 1110–1121, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1609829>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SHI, L.; CHENG, Z.; ZHANG, J.; LI, R.; ZHAO, P.; FU, Z.; YOU, Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. **Brain Research**, v. 1236, p. 185–193, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.07.085>. Acesso em: 18 jan. 2022.

SHI, Z. M. *et al.* MiRNA-181b suppresses IGF-1R and functions as a tumor suppressor gene in gliomas. **RNA**, v. 19, n. 4, p. 552–560, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1261/RNA.035972.112>. Acesso em: 18 jan. 2022.

SHURTLEFF, M. J.; TEMOCHE-DIAZ, M. M.; SCHEKMAN, R. Extracellular Vesicles and Cancer: Caveat Lector. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 2, p. 395–411, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CANCERBIO-030617-050519>. Acesso em: 20 jan. 2022.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 575–581, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>. Acesso em: 16 out. 2018.

SOMMEROVA, L.; ANTON, M.; BOUCHALOVA, P.; JASICKOVA, H.; RAK, V.; JANDAKOVA, E.; SELINGEROVA, I.; BARTOSIK, M.; VOJTESEK, B.; HRSTKA, R. The role of miR-409-3p in regulation of HPV16/18-E6 mRNA in human cervical high-grade squamous intraepithelial lesions. **Antiviral Research**, v. 163, p. 185–192, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.019>. Acesso em: 19 jan. 2022.

STAM, J.; BARTEL, S.; BISCHOFF, R.; WOLTERS, J. C. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. **Journal of Chromatography B**, v. 1169, p. 122604, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2021.122604>

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v. 117, n. 2 Suppl, p. S5, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2010.01.024>. Acesso em: 18 dez. 2021.

STOLER, M. H.; SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. **JAMA**, v. 285, n. 11, p. 1500–1505, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/JAMA.285.11.1500>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SUN, J.; CHU, H.; JI, J.; HUO, G.; SONG, Q.; ZHANG, X. Long non-coding RNA HOTAIR modulates HLA-G expression by absorbing miR-148a in human cervical cancer. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 3, p. 943–952, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3589>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 13, p. 3666–3670, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>. Acesso em: 15 jan. 2019.

TAHA, M.; MITWALLY, N.; SOLIMAN, A. S.; YOUSEF, E. Potential Diagnostic and Prognostic Utility of miR-141, miR-181b1, and miR-23b in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS21228589>. Acesso em: 18 jan. 2022.

TEWARI, K. S. *et al.* Circulating Tumor Cells In Advanced Cervical Cancer: NRG Oncology – Gynecologic Oncology Group Study 240 (NCT 00803062). **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 11, p. 2363, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0276>. Acesso em: 22 dez. 2021.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**,

v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>. Acesso em: 15 jan. 2019.

THORNTON, K.; CHERVENAK, J.; NEAL-PERRY, G. Menopause and Sexuality. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 44, n. 3, p. 649, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2015.05.009>. Acesso em: 17 jan. 2022.

TIAN, J. *et al.* Using plasma cell-free DNA to monitor the chemoradiotherapy course of cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 9, p. 2547–2557, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.32295>. Acesso em: 22 dez. 2021.

TIAN, X.; GE, D.; ZHANG, F.; ZHANG, B.; BAI, W.; XU, X.; LI, Z.; CAO, Y.; LI, P.; ZOU, K.; ZOU, L. Dynamic analysis of circulating tumor DNA to predict prognosis and monitor therapeutic response in metastatic relapsed cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 4, p. 921–931, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.33362>. Acesso em: 22 dez. 2021.

TOMÉ-CARNEIRO, J.; LARROSA, M.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. J.; DÁVALOS, A.; GIL-ZAMORANO, J.; GONZÁLEZ, M.; GARCÍA-ALMAGRO, F. J.; RUIZ ROS, J. A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. **Pharmacological Research**, v. 72, p. 69–82, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2013.03.011>. Acesso em: 22 jan. 2022.

TORNESELLO, M. L.; FARAONIO, R.; BUONAGURO, L.; ANNUNZIATA, C.; STARITA, N.; CERASUOLO, A.; PEZZUTO, F.; TORNESELLO, A. L.; BUONAGURO, F. M. The Role of microRNAs, Long Non-coding RNAs, and Circular RNAs in Cervical Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00150>

TRAMS, E. G.; LAUTER, C. J.; NORMAN SALEM, J.; HEINE, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 645, n. 1, p. 63–70, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5). Acesso em: 21 dez. 2021.

TURCHINOVICH, A.; DRAPKINA, O.; TONEVITSKY, A. Transcriptome of extracellular vesicles: State-of-the-art. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, p. 202, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00202/BIBTEX>

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M.; LEE, J. J.; LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1596>. Acesso em: 24 jul. 2018.

VAN DEN BOORN, J. G.; DASSLER, J.; COCH, C.; SCHLEE, M.; HARTMANN, G. Exosomes as nucleic acid nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 3, p. 331–335, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.06.011>. Acesso em: 12 dez. 2021.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of

extracellular vesicles. **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.125>. Acesso em: 14 dez. 2021.

VESTAD, B.; LLORENTE, A.; NEURAUTER, A.; PHUYAL, S.; KIERULF, B.; KIERULF, P.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K.; HAUG, K. B. F.; ØVSTEBØ, R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 6, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1344087>. Acesso em: 7 dez. 2021.

VICKERS, K. C.; PALMISANO, B. T.; SHOUCRI, B. M.; SHAMBUREK, R. D.; REMALEY, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nature cell biology**, v. 13, n. 4, p. 423–435, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NCB2210>. Acesso em: 14 dez. 2021.

WANG, F.; SHAN, S.; HUO, Y.; XIE, Z.; FANG, Y.; QI, Z.; CHEN, F.; LI, Y.; SUN, B. MiR-155-5p inhibits PDK1 and promotes autophagy via the mTOR pathway in cervical cancer. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 99, p. 91–99, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2018.04.005>. Acesso em: 6 dez. 2021.

WANG, J.; CHANG, S.; LI, G.; SUN, Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. **Frontiers of Medicine**, v. 11, n. 4, p. 522–527, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11684-017-0526-7>. Acesso em: 21 dez. 2021.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 1, p. 25–30, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JCP.25056>. Acesso em: 12 dez. 2021.

WANG, J.; YAN, Y.; ZHANG, Z.; LI, Y. Role of miR-10b-5p in the prognosis of breast cancer. **PeerJ.**, v. 20, n. 7. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.7728>. Acesso em: 17 mar. 2022.

WANG, R.; HONG, J.; CAO, Y.; SHI, J.; GU, W.; NING, G.; ZHANG, Y.; WANG, W. Elevated circulating microRNA-122 is associated with obesity and insulin resistance in young adults. **European Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 3, p. 291–300, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0867>. Acesso em: 17 jan. 2022.

WANG, S. S. *et al.* Human papillomavirus (HPV) cofactors by disease progression and HPV types in the Study to Understand Cervical Cancer Early Endpoints and Determinants (SUCCEED). **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 18, n. 1, p. 113, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0591>. Acesso em: 20 dez. 2021.

WANG, X. *et al.* microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 11, p. 4262–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1401430111>. Acesso em: 23 jul. 2018.

WANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, P.; GUO, G.; JIANG, T.; ZHAO, X.; JIANG, J.; HUANG, X.; TONG, H.; TIAN, Y. Serum exosomal microRNAs combined with alpha-

fetoprotein as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 5, p. 1670, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/CAM4.1390>. Acesso em: 19 jan. 2022.

WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; HUANG, D. Y.; HUANG, K. H.; LEE, M. J.; GALAS, D. J.; WANG, K. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2010.147405>. Acesso em: 14 dez. 2021.

WEN, Y. F.; CHENG, T. T.; CHEN, X. L.; HUANG, W. J.; PENG, H. H.; ZHOU, T. C.; LIN, X. D.; ZENG, L. S. Elevated circulating tumor cells and squamous cell carcinoma antigen levels predict poor survival for patients with locally advanced cervical cancer treated with radiotherapy. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0204334>. Acesso em: 22 dez. 2021.

WENDLAND, E. M.; KOPS, N. L.; BESSEL, M.; COMERLATO, J.; MARANHÃO, A. G. K.; SOUZA, F. M. A.; VILLA, L. L.; PEREIRA, G. F. M. Effectiveness of a universal vaccination program with an HPV quadrivalent vaccine in young Brazilian women. **Vaccine**, v. 39, n. 13, p. 1840–1845, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2021.02.040>. Acesso em: 18 dez. 2021.

WENTZENSEN, N.; SCHIFFMAN, M.; DUNN, T.; ZUNA, R. E.; GOLD, M. A.; ALLEN, R. A.; ZHANG, R.; SHERMAN, M. E.; WACHOLDER, S.; WALKER, J.; WANG, S. S. Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 9, p. 2151–2158, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.24528>. Acesso em: 19 dez. 2021.

WHITHAM, M. *et al.* Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 237–251.e4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.12.001>. Acesso em: 17 jan. 2022.

WHO. **Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem.** 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>. Acesso em: 18 dez. 2021.

WILTING, S. M. *et al.* Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. **Oncogene**, v. 32, n. 1, p. 106–116, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.20>. Acesso em: 23 jul. 2018.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews - Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2050>. Acesso em: 27 set. 2018.

WU, Q.; *et al.* Combination of Serum miRNAs with Serum Exosomal miRNAs in Early Diagnosis for Non-Small-Cell Lung Cancer. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 485–495, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S232383>. Acesso em: 1 set. 2021.

WU, X. G. *et al.* Cancer-derived exosomal miR-221-3p promotes angiogenesis by targeting THBS2 in cervical squamous cell carcinoma. **Angiogenesis**, v. 22, n. 3, p. 397–410, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09665-1>. Acesso

em: 21 jan. 2021.

WU, Y.; WANG, X.; MENG, L.; LI, W.; LI, C.; LI, P.; XU, S. Changes of miRNA Expression Profiles from Cervical-Vaginal Fluid-Derived Exosomes in Response to HPV16 Infection. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/7046894>. Acesso em: 7 jan. 2022.

YANG, L.; WANG, Y. L.; LIU, S.; ZHANG, P. P.; CHEN, Z.; LIU, M.; TANG, H. miR-181b promotes cell proliferation and reduces apoptosis by repressing the expression of adenylyl cyclase 9 (AC9) in cervical cancer cells. **FEBS Letters**, v. 588, n. 1, p. 124–130, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.11.019>. Acesso em: 18 jan. 2022.

YANG, T. J.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZHENG, J. D.; LIU, L. LncRNA UCA1 regulates cervical cancer survival and EMT occurrence by targeting miR-155. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 19, p. 9869–9879, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.26355/EURREV_202010_23197

YIN, J.; SHI, Z.; WEI, W.; LU, C.; WEI, Y.; YAN, W.; LI, R.; ZHANG, J.; YOU, Y.; WANG, X. MiR-181b suppress glioblastoma multiforme growth through inhibition of SP1-mediated glucose metabolism. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12935-020-1149-7>. Acesso em: 18 jan. 2022.

YOU, X. *et al.* Exosomal miR-663b exposed to TGF- β 1 promotes cervical cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting MGAT3. **Oncology Reports**, v. 45, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/OR.2021.7963>. Acesso em: 7 jan. 2022.

YU, M.; XU, Y.; PAN, L.; FENG, Y.; LUO, K.; MU, Q.; LUO, G. miR-10b Downregulated by DNA Methylation Acts as a Tumor Suppressor in HPV-Positive Cervical Cancer via Targeting Tiam1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 1763–1777, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000495680>. Acesso em: 19 jan. 2022.

YUN, J. *et al.* Exosomal miR-181b-5p Downregulation in Ascites Serves as a Potential Diagnostic Biomarker for Gastric Cancer-associated Malignant Ascites. **Journal of Gastric Cancer**, v. 19, n. 3, p. 301, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5230/JGC.2019.19.E27>. Acesso em: 19 jan. 2022.

ZHANG, L.; LI, H.; YUAN, M.; LI, M.; ZHANG, S. Cervical cancer cells-secreted exosomal microRNA-221-3p promotes invasion, migration and angiogenesis of microvascular endothelial cells in cervical cancer by down-regulating MAPK10 expression. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 10307–10319, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S221527>. Acesso em: 21 jan. 2021.

ZHANG, W.; XIA, W.; LV, Z.; NI, C.; XIN, Y.; YANG, L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? **Cellular physiology and biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 755–768, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000458736>. Acesso em: 17 dez. 2021.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; GUO, X.; HU, Z.; SHI, H. Interfering Human Papillomavirus E6/E7 Oncogenes in Cervical Cancer Cells Inhibits the Angiogenesis of Vascular Endothelial Cells via Increasing miR-377 in Cervical Cancer Cell-Derived Microvesicles.

OncoTargets and Therapy, v. 13, p. 4145, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S239979>. Acesso em: 7 jan. 2022.

ZHANG, Y.; SUN, B.; ZHAO, L.; LIU, Z.; XU, Z.; TIAN, Y.; HAO, C. Up-regulation of miRNA-148a inhibits proliferation, invasion, and migration while promoting apoptosis of cervical cancer cells by down-regulating RRS1. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 5, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20181815>. Acesso em: 21 dez. 2021.

ZHENG, M.; HOU, L.; MA, Y.; ZHOU, L.; WANG, F.; CHENG, B.; WANG, W.; LU, B.; LIU, P.; LU, W.; LU, Y. Exosomal let-7d-3p and miR-30d-5p as diagnostic biomarkers for non-invasive screening of cervical cancer and its precursors. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 76, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0999-x>. Acesso em: 5 ago. 2019.

ZHOU, C. *et al.* Exosome-derived miR-142-5p remodels lymphatic vessels and induces IDO to promote immune privilege in the tumour microenvironment. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 2, p. 715, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41418-020-00618-6>. Acesso em: 7 jan. 2022.

ZHOU, C.; WEI, W.; MA, J.; YANG, Y.; LIANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; CHEN, X.; HUANG, L.; WANG, W.; WU, S. Cancer-secreted exosomal miR-1468-5p promotes tumor immune escape via the immunosuppressive reprogramming of lymphatic vessels. **Molecular Therapy**, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.034>. Acesso em: 22 jan. 2021.

ZONG, S.; LIU, X.; ZHOU, N.; YUE, Y. E2F7, EREG, miR-451a and miR-106b-5p are associated with the cervical cancer development. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 299, n. 4, p. 1089-1098, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00404-018-5007-y>. Acesso em: 17 mar. 2022.

ZOU, D.; ZHOU, Q.; WANG, D.; GUAN, L.; YUAN, L.; LI, S. The Downregulation of MicroRNA-10b and its Role in Cervical Cancer. **Oncology Research**, v. 24, n. 2, p. 99–108, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/096504016X14611963142173>. Acesso em: 19 jan. 2022.

ZSEMLYE, M. High-Grade Cervical Dysplasia: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 615–621, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2008.09.008>. Acesso em: 27 set. 2018.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews - Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc798>. Acesso em: 25 jan. 2022.

APÊNDICE 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ADICIONAL DESENVOLVIDA NO PERÍODO DE DOUTORADO RELACIONADA AO TEMA - RNAs NÃO-CODIFICADORES NO CONTEXTO DO CC

Artigo intitulado “*Competing Endogenous RNAs in Cervical Carcinogenesis: A New Layer of Complexity*” publicado em 2021 no periódico *Processes - Special Issue: Biogenesis, Function and Role of MicroRNA in Cancer*⁵.



Review

Competing Endogenous RNAs in Cervical Carcinogenesis: A New Layer of Complexity

Fernanda Costa Brandão Berti ¹, Sara Cristina Lobo-Alves ², Camila de Freitas Oliveira-Toré ³, Amanda Salviano-Silva ¹, Karen Brajão de Oliveira ⁴, Patrícia Savio de Araújo-Souza ¹, Jong Kook Park ⁵, Gabriel Adelman Cipolla ^{1,*†} and Danielle Malheiros ^{1,*†}

¹ Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-990, Brazil; nandabrandao@hotmail.com (F.C.B.B.); amandasalviano@ufpr.br (A.S.-S.); psas@ufpr.br (P.S.d.A.-S.); gabriel.cipolla@ufpr.br (G.A.C.)

² Research Institute Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba 80250-060, Brazil; saralobo5@yahoo.com.br

³ Postgraduate Program in Internal Medicine, Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-990, Brazil; camila_oliveira15@hotmail.com

⁴ Postgraduate Program in Experimental Pathology, Department of Pathological Sciences, Londrina State University, Londrina 86057-970, Brazil; karen.brajo@uel.br

⁵ Department of Biomedical Science and Research Institute for Bioscience & Biotechnology, Hallym University, Chuncheon 24252, Korea; jkpark@hallym.ac.kr

* Correspondence: dani_malheiros@ufpr.br; Tel.: +55-41-3361-1724

† Both authors contributed equally to this work.

⁵ Arquivo completo disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr9060991>

APÊNDICE 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ADICIONAL DESENVOLVIDA NO PERÍODO DE DOUTORADO RELACIONADA AO TEMA - RNAs NÃO-CODIFICADORES NO CONTEXTO DO CC

Artigo intitulado “*Comprehensive Analysis of ceRNA Networks in HPV16- and HPV18-mediated Cervical Cancers Reveals XIST as a Pivotal Competing Endogenous RNA*” publicado em 2021 no periódico *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis Of Disease*⁶.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis



Comprehensive analysis of ceRNA networks in HPV16- and HPV18-mediated cervical cancers reveals XIST as a pivotal competing endogenous RNA

Fernanda Costa Brandão Berti^{a,b,1}, Carolina Mathias^{a,c,1}, Leandro Encarnação Garcia^{a,c}, Daniela Fiori Gradia^{a,c}, Patrícia Savio de Araújo-Souza^{a,d}, Gabriel Adelman Cipolla^{a,b}, Jaqueline Carvalho de Oliveira^{a,c}, Danielle Malheiros^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-900 Curitiba, Paraná State, Brazil
^b Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-900 Curitiba, Paraná State, Brazil
^c Laboratory of Human Cytogenetics and Oncogenetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-900 Curitiba, Paraná State, Brazil
^d Laboratory of Immunogenetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-900 Curitiba, Paraná State, Brazil



⁶ Arquivo completo disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166172>

APÊNDICE 3 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DESENVOLVIDA NO PERÍODO DE DOUTORADO RELACIONADO AO TEMA DA TESE – BIÓPSIA LÍQUIDA

Artigo intitulado “*From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis*” publicado em 2019 no periódico *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*⁷.

BBA - Reviews on Cancer 1872 (2019) 188306



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Reviews on Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbcan



Review

From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis



Fernanda Costa Brandão Berti^a, Amanda Salviano-Silva^a, Helen Cristina Beckert^a, Karen Brajão de Oliveira^b, Gabriel Adelman Cipolla^a, Danielle Malheiros^{a,*}

^a Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, Zip Code 81530-000 Curitiba, PR, Brazil

^b Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Rod. Celso Garcia Cid PR 445, KM 380, Zip Code 86057-970 Londrina, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

HPV

Circulating miRNAs

Cell-free miRNAs

EV-derived miRNAs

Squamous intraepithelial lesions

Cervical cancer

ABSTRACT

Despite the essential role of Human Papillomavirus (HPV) in cervical carcinogenesis, other factors are required for cancer establishment, like miRNAs. Such molecules present a complex biogenesis, being diversely distributed across tissues and biological fluids, as cell-free miRNAs or miRNAs present in extracellular vesicles (EV). After HPV infection, an interplay between HPV and the miRNA network occurs in cervical cells. As the virus persists and cellular transformation occurs, specific patterns of miRNA expression are found in different stages of cervical disease. Thus, defining promising miRNAs/specific miRNA signatures - especially circulating miRNAs - represents an interesting strategy for screening (diagnosis, prognosis, etc.) those stages. Despite the limited number of studies investigating circulating miRNAs in distinct biological fluids, accumulating data have pointed to some promising candidates, both as cell-free or EV-derived miRNAs. Here we highlight some of these promising non-invasive biomarkers and bring attention to the urgent need for efforts in this field.

⁷ Arquivo completo disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.08.001>

APÊNDICE 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HOSPITAL ERASTO GAERTNER

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidada a participar do estudo intitulado “Análise genética e de proteínas do sistema imune inato em pacientes com lesão intraepitelial cervical ou câncer do colo do útero”. Para que você possa decidir se aceita ou não participar, esse termo fornece algumas informações.

1. O objetivo do estudo é analisar se existem alterações no seu DNA (ou outro material genético) ou em componentes que fazem parte do seu sistema imunológico inato e que poderiam influenciar no desenvolvimento de lesões e câncer do colo do útero. Sabemos que o vírus HPV pode causar essa doença, por isso pretendemos investigar também o tipo de HPV que levou ao seu desenvolvimento.
2. Para realizar esse estudo, pretendemos fazer algumas perguntas para você e verificar seus dados e informações no prontuário. Gostaríamos de coletar seu sangue para realizar testes laboratoriais, como analisar partes do seu DNA e proteínas relacionadas com o sistema imunológico inato. Para tal, pretendemos utilizar também blocos de amostras biológicas (amostras de biópsias ou tumor) e/ou escova endocervical coletada durante exame preventivo, caso você tenha sido submetida a algum procedimento padrão no Hospital Erasto Gaertner para extração dos mesmos.
3. A coleta de sangue será realizada por punção periférica da veia do antebraço. Os desconfortos da coleta de sangue estão relacionados à própria punção da veia, incluindo dor leve e, eventualmente, hematomas. Caso haja alguma complicação durante e após a coleta, nos responsabilizamos para atendê-la e fornecer os cuidados necessários.
4. Não haverá benefício direto para você, pois se trata de um estudo experimental. Entretanto, acreditamos que por meio desse estudo poderemos conhecer melhor fatores que poderiam influenciar no desenvolvimento do câncer do colo do útero.
5. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Camila de Freitas Oliveira, que pode ser encontrado no endereço Rua General Carneiro, 181 ou pelo telefone (41) 3360-1800 (ramal 6537) e Fernanda Costa Brandão Berti, que pode ser encontrado no endereço Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100 ou pelo telefone (41) 3361-1724.
6. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), no Hospital Erasto Gaertner– R Dr. Ovan de Amaral, 201. – Bairro Jardim das Américas – Fone: (41) 3361-5271.
7. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo no seu tratamento na Instituição.
8. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes. Não iremos divulgar seu nome quando os resultados do estudo forem publicados.
9. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados do estudo. Para tal, você pode entrar em contato com o investigador principal (endereço e telefone já foram mencionados acima).
10. Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
12. Os dados e o material coletado serão utilizados para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise genética e de proteínas do sistema imune inato em pacientes com lesão intraepitelial cervical ou câncer do colo do útero”. Eu discuti com a Sra. Camila de Freitas Oliveira e/ou Sra. Fernanda Costa Brandão Berti, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do Pesquisador

Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – UBS NOSSA SENHORA APARECIDA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Prof.^a Danielle Malheiros Ferreira, Gabriel Adelman Cipolla, Fernanda Costa Brandão Berti e Helen Cristina Beckert, da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando a Senhora, mulher com ou sem histórico pessoal de lesão intraepitelial escamosa do colo uterino, a participar de um estudo intitulado “*Caracterização do perfil de microRNAs em vesículas extracelulares de pacientes com Lesões Intraepiteliais Escamosas do Colo Uterino*”.

Biomarcadores são moléculas presentes no organismo de indivíduos com uma condição específica (neste caso, lesão intraepitelial escamosa do colo uterino) e que permitem realizar a sua distinção de indivíduos livres dessa condição. A identificação destas moléculas permite o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico não invasivo, ou seja, em que não é necessária uma biópsia, o que pode favorecer a detecção precoce da doença. Com o diagnóstico precoce e a identificação dos diferentes graus de lesão estes métodos podem também auxiliar na prevenção da evolução dessas lesões para o estágio de câncer de colo uterino.

Sendo assim o objetivo desta pesquisa é identificar biomarcadores não-invasivos, presentes na secreção cervical e no sangue (plasma) de pacientes com diferentes graus de lesão intraepitelial escamosa, que sejam capazes de auxiliar no diagnóstico e prognóstico. É importante ressaltar que este grupo realiza pesquisa básica, sendo que os dados obtidos a partir desta pesquisa serão dados preliminares e que não serão imediatamente implementados na clínica. Para que esses biomarcadores sejam implementados há a necessidade de estudos adicionais e comprovação de sua eficácia pela comunidade científica. Portanto, não há benefício imediato às participantes e tampouco risco de identificação genética de qualquer natureza.

Caso você decida participar da pesquisa, é necessário:

- 1) ter mais de 18 anos;
- 2) permitir a utilização da escova endocervical colhida anteriormente pela equipe médica/ de enfermagem (resultante da coleta do exame preventivo de rotina);
- 3) permitir a coleta de alíquotas de sangue (2 tubos de 4ml) e;
- 4) permitir a aplicação de questionário.

Para tanto, após realização do exame preventivo, você precisará encaminhar-se à nossa equipe (em sala específica indicada pelo médico/ equipe de enfermagem, na própria Unidade Básica de Saúde). Neste momento, você será questionada se:

- 1) deseja participar da pesquisa (leitura, eventuais esclarecimentos e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido);
- 2) se permite ou não a utilização da escova endocervical colhida anteriormente pela equipe médica/ de enfermagem (resultante da coleta do exame preventivo de rotina);

Observação: A amostra de secreção cervical, consiste na verdade, na utilização da escova endocervical utilizada para coleta do exame preventivo (exame de rotina, realizado independentemente da pesquisa), a qual seria descartada. Para que possamos utilizá-la, é necessária apenas sua autorização (para utilização desse material que seria descartado normalmente).

- 3) se permite a coleta de alíquotas de sangue, e no caso de permitir a mesma será coletada.

Observação: É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao local de onde será retirado o sangue. É possível que surja uma mancha arroxeadada no local da introdução da agulha, mas ela desaparecerá ao longo dos dias, mas se a Senhora desejar, pode ser aplicada uma pomada no local para facilitar o desaparecimento da mancha. O material obtido, sangue periférico (obtido por punção venosa), será utilizado unicamente para essa pesquisa e será consumido inteiramente durante o estudo.

- 4) se permite a aplicação do questionário, e no caso de permitir o mesmo será realizado.

Observação: Caso a Senhora experimente algum desconforto em relação a algumas perguntas durante a aplicação do questionário, poderá optar por não respondê-las, sendo respeitada integralmente.

Todo o procedimento levará aproximadamente 15 minutos (incluindo aproximadamente 5 minutos para leitura e esclarecimento de dúvidas em relação ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, 2 minutos para a coleta de sangue, 5 minutos para aplicação de questionário).

Os benefícios esperados com essa pesquisa incluem o desenvolvimento de métodos não-invasivos (sem necessidade de biópsia, por exemplo) de identificação dos diferentes estágios de lesão intraepitelial escamosa. Adicionalmente, além de permitir o diagnóstico, a facilitação deste poderá contribuir igualmente para a prevenção do câncer de colo uterino. Ressalta-se que não há um benefício direto e imediato, nem indireto à Senhora, sendo que os resultados da pesquisa não deverão impactar no curso de seu acompanhamento. No entanto, os achados desta pesquisa poderão trazer benefícios futuros para as pacientes que vierem a desenvolver esses tipos de lesões e, conseqüentemente, para as que vierem a desenvolver câncer de colo uterino, seja auxiliando em um diagnóstico mais preciso, ou até mesmo no direcionamento de tratamentos mais eficazes. Esclarecemos que embora seja uma pesquisa genética, as informações que serão obtidas não se constituem em parâmetros hereditários e não são transmitidos para futuras gerações, portanto não há necessidade de aconselhamento genético nem de outro tipo de preocupação ou cuidado.

Os pesquisadores Danielle Malheiros Ferreira, Gabriel Adelman Cipolla, Fernanda Costa Brandão Berti e Helen Cristina Beckert, responsáveis por esta pesquisa, poderão ser localizados no Laboratório de Genética Molecular Humana, sala 60, no departamento de genética da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, fone (41) 3361-1724, no horário das 9h às 17h (ou a qualquer momento no e-mail nandabrandao@hotmail.com) para esclarecer eventuais dúvidas que a Senhora possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se a Senhora não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (como a pesquisadora responsável, a médica/ enfermeira e a aluna de pós-graduação envolvida na pesquisa). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (como o transporte do material biológico até a universidade e todos os reagentes utilizados durante a pesquisa, entre outros) não são de sua responsabilidade e a Senhora não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Se a Senhora tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone (41) 3360-7259. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de ____.

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

APÊNDICE 6 – QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS PARTICIPANTES DO ESTUDO EM AMBOS OS CENTROS DE SAÚDE PARTICIPANTES

FICHA CADASTRAL

Data coleta: ____/____/____ Suspeita diagnóstica: _____

Nº Registro/prontuário: _____

Nome Completo: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____

Estado civil: _____

Etnia: () Branca () Negra () Asiática () Indígena

Observações: _____

Jejum: () Não () Sim

Estado geral: () BEG () Gripada ()

Em uso de antibiótico () Febre nas últimas 48h

Observações: _____

Realiza atividade física regularmente? () Não () Sim

Tipo/frequência: _____

Realizou atividade física antes da coleta? () Não () Sim

Tipo/frequência: _____

OUTROS DADOS:

Renda familiar () 1 SM () 1- 3 SM () 3 - 5 () > 5

Escolaridade: () EF. incompleto () EF. completo () EM. incompleto

() EM. completo () ES. incompleto () ES. Completo

Conhecimento sobre HPV: () Nunca ouvi falar () Já ouvi falar mas não sei o que é () Conheço (transmissão e doenças)

Você está grávida? () Sim () Não

Amamentando? () Sim () Não

Nº de gestações: _____ Idade do 1º parto: _____

Nº de abortos: _____ Motivo do aborto: _____

Idade da primeira relação sexual: _____

Nº total de parceiros no decorrer da vida sexual: _____

Nº total de parceiros nos últimos 6 meses: _____

Uso de métodos contraceptivos

() Pílula anticoncepcional * Tempo total (em anos) do uso: _____ Idade de início: _____ Marca: _____

() DIU * Tempo total (em anos) do uso: _____ Idade de início: _____ Marca: _____

() Injeção hormonal * Tempo total (em anos) do uso: _____ Idade de início: _____ Marca: _____

() Laqueadura

Uso de preservativo: () Sempre () Às vezes () Nunca

Menopausa? () Não () Sim * Idade de início: _____

Faz reposição hormonal: () Sim () Não

Data da última menstruação: de _____ à _____

Período do ciclo menstrual: () 28 dias () 32 dias outros _____

Ex- fumante?

() Não () Sim * Há quanto tempo parou de fumar? _____

Durante quanto tempo fumou? _____ Nº cigarros dia _____

Fumante?

() Não () Sim * Há quanto tempo? _____ Nº cigarros dia _____

Possui alguma DST: () Não () Sim Qual(is): _____

Possui alguma doença autoimune: () Não () Sim Qual(is): _____

Familiares com doenças autoimunes: () Não () Sim Quem/Qual(is): _____

Possui algum tipo de alergia? () Não () Sim Qual(is): _____

Outras doenças: _____

Faz o uso de medicamentos contínuos: () Não () Sim

Qual(is): _____

Está fazendo o uso de corticoides no momento da coleta? () Não () Sim

Qual: _____ Tempo de uso do corticoide: _____

Uso de pomada ginecológica no momento da coleta () Não () Sim

Qual: _____

Já realizou cauterização? () Não () Sim

Local: () colo do útero () vagina () vulva () ânus

Realiza preventivo anualmente? () Não () Sim

Data do último preventivo: _____

Possui vacinação contra HPV: () Não () Sim * Data da vacinação: _____

Já teve algum tipo de câncer? () Não () Sim * Qual? _____

Familiares com câncer: () Não () Sim

Quem/ tipo: _____

Já realizou transfusão sanguínea? () Não () Sim * Data: _____

Fez cirurgia recentemente? (ex.: bariátrica) () Não () Sim * Data: _____

Observações: _____

MATERIAIS COLETADOS:

Secreção Cervical: () Sim () Não

Plasma: () Sim () Não

Soro: () Sim () Não

Biópsia: () Sim () Não

APÊNDICE 7 – MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA SUPLEMENTAR 1 – miRNAs diferencialmente expressos em diferentes materiais biológicos considerando a abordagem A adotada

MiRNAs diferencialmente expressos em dois ou mais materiais biológicos diferentes			
Abordagem A: SL+LIEBG versus LIEAG+CC			
TECIDO E MUCO E EXOSSOMOS	MUCO E EXOSSOMOS	TECIDO E EXOSSOMOS	TECIDO E MUCO
miR-181b-5p	miR-10b-5p	miR-27b-3p	let-7c-5p
	miR-183-5p	miR-30a-5p	miR-10a-5p
	miR-889-3p	miR-365a-3p	miR-130b-3p
	miR-96-5p	miR-99a-5p	miR-146a-5p
			miR-17-3p
			miR-200a-3p
			miR-205-5p
			miR-21-5p
			miR-221-3p
			miR-34a-5p
			miR-363-3p
			miR-451a
			miR-486-5p
			miR-617
			miR-95-3p

Nesta tabela são apresentados os resultados obtidos a partir da intersecção dos miRNAs diferencialmente expressos em pelo menos dois tipos de materiais biológicos avaliados, considerando-se a abordagem A. Os perfis de expressão (mais ou menos expressos em relação aos grupos propostos) nos diferentes materiais não são considerados, sendo considerados como “diferencialmente expressos” de maneira geral. Em negrito os miRNAs selecionados neste estudo. Todos os miRNAs mencionado acima são *Homo sapiens* miRNAs (hsa-miRNAs), respeitando-se a nomenclatura oficial adotada pelo miRBase (*miRBase: the microRNA database; Release 22.1*).
 FONTE: A autora (2022).

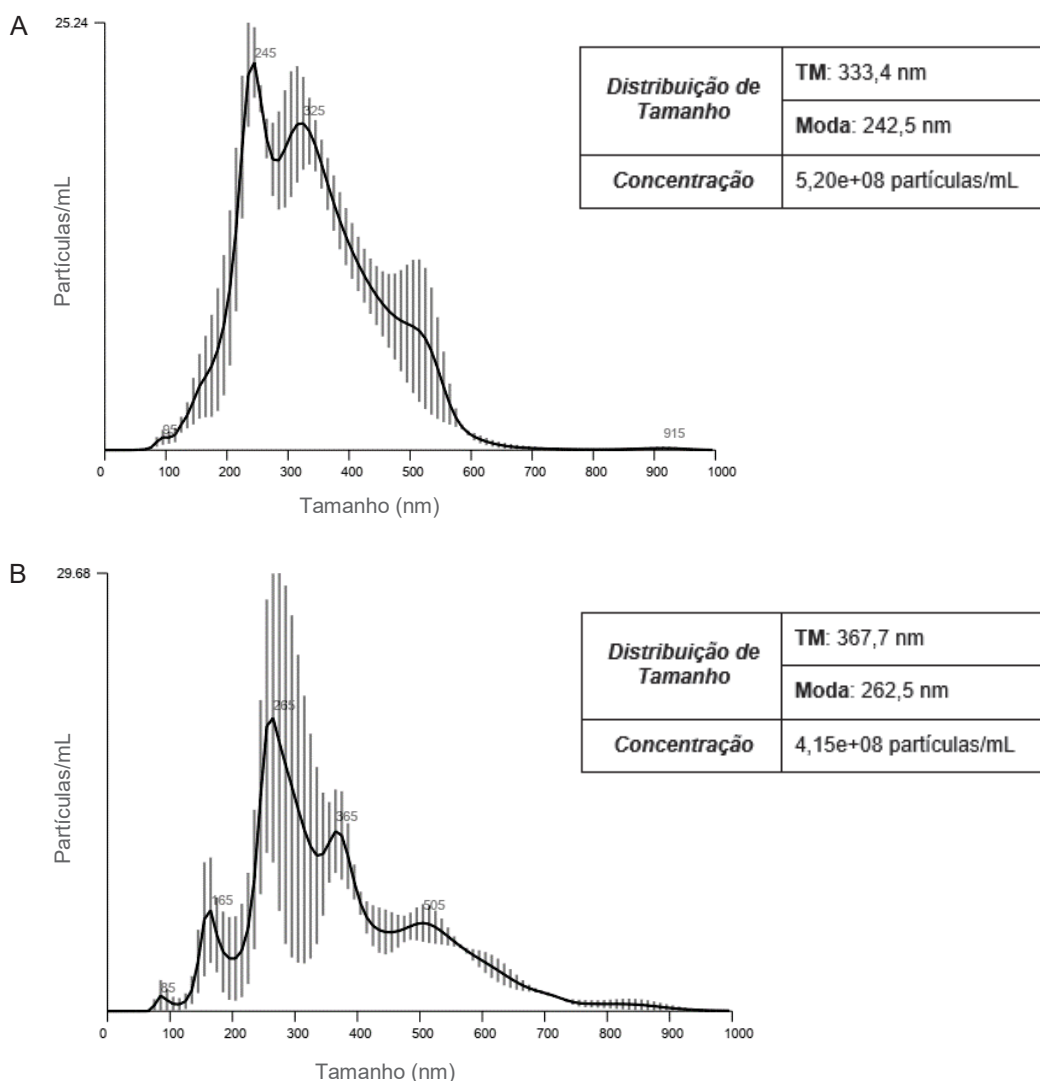
TABELA SUPLEMENTAR 2 – miRNAs diferencialmente expressos em diferentes materiais biológicos considerando a abordagem B adotada

MiRNAs diferencialmente expressos em dois ou mais materiais biológicos diferentes					
Abordagem B: SL <i>versus</i> CC					
TECIDO E MUCO E EXOSSOMOS	MUCO E EXOSSOMOS	TECIDO E EXOSSOMOS	TECIDO E MUCO		
let-7i-5p	miR-10b-5p	miR-101-3p	let-7c-5p	miR-146a-5p	miR-3663-3p
miR-10a-5p	miR-361-5p	miR-125b-5p	let-7d-5p	miR-146b-5p	miR-3667-5p
miR-125a-5p	miR-501-3p	miR-134-5p	let-7e-5p	miR-148b-3p	miR-3677-3p
miR-126-5p	miR-502-3p	miR-181d-5p	let-7g-5p	miR-151a-3p	miR-3677-5p
miR-132-3p	miR-7641	miR-191-5p	miR-100-5p	miR-15a-5p	miR-3678-3p
miR-181b-5p		miR-29c-3p	miR-103a-3p	miR-15b-5p	miR-3687
miR-21-5p		miR-30c-5p	miR-106a-5p	miR-16-5p	miR-3692-5p
miR-339-5p		miR-335-5p	miR-106b-3p	miR-17-3p	miR-370-3p
miR-92b-3p			miR-106b-5p	miR-17-5p	miR-3713
miR-99b-5p			miR-107	miR-182-5p	miR-3714
			miR-10a-3p	miR-185-5p	miR-374b-5p
			miR-1178-3p	miR-18a-5p	miR-374c-5p
			miR-1181	miR-193a-3p	miR-378a-3p
			miR-1185-2-3p	miR-19a-3p	miR-380-5p
			miR-1193	miR-19b-3p	miR-381-3p
			miR-1207-3p	miR-200a-3p	miR-381-5p
			miR-1233-5p	miR-200b-3p	miR-3908
			miR-1234-3p	miR-200c-3p	miR-3913-3p
			miR-1236-5p	miR-205-5p	miR-3914
			miR-1246	miR-20b-5p	miR-3916
			miR-1247-3p	miR-210-3p	miR-3918
			miR-1248	miR-221-3p	miR-3921
			miR-126-3p	miR-222-3p	miR-3922-5p
			miR-1266-3p	miR-23b-3p	miR-3929
			miR-1269a	miR-25-3p	miR-3934-5p
			miR-1273c	miR-27a-3p	miR-3976
			miR-127-5p	miR-27b-3p	miR-412-3p
			miR-1276	miR-28-5p	miR-429
			miR-128-3p	miR-30a-5p	miR-451a
			miR-1289	miR-30d-5p	miR-486-5p
			miR-1290	miR-331-3p	miR-494-3p
			miR-1292-5p	miR-34a-5p	miR-615-3p
			miR-1307-5p	miR-3622b-3p	miR-617
			miR-130a-3p	miR-3622b-5p	miR-622
			miR-130b-3p	miR-363-3p	miR-631
			miR-130b-5p	miR-3646	miR-671-5p
			miR-1324	miR-3649	miR-92a-3p
			miR-133a-5p	miR-3652	miR-93-5p
			miR-135a-3p	miR-3657	miR-95-3p

miR-135b-5p	miR-365a-5p	miR-99a-5p
miR-141-3p	miR-3661	

Nesta tabela são apresentados os resultados obtidos a partir da intersecção dos miRNAs diferencialmente expressos em pelo menos dois tipos de materiais biológicos avaliados, considerando-se a abordagem B. Os perfis de expressão (mais ou menos expressos em relação aos grupos propostos) nos diferentes materiais não são considerados, sendo considerados como “diferencialmente expressos” de maneira geral. Em negrito os miRNAs selecionados neste estudo. Todos os miRNAs mencionado acima são *Homo sapiens* miRNAs (hsa-miRNAs), respeitando-se a nomenclatura oficial adotada pelo miRBase (*miRBase: the microRNA database; Release 22.1*).
 FONTE: A autora (2022).

FIGURA SUPLEMENTAR 1 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE NTA DOS SOBRENADANTES RESULTANTES DO ISOLAMENTO DE VEs PLASMÁTICAS PROVENIENTES DE AMOSTRA DE CONTROLE E PACIENTE



LEGENDA: Histogramas demonstrando a distribuição de tamanho das nanopartículas, pela técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) do sobrenadante resultante do isolamento de VEs plasmáticas provenientes de: amostra de controle SL (A); e de amostra de paciente com CC (C). Nos quadros à direita são apresentados parâmetros referentes a amostra analisada (individualmente), como distribuição de tamanho (tamanho médio e moda) e concentração das nanopartículas em suspensão. TM, tamanho médio; CC, câncer cervical; SL, sem lesão. FONTE: A autora (2022).