



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NÃO SINÔNIMOS DO RECEPTOR
TOLL-LIKE 9 (TLR9) EM AMOSTRAS CERVICAIS INFECTADAS
PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO

Aluna: Gisnayle Ana da Silva Pereira
Orientadora: Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Nicodemos Telles Ponte Junior

Recife, 2016

GISNAYLE ANA DA SILVA PEREIRA

**Análise de polimorfismos não sinônimos do receptor Toll-Like 9 (TLR9)
em amostras cervicais infectadas pelo Papilomavirus humano**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Prof. Dr. Nicodemos Telles Ponte Junior

Departamento de Patologia, CCS/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife, 2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Pereira, Gisnayle Ana da Silva

Análise de polimorfismos não sinônimos do receptor Toll-Like 9 (TLR9) em amostras cervicais infectadas pelo Papilomavírus humano / Gisnayle Ana da Silva Pereira. – Recife: O Autor, 2016.

80 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Coorientador: Nicodemos Telles Pontes Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Colo uterino- câncer 2. Papilomavírus 3. Polimorfismo (genética) I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (orient.) II. Pontes Junior, Nicodemos Telles (coorient.) III. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-313

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

GISNAYLE ANA DA SILVA PEREIRA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NÃO SINÔNIMOS DO RECEPTOR TOLL-
LIKE 9 (TLR9) EM AMOSTRAS GENITAIS INFECTADAS PELO
PAPILOMAVIRUS HUMANO**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **GISNAYLE ANA DA SILVA PEREIRA** como:

Aprovada

Recife, 29 de Fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Orientador – Membro interno
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. Cintia Renata Costa Rocha
Membro Interno
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof. Dr. Fabrício Souto Oliveira
Membro externo
Centro Acadêmico do Agreste – CAA - UFPE

RESUMO

O câncer do colo do útero é um dos principais tipos de câncer no mundo, e seu desenvolvimento está associado principalmente à infecção pelo Papilomavirus humano (HPV). Embora esse tipo de infecção esteja intimamente associado à atividade sexual, a alta incidência das lesões cervicais pode estar relacionada a uma deficiência na resposta imune. Receptores Toll-like (TLRs) tem um importante papel na imunidade inata, atuando no reconhecimento de antígenos e gerando sinais para produção das citocinas pró-inflamatórias. O TLR9, atua no reconhecimento do DNA bacteriano e viral conduzindo ao recrutamento de células imunológicas para os sítios da infecção. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em TLR9 podem influenciar no aumento da susceptibilidade a diversas doenças, como, por exemplo, o câncer cervical. O presente estudo teve por objetivo identificar polimorfismos não sinônimos com potencial correlação com a infecção por HPV, assim como avaliar efeitos estruturais e funcionais ocasionados por essas mutações em TLR9 através de ferramentas *in silico*. Análises para 5 nsSNPs da TLR9 foram realizadas por PCR-RFLP em amostras cervicais de 57 pacientes atendidas nas Unidades de Saúde da Família (SUS, Olinda – PE). Adicionalmente, para determinar como SNPs não sinônimos (nsSNPs) podem afetar a estrutura molecular e a função de TLR9, uma análise de nsSNPs existentes para TLR9 foi realizada e apenas nsSNPs que possuíam variação no grau de hidrofobicidade maior ou igual a 50% foram utilizados para análise preditiva do efeito estrutural e funcional através de 16 algoritmos. A metodologia para PCR-RFLP para os polimorfismos 7021T>G (Met85Arg), 7191G>A (Glu115Gln), 7351C>T (Ala168Val), 7986G>T (Asp380Tyr), 8159G>T (Met347Ile) foi desenhada através de bioinformática. A análise molecular demonstrou que para TR9 8159G>T, o alelo T pode estar associado com lesões cervicais ($p=0.0005$). Em relação à predição computacional, 18 nsSNPs foram encontrados com alto impacto funcional/estrutural para a TLR9, sendo 12 nsSNPs localizados na região de reconhecimento do patógeno. Através do nosso estudo, descobrimos polimorfismos que podem ter alta correlação com doenças causadas por agentes patogênicos, de acordo com a previsão dos impactos estruturais e funcionais através de polimorfismo deletério não sinônimo na molécula de TLR9.

Palavras chaves: Câncer do colo do útero, Receptor Toll-like 9, polimorfismos de nucleotídeo único

ABSTRACT

Cervical cancer is among the main types of cancer of higher incidence in the world. It is associated mainly with human papillomavirus (HPV) infection. Although this type of infection is closely associated with sexual activity, the high incidence of cervical lesions may be also related to a deficiency in the immune response. Toll-like Receptors (TLRs) play an important role in innate immunity, acting in the recognition of antigens and the generation of signals that produce proinflammatory cytokines. TLR9 operates in the recognition of bacterial and viral DNA leading the recruitment of immune cells to the infection sites. Therefore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR9 could influence the increased susceptibility to many diseases, for example, cervical cancer. This study aimed to identify non-synonymous SNPs (nsSNPs) with potential correlation with HPV infection, also evaluating structural and functional effects caused by these mutations in TLR9 through computational analysis. Evaluation of 5 nsSNPs in TLR9 was performed by PCR-RFLP in cervical samples of 57 patients treated in the Family Health Units (SUS, Olinda - PE). To determine how nsSNPs may affect the molecular structure and function of TLR9, a computational analysis was performed, and only nsSNPs with of hydrophobicity variation degree equal or greater than 50% were used for predictive analysis of structural and functional effect through 16 algorithms. The PCR-RFLP test for 7021T> G (Met85Arg), 7191G> A (Glu115Gln), 7351C> T (Ala168Val), 7986G> T (Asp380Tyr), 8159G>T (Met347Ile) was determined through by bioinformatics approaches. Molecular analysis showed that T allele of TR9 8159G> T may be associated with cervical lesions ($p=0.0005$). Regarding the computational prediction, 18 nsSNPs were found with high functional/structural impact for TLR9, 12 nsSNPs located in pathogen recognition region. Through our study, we found polymorphisms that may have high correlation with diseases caused by pathogens, according to the prediction of structural and functional impacts through deleterious polymorphism not synonymous in TLR9 molecule.

Keys words: Cancer of the cervix, Toll-like Receptor 9, single nucleotide polymorphisms

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Imagem dos diferentes graus de lesões cervicais observadas através do exame de colposcopia.....	15
Figura 2 - Representação esquemática do processo de transformação maligna das células infectadas pelo HPV.....	17
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do HPV 16.....	18
Figura 4 - Representação esquemática dos Receptores Toll-Like.....	21
Figura 5 - Representação esquemática do Receptor Toll-Like 9 e seus domínios.....	22
Figura 6 – Desenho esquemático da via de sinalização do receptor TLR9.....	23

Manuscrito 1

Figura 1 - Workflow of dataset construction.....	47
Figura 2 - Domain distribution of selected polymorphisms.....	48

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1- Distribuição dos tipos de cânceres estimados para 2016 e 2017 em mulheres. 14

Manuscrito 1

Tabela 1- List of algorithms used to analyze mutations. 46

Tabela 2- Binary system score..... 47

Manuscrito 2

Tabela 1- Socio-demographic and clinical profile of 57 patients enrolled in the study..... 63

Tabela 2- TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles according to the cytopathology findings 65

Tabela 3- TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles according to the presence of HPV-DNA in cervical samples 66

Tabela 4- TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles according to the HPV genotyping 67

Tabela 5- TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles according to the presence of bacterial vaginosis (BV) 68

LISTA DE ABREVIACÕES

CC - Câncer cervical

CpG- Ilhas Citosina-fosfodiéster-Guanina

E- Gene que codifica proteína Early ou imediata

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV- Papilomavirus Humano

HR-HPV- HPV of High Risk

IL-6- Interleucina 6

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IRAK1- Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1

IRAK4- Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-4

L- Gene que codifica proteína Late ou tardia

LCR- Longa Região de Controle

LR-HPV- HPV de Low Risk

Lrrs- repetições ricas em Leucina

MyD88- Gene de resposta primária de Diferenciação Mieloide 88

NF-κB-Fator Nuclear Kappa B

NIC- Neoplasia Intraepitelial Cervical

NK- Natural Killer

OMS- Organização Mundial de Saúde

ORF- Open Reading Frame (quadro de leitura aberta)

ORI- Origem de replicação

PAMPs- Padrões Moleculares Associados a Patógenos

p53- Proteína 53, supressora de tumor

pRb- Proteína do Retinoblastoma

PRR- Receptores de Reconhecimento de Padrão

RF- Random Forest

SNP- Single nucleotide polymorphisms (Polimorfismo de nucleotídeo único)

SVM- Support Vector Machine

TIR- Receptor Toll de Interleucina-1

TLRs- Receptores do tipo Toll-Like

TLR9- Receptores Toll-Like 9

TNF- Fator de necrose tumoral

TRAF6-Fator de necrose tumoral associado ao fator 6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Câncer Cervical	14
2.2 Infecção pelo Papilomavirus humano	16
2.2.1 Papilomavirus humano (HPV)	17
2.3 Sistema imune	20
2.3.1 Receptor Toll-Like	20
2.3.2 Receptor Toll-Like 9	21
2.4 Bioinformática.....	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
5. MANUSCRIPT 1: COMPUTATIONAL ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL AND STRUCTURAL IMPACT OF NONSYNONYMOUS SNPS IN RECEPTOR TOLL-LIKE 9	31
6. MANUSCRIPT 2: POLYMORPHISMS IN TOLL-LIKE RECEPTOR 9 AND LESION CERVICAL BY HUMAN PAPILOMAVIRUS (HPV)	49
7. CONCLUSÃO	70
8. ANEXOS	71
8.1 Lista de aminoácidos	71
8.2 Questionário padronizado para obtenção de informações sócio demográficas, comportamentais e clínicas	72
8.3 Termo de consentimento livre e esclarecido	79
8.4 Aprovação do comitê de ética em pesquisa	81

1.INTRODUÇÃO

De acordo com o instituto nacional de câncer (2015), estima-se que a incidência de câncer no Brasil seja de aproximadamente 596 mil novos casos para os anos de 2016 e 2017, e que o número de mortes alcançará, em média, o número de 190 mil por ano. Devido a este crescente número de casos e ao alto impacto socioeconômico ocasionado, além de ser um grave problema de saúde pública mundial, o câncer é considerado a segunda principal causa de morte mundial, tendo como principais fatores de risco, tabagismo, radiação, alcoolismo, obesidade, comportamento sexual e infecção.

O câncer do colo do útero está dentre os principais tipos de câncer de maior incidência no mundo, sendo considerado o terceiro tumor maligno mais comum entre as mulheres. O desenvolvimento dessa doença está associado a diversos fatores, como, por exemplo, a infecção ocasionada pelo Papilomavirus humano (HPV), porém nem todas as mulheres infectadas pelo vírus desenvolvem a neoplasia cervical, atribuindo a responsabilidade a outros fatores de risco (Mu *et al.*, 2015).

Caracterizada como uma doença sexualmente transmissível, a infecção pelo HPV ocorre principalmente pela atuação dos vírus HPV-16 e HPV-18. Durante a relação sexual, o epitélio vaginal pode sofrer lesões que o tornem vulnerável à infecção. Desta forma, o HPV entra na célula, expressa proteínas que desregulam o ciclo celular, amplificam o genoma viral em inúmeras cópias, e evolui de modo gradativo para o câncer do colo do útero (Rodrigues; Sousa, 2015).

Embora esse tipo de infecção esteja intimamente associado à atividade sexual, a alta incidência das lesões cervicais pode estar relacionada a uma deficiência na resposta imune, pois as células infectadas pelo HPV não apresentam respostas eficientes aos antígenos imunogênicos, proporcionando atraso no seu reconhecimento pelo sistema imune (Monte; Peixoto, 2010, p.131-139).

A resposta imune inata funciona como a primeira linha de defesa contra a maioria dos agentes patogênicos, sendo um mecanismo importante no controle da infecção por HPV. Presume-se que a ocorrência desse processo infeccioso induz reações imunológicas de células como, os linfócitos T CD4, T CD8, macrófagos e células dendríticas, responsáveis por ativar a expressão genes que produzem citocinas pró-

inflamatórias, como interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF) e interferons (IFN) (Scott *et al.*, 2013).

Os receptores Toll-like (TLRs) tem um importante papel na imunidade inata, pois são proteínas transmembranas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela geração de sinais que produzem citocinas pró-inflamatórias, ativando os sistemas de imunidade inata. Os receptores Toll-like estão presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos, sendo responsáveis pelo reconhecimento de moléculas expressas por agentes infecciosos, como bactérias, fungos e vírus. Em humanos já foram identificados e classificados dez TLRs (TLR1-10). O TLR9, encontrado em endossomos, atua no reconhecimento do DNA bacteriano e viral conduzindo o recrutamento de células imunológicas para os sítios da infecção (Hall; Agrawal, 2016).

De acordo com alguns estudos, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), variações genéticas mais comuns no genoma humano, em TLR9 podem mudar a expressão gênica desse receptor, influenciando no aumento da susceptibilidade a diversas doenças, como, por exemplo, a câncer cervical (Zidi *et al.*, 2015).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo identificar polimorfismos não sinônimos com potencial correlação com a infecção por HPV, assim como avaliar efeitos estruturais e funcionais ocasionados por essas mutações no receptor através de ferramentas computacionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer Cervical

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que a incidência de câncer seja de 27 milhões de casos em 2030 e que o número de mortes ocasionadas por essa doença alcançará, em média, o número de 17 milhões por ano. O câncer do colo do útero, também conhecido como câncer cervical, está dentre os principais tipos de cânceres existentes no mundo, sendo considerado, atualmente, o terceiro tipo de tumor que mais acomete a população feminina no Brasil. Aproximadamente 596 mil novos casos de câncer seria o número estimado para os anos de 2016 e 2017 na população Brasileira, sendo de 16.340 o número de novos casos correspondentes a incidência de câncer de colo do útero (**Tabela 1**) (INCA, 2015).

Tabela 1: Distribuição proporcional dos tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2016 e 2017 em mulheres. Fonte: INCA, 2015.

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%

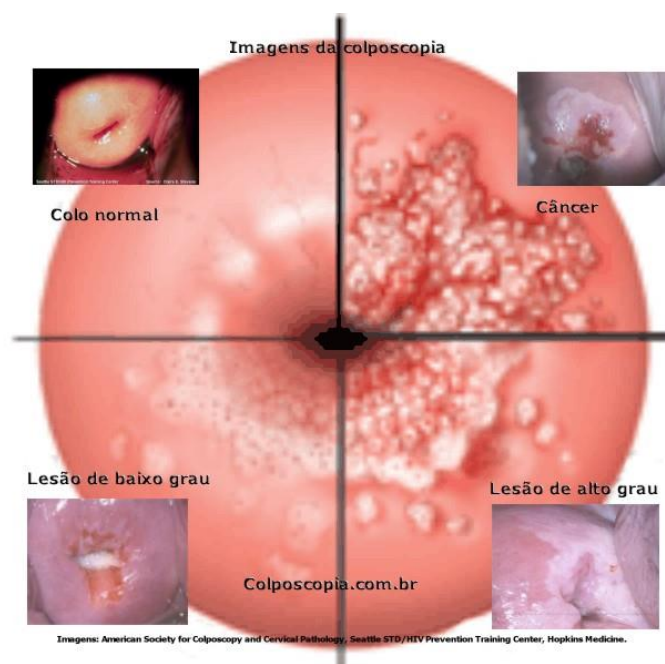


O câncer cervical (CC) é uma doença que progride lentamente por anos e manifesta-se de modo assintomático em sua fase pré-clínica, iniciando em células que revestem o colo do útero através de transformações intraepiteliais progressivas. Durante a fase inicial da doença possíveis lesões podem ser detectadas através de exames

preventivo, e os principais sintomas nessa fase são sangramento vaginal, durante ou após a relação sexual, secreção vaginal e dor (Rocha; Santos; Cunha, 2014). Estas transformações intraepiteliais apresentam duração média de 10 a 20 anos, fazendo que a doença evolua de um estado inicialmente benigno para um carcinoma invasor. Pelo tempo necessário para seu desenvolvimento, o carcinoma cervical é considerado raro em mulheres com idade inferior a 30 anos, atingindo seu pico de incidência em mulheres que encontram-se na faixa etária de 45 a 50 anos (Silva *et al.*, 2014).

O Carcinoma de células escamosas é o tipo mais comum de câncer cervical, seguido pelo adenocarcinoma, e a infecção ocasionada pelo Papilomavirus Humano (HPV), um vírus que apresenta tropismo por células epiteliais, tem sido o principal fator para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais que podem ser precursoras do cancro uterino. Esse tipo de alteração em células escamosas do útero é classificado como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de graus I, lesão considerada de baixo grau, II e III, lesões intraepiteliais de alto grau (**Figura 1**) (Tao *et al.*, 2014, p.1185).

Figura 1: Imagem dos diferentes graus de lesões cervicais observadas através do exame de colposcopia. Fonte: American society colposcopy and cervical pathology, Seattle STD/HIV prevention training center, Hopkins Medicine. Disponível em: <http://www.hpvonline.com.br/sobre-hpv/hpv-e-cancer/hpv-e-cancer-do-colo-uterino/>

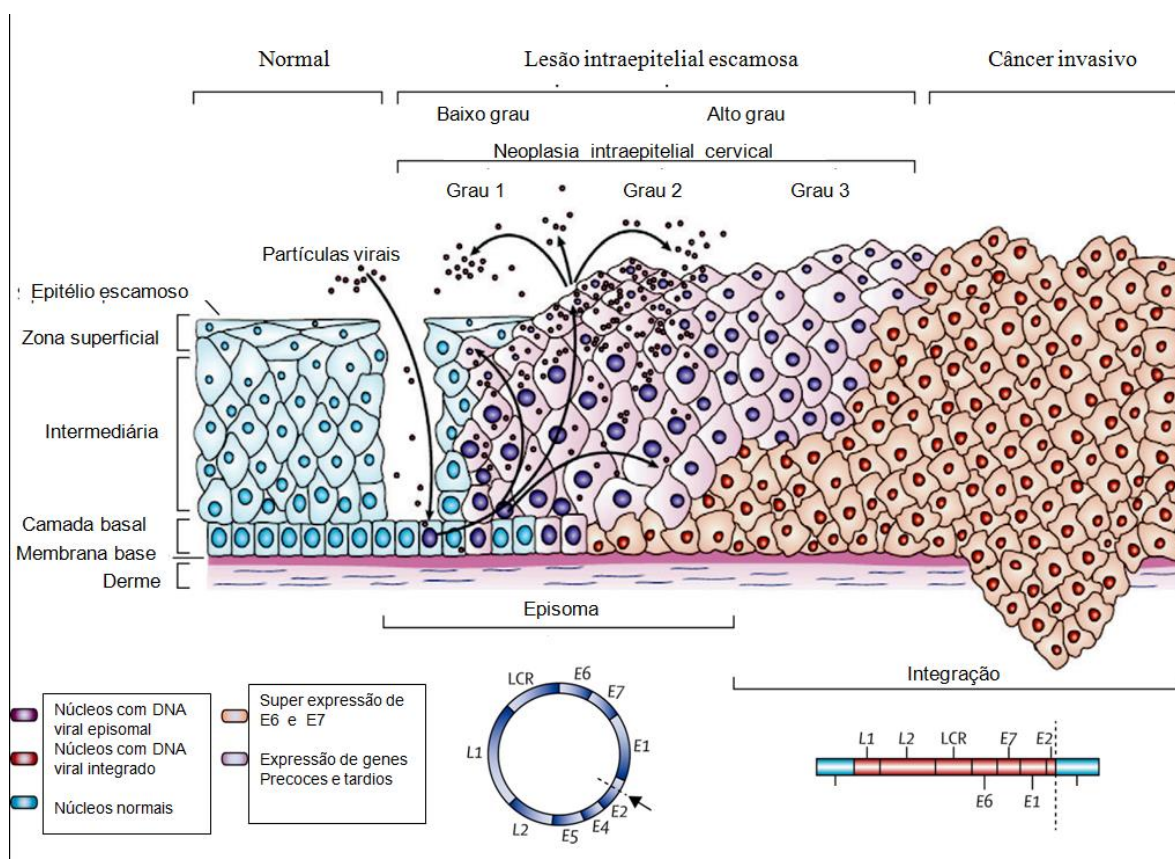


2.2 Infecção pelo Papilomavirus humano

Em 1980 o HPV foi descrito por Harald Zur Hausen como o agente infeccioso causador do câncer cervical, descoberta de extrema importância que resultou no desenvolvimento de vacinas eficazes para a prevenção da infecção ocasionada pelo vírus. Atualmente praticamente todos os casos de câncer cervical descritos estão associados a infecção pelo HPV e aproximadamente 200 genótipos foram caracterizados (Lowy, 2016).

O HPV é um vírus sexualmente transmissível, que atinge homens e mulheres, e apresenta tropismo específico por células epiteliais. Para realizar seu ciclo de vida, o vírus necessita da via de diferenciação de células epiteliais, replicando-se no núcleo de células epiteliais escamosas da camada basal e parabasal (pele e mucosas) (Rodrigues; Sousa, 2015). Através de microabrasões na superfície epitelial, o vírus infecta células presentes na camada basal do epitélio, ligando-se a receptores celulares, proteínas que reconhecem o vírus e o deixam entrar na célula por endocitose. Essa interiorização do vírus dura várias horas, após esse processo, dentro da célula, o capsídeo desorganiza-se e o DNA viral é liberado e transportado para dentro do núcleo celular onde genes precoces do vírus são expressos e o DNA viral replica-se de forma episossomal, quando o DNA viral permanece no núcleo em sua forma circular, ou através da integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, quando o DNA viral assume a forma linear, resultando na ruptura e perda de função do gene E2 onde ocorre a ruptura do DNA viral **(Figura 2)** (Crosbie *et al.*, 2013).

Figura 2: Representação esquemática do processo de transformação maligna das células infectadas pelo HPV e sua associação com a progressão das lesões cervicais. Integração do genoma do HPV em cromossomos do hospedeiro (núcleos em vermelho), com perda associada ou interrupção de E2 e subsequente expressão das oncogenes E6 e E7. Fonte: Adaptada de Crosbie *et al.*, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673613600227>



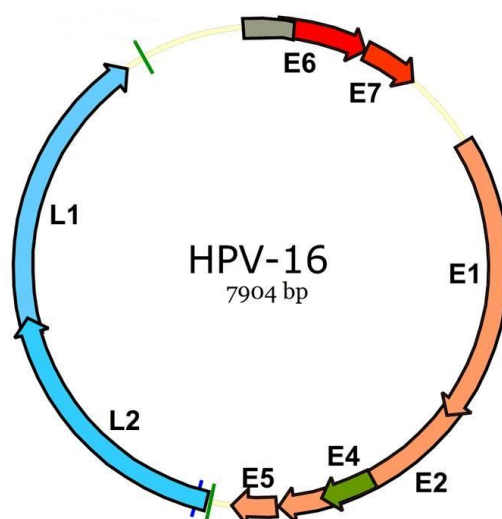
2.2.1 Papilomavirus humano (HPV)

Pertencente à família *Papillomaviridae*, o Papilomavirus humano, é composto por DNA circular de fita dupla, com aproximadamente 8000 pares de bases, com diâmetro de cerca de 55 nanômetros. O HPV possui capsídeo icosaédrico não revestido por envelope lipídico (Rodrigues; Sousa, 2015).

O genoma do Papilomavirus humano é dividido em uma região controladora (LCR- long control region), composta pela origem de replicação (ORI) e por

promotores de transcrição, e uma região codificadora denominada ORF (open reading frame), composta pelos genes de transcrição precoce (E- Early Region), os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, importantes para replicação viral e para transformação celular, e pelos genes de transcrição tardia (L- Late Region), genes L1 e L2, responsáveis pela formação do capsídeo viral (**Figura 3**).

Figura 3: Representação esquemática do genoma do HPV 16. Fonte: Adaptada de Oliveira,2014.Disponível em: <http://ddcnovasperspectivas.blogspot.com.br/2014/12/hpv-v-virus-dopapiloma-humano-hpv-virus.html>



Genes E são expressos imediatamente após a infecção, sendo responsáveis pela codificação de proteínas associadas à indução e regulação da produção do DNA do vírus. A região codificadora do gene E1 produz uma fosfoproteína, helicase que participa da replicação do DNA viral, e a proteína E1 forma com a proteína E2 o complexo E1-E2, importante para os processos de replicação e controle da transcrição dos genes virais (Rodrigues; Sousa, 2015). As proteínas codificadas pelos genes E5, E6 e E7 são conhecidas como oncoproteínas virais, por serem associadas ao surgimento de tumores benignos e malignos. A proteína E5 atua durante a infecção precoce estimulando a proliferação celular, enquanto que as proteínas E6 e E7 inativam respectivamente as proteínas p53 e pRb (Proteína do retinoblastoma), proteínas codificadas através de genes supressores de tumor e responsáveis por efeitos inibitórios na proliferação e transformação celular, modulando atividades que exercem controle sobre o ciclo celular (de Lima; da Silva; Rabenhorst, 2013).

Genes tardios L1 e L2, expressos em células escamosas superficiais, atuam na formação dos capsídeos virais, caracterizando a infecção. A proteína L1 é caracterizada como elemento estrutural primário do capsídeo, e representa um dos principais alvos para a atuação da resposta imune, e a proteína L2 participa do processo de montagem e embalagem do DNA viral (Yemelyanova *et al.*, 2013).

Baseado em evidências epidemiológicas os tipos de HPV que infectam a mucosa genital classificam-se em dois grupos, HPV de baixo risco (LR-HPV) e HPV de alto risco (HR-HPV). Dentre os LR-HPV estão 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81, associados ao desenvolvimento de lesões benignas, e os HR-HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, associados à processos carcinogênicos, porém as infecções ocasionadas por ambos (HR-HPV e LR-HPV) podem induzir lesões benignas, pré-malignas ou malignas (Lorenzi; Syrjänen; Longatto-Filho, 2015). Dentre os principais tipos de HPV de alto risco os HPV 16 e 18 são conhecidos pela sua prevalência em lesões intraepiteliais cervicais e carcinomas cervicais (Hammer *et al.*, 2016).

Por longos períodos o HPV de alto risco desenvolveu mecanismos que retardam sua detecção pelo sistema imunológico, fazendo com que o desenvolvimento de lesões não ocorra apenas por causa da desregulação do controle do ciclo celular (Crosbie *et al.*, 2013). Alterações celulares ocasionadas pelo HPV provocam o surgimento de lesões cutâneas, conhecidas como verrugas cutâneas, que são as manifestações clínicas mais comuns e características da infecção pelo HPV, e lesões mucosas, cuja manifestação mais comum é conhecida como verruga anogenital ou condiloma acuminado (lesões tipo “couve-flor”). Dentre as principais lesões mucosas malignas está o câncer cervical, sendo a infecção por HPV o principal fator precursor na evolução desta neoplasia (Leto *et al.*, 2011), embora cofatores como tabagismo, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e predisposição genética possam influenciar na aquisição do HPV, possam aumentar a persistência do vírus e aumentar o risco da progressão da infecção a lesões precursoras e câncer cervical (Teles; Alves; Ferrari, 2013).

2.3 Sistema Imune

A imunidade inata funciona como primeiro mecanismo de defesa do organismo na atuação contra agentes infecciosos, tais como bactérias, fungos e vírus, sendo este mecanismo primordial para a consequente ativação da imunidade adaptativa. A detecção de microorganismos invasores é mediada através de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR), presentes em células fagocitárias, células dendríticas e células NK (Natural Killer), reconhecem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (Cao, 2015). Dentre os mais característicos PRRs estão os Receptores do tipo Toll Like (TLRs), proteínas transmembranares do tipo I, responsáveis pelo reconhecimento estruturas moleculares encontradas em diversos microorganismos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus, e pela geração de sinais que produzem citocinas pró-inflamatórias, ativando o sistema de imunidade inata através da indução de genes (Mu *et al.*, 2015).

2.3.1 Receptores Toll-Like

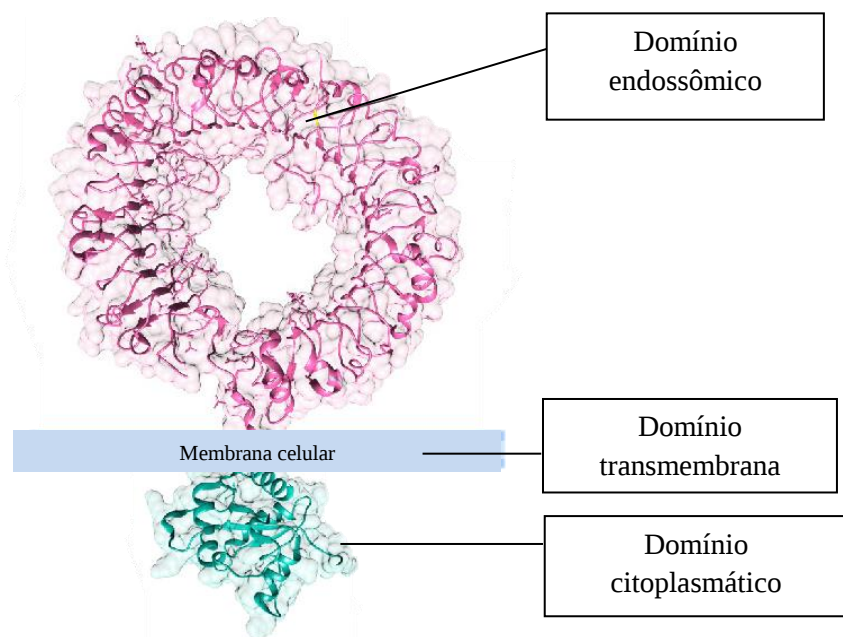
Em humanos, foram identificadas dez TLRs, presentes em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, todos eles são sintetizados no retículo endoplasmático e de acordo com o local onde estão presentes classificam-se em duas subfamílias, os TLRs de superfície celular, incluindo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, e TLR10, e os TLRs intracelulares, localizados no endossomo como, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 (**Figura 4**).

Os TLRs expressos na superfície celular são responsáveis pelo reconhecimento de componentes da membrana microbiana como, lipídios, lipoproteínas e proteínas, enquanto os TLRs intracelulares atuam no reconhecimento de ácidos nucleicos provenientes de bactérias e vírus (Hall; Agrawal, 2015).

adaptativa, ativando linfócitos Th1, células NK e linfócitos TCD8 (Pandey; Kwai; Akira, 2015).

O Receptor Toll-Like 9 é uma proteína composta por 1032 aminoácidos, cujo o gene encontra-se no braço curto do cromossomo 3 (3p21.3) e possui dois éxons (Chen *et al.*, 2015). Assim como todos os outros receptores Toll-like, o TLR9 é caracterizado por possuir um domínio extracelular, composto por repetições ricas em Leucina (Lrrs). Porém, se tratando de um receptor endossomal, este domínio também pode ser conhecido como domínio endossômico, além de possuir um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática composta por uma região conservada conhecida como, domínio Receptor Toll de Interleucina-1 (TIR) (**Figura 5**) (Kawasaki; Kawai, 2014, p.461).

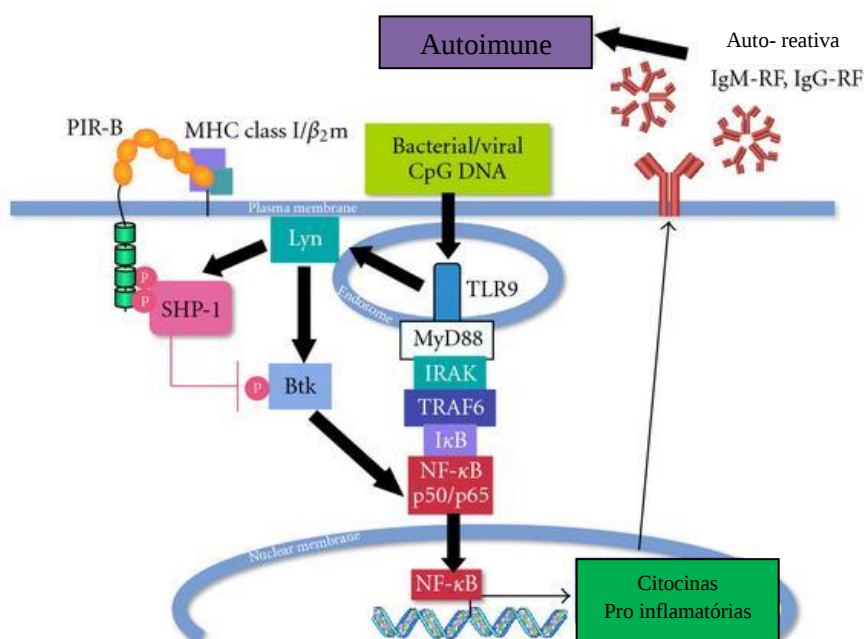
Figura 5: Representação esquemática do Receptor toll-like 9 e seus domínios. Disponível em: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=111



A ligação entre o DNA patogênico (bactérias e vírus) e o TLR9 promove uma dimerização que recruta proteínas adaptadoras também compostas pelo domínio TIR como, por exemplo, o gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88). A associação entre os domínios TIR presentes no TLR9 e na proteína MyD88 torna-se o componente inicial da via de sinalização. Após o acoplamento ao TLR9 a proteína MyD88 forma um complexo com a quinase Associada ao Receptor de Interleucina-4 (IRAK4), e essa por sua vez fosforila a quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1 (IRAK1) que juntamente ao receptor TNF associado ao fator 6 (TRAF6) dissocia-se do receptor. O TRAF6 interage com o complexo de proteína quinase (TAK1) ativando-a para fosforilar o complexo I κ B quinase (IKK), liberando o fator nuclear kappa B (NF- κ B) que transloca ao núcleo e ativa a expressão de genes que codificam citocinas como por exemplo a interleucina 6 (IL-6), IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF), importantes para a resposta inflamatória (**Figura 6**) (Chen *et al.*, 2015).

A liberação de citocinas como, interleucinas (IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas e interferons (IFN), levam ao processo inflamatório através do recrutamento de agentes atuantes da imunidade adquirida como, os linfócitos T CD4, T CD8, macrófagos e células dendríticas. As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares que influenciam a atividade, a diferenciação e a proliferação de células imunológicas, além de atuar na regulação da produção e atividade de outras citocinas como, por exemplo, IL-6, glicoproteína regulada pela IL-1 juntamente com o TNF α . Secretada por diversos tipos de células, como macrófagos, monócitos e hepatócitos, a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que funciona como importante promotor da maturação e ativação de células fagocitárias e da diferenciação e manutenção de linfócitos T e de células Natural Killers (NK) (Oliveira *et al.*, 2011). De acordo com alguns estudos, o aumento da expressão de IL-6 é incentivado através do aumento da expressão dos genes E6 e E7 do HPV, cujo grau de expressão está diretamente relacionado ao grau de lesão cervical (Hsiao *et al.*, 2013).

Figura 6: Imagem da via de sinalização do receptor TLR9. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/275302/fig1/>



Por desempenhar um papel fundamental na resposta imunológica, detectando moléculas associadas a agentes invasores, alguns estudos acreditam que a existência de variações alélicas pode mudar a expressão gênica do TLR9, ocasionando uma deficiência no sistema imune (Roszak *et al.*, 2012, p. 8425-8430). Atualmente diversos estudos sugerem que polimorfismos existentes em TLR9 estão associados a alguns tipos de câncer como, por exemplo, o carcinoma cervical.

Segundo Mu *et al.*, (2015) o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP-Single nucleotide polymorphisms) heterozigoto 1486T>C (rs187084) apresentou associação ao aumento significativo do risco de cancro do colo do útero. De acordo com alguns estudos, o SNP 2848G>A (rs352140) presente no TLR9 mostrou possível associação significativa ao aumento da suscetibilidade da infecção pelo HPV16 em mulheres com câncer cervical em mulheres chinesas (Zhen *et al.*, 2013, p. 1027-1036). No entanto não se observou como essas mutações podem alterar a estrutura da molécula, comprometendo o seu funcionamento.

2.4 Bioinformática

Os SNPs representam uma grande parcela de variações no material genético, estimando-se que cerca de 93% dos genes humanos apresentem pelo menos um SNP. SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou não codificadoras de proteínas. Dentre os polimorfismos presentes em regiões codificantes do gene, existem os SNPs sinônimos, SNPs que não alteram a sequência de aminoácidos da proteína produzida, e não sinônimos responsáveis por ocasionar alteração na sequência de aminoácidos (Zhang *et al.*, 2011).

SNPs não-sinônimos (nsSNPs) podem afetar a estabilidade da estrutura protéica que pode ser prejudicial ao funcionamento da molécula, interrompendo a interface de interação proteína-molécula. Atualmente diversos métodos computacionais, ferramentas de bioinformática, são utilizados para analisar, através da visualização da influência genotípica sobre o fenótipo, impactos estruturais e funcionais ocasionados por nsSNPs, prevendo se essas mutações podem ou não influenciar no desenvolvimento de doenças (Doss *et al.*, 2013).

Uma das principais ferramentas de bioinformática utilizada são os algoritmos, programas que permitem análise de grandes quantidades de dados de sequenciamento, oferecendo suporte para validação experimental de alelos associados a doenças em um curto espaço de tempo e de modo econômico. Os algoritmos utilizam diferentes parâmetros, como, por exemplo, a conservação da sequência única dos aminoácidos presentes no gene, através de alinhamentos de múltiplas sequências de genes homólogos em espécies diferentes, e características estruturais, que podem levar a alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas (Kumar *et al.*, 2014). Para processamento dos resultados a maioria dessas ferramentas necessita de informações prévias, como, por exemplo, substituições de aminoácidos. Além disso, alguns algoritmos baseiam-se em cálculos matemáticos que comparam nsSNPs com bancos de dados que contêm polimorfismos com efeitos deletérios, como, *support vector machine* (SVM) e Random Forest (RF) (Frousios *et al.*, 2013, p.223-228).

Diversos algoritmos de predição têm sido utilizados para avaliar o impacto de nsSNPs sobre a estabilidade protéica, sendo de fundamental importância para a compreensão dos efeitos de mutações sobre o genoma (Fariselli *et al.*, 2015). De acordo com alguns estudos essas ferramentas contribuem para a predição preliminar de

impactos estruturais avaliando a sua associação com impactos funcionais, podendo prever efeitos de modo individual como fazem os principais algoritmos descritos na literatura (Frousios, 2013, p.223-228), ou ainda através da combinação de múltiplos métodos, como modelos preditivos combinados (Li *et al.*, 2013).

Com base na importância de associar resultados obtidos através de análises computacionais com informações já existentes a respeito de doenças, o fornecimento de resultados preliminares tem como grande vantagem, além da vantagem econômica, a disponibilização de uma enorme quantidade de dados ao mesmo tempo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAO, X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, 2015.
- CHEN, Z. et al. Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis, **BMC Pulm. Med**, v. 15, n. 57, 2015.
- CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer, **Lancet**, v.382, p. 889–899, 2013.
- DE LIMA, M. A. P.; DA SILVA, C. G. L.; RABENHORST, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavirus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.59, n.4, p.565–573, 2013.
- DOSS, C. G. P. et al. Extrapolating the effect of deleterious nsSNPs in the binding adaptability of flavopiridol with CDK7 protein: a molecular dynamics approach. **Hum. Genomics**, v. 7, 2013.
- FARISELLI, P. et al. Structural bioinformatics INPS : predicting the impact of non-synonymous variations on protein stability from sequence. **Bioinformatics**, p.1-6, 2015.
- FROUSIOS, K. et al. Predicting the functional consequences of non-synonymous DNA sequence variants — evaluation of bioinformatics tools and development of a consensus strategy. **Genomics**, v. 102, p. 223-228, 2013.
- HALL, S.C.; AGRAWAL, D.K. Toll-like receptors, triggering receptor expressed on myeloid cells family members and receptor for advanced glycation end-products in allergic airway inflammation. **Expert Rev. Respir. Med**, v.10, p. 171–184, 2015.
- HAMMER, A. et al. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v.0, p. 1–9, 2016.
- HSIAO, Y. P. et al. E6 and E7 of human Papillomavirus type 18 and UVB irradiation corporately regulate interleukin-6 and interleukin-8 expressions in basal cell carcinoma. **Exp dermatol**, v. 22, n. 10, p. 672-674, 2013.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2016-2017 Incidência de Câncer no Brasil, 2015.

- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, p. 461 5 September, 2014.
- KUMAR, A. et al. Computational SNP Analysis: Current Approaches and Future Prospects. **Cell Biochem Biophys**, v. 68, p. 233-239, 2014.
- LETO, M. G. P. et al. Infecção pelo Papilomavirus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n. 2, p. 306-17, 2011.
- LI, M-X. et al. Predicting Mendelian Disease-Causing Non-Synonymous Single Nucleotide Variants in Exome Sequencing Studies. **PLOS Genetics**, v.9, 2013.
- LORENZI, A.T.; SYRJÄNEN, K. J.; LONGATTO-FILHO, A. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. **Virology Journal**, v.12, n. 112, 2015.
- LOWY, D. R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. **Journal of Clinical Investigation**, v.126, n.1, p. 5-11, 2016.
- MU, X. et al. Gene Polymorphisms of Toll-Like Receptor 9 –1486T/C and 2848G/A in Cervical Cancer Risk. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.25, n.7, p.1173–1178, 2015.
- OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol*, v. 61, n.2, p. 255-265, 2011.
- PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v.7, 2015.
- ROCHA, J. M.; SANTOS, V. L. O.; CUNHA, K. J. B. câncer do colo do útero: desafios para o diagnóstico precoce. **Rev. Saúde em Foco**, v. 1, n. 2, p. 60-71, 2014.
- RODRIGUES, A.F.; SOUSA, J.A. Papilomavirus humano: prevenção e diagnóstico. p. 1-14, 2015.
- ROSZAK, A. et al. Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Molecular biology reports*, v. 39, n. 8, p. 8425-8430, 2012.
- SILVA, D. S. M. et al. Rastreamento do câncer do colo do útero no Estado do Maranhão, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.19, n.4, p.1163-1170, 2014

TAO, L. et al. Prevalence and risk factors for cervical neoplasia: a cervical cancer screening program in Beijing. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 1185, 2014.

TELES, C. C. G. D.; Alves, E. D.; Ferrari, R. Precursor lesions for cervical cancer and its risk factors: reflective study. **Journal of Nursing**, v.7, p. 5733-41, 2013.

YEMELYANOVA1, A. et al. Immunohistochemical detection of human papillomavirus capsid proteins L1 and L2 insquamous intraepithelial lesions: potential utility in diagnosis and management. **Modern Pathology**, v. 26, p. 268-274, 2013.

ZENG-ZHEN, L. et al. Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer. *Journal of International Medical*, v.41, n.4, p.1027–36, 2013.

ZIDI, S. et al. Evaluation of Toll-Like Receptors 2 / 3 / 4 / 9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Evolution. **Pathology & Oncology Research**, 2015.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar polimorfismos não sinônimos do receptor Toll-like 9 em amostras de lesão cervical relacionadas com Papilomavirus humano em mulheres atendidas pelo sistema público de saúde, assim como avaliar efeitos estruturais e funcionais ocasionados por essas mutações através de ferramentas computacionais.

4.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar através de ferramentas de bioinformática polimorfismos não sinônimos do gene TLR9 montando uma base de dados local para os achados de data mining;
- Avaliar a presença do DNA do HPV em amostras cervicais de mulheres portadoras de lesão cervical.
- Genotipar através do PapilloCheck® as amostras positivas para HPV de acordo com a amplificação por MY09/11 e/ou GP5+/6+;
- Correlacionar os dados laboratoriais e clínicos.

5. MANUSCRIPT 1: IN SILICO ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL AND STRUCTURAL IMPACT OF NONSYNONYMOUS SNPS IN TOLL-LIKE RECEPTOR 9

Manuscript to be submitted for publication in the journal BBA General Subjects

Impact factor: 4.381

Gisnayle Ana da Silva Pereira¹, Maria de Fátima Senra Cardoso¹, Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba¹, Carlos Henrique de Madeiros Castelletti^{1,2}, Nicodemos Pontes Telles³, Danyelly Bruneska Gondim Martins^{1,4}

¹Molecular Prospecting and Bioinformatics Group – ProspecMol; Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA; Federal University of Pernambuco

²Agronomic Institute of Pernambuco – IPA

³Pathology Department- Health Center – Federal University of Pernambuco

⁴Biochemistry Department – Biosciences Center – Federal University of Pernambuco

Correspondence: Gisnayle Ana da Silva Pereira

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

e-mail: gsilva@prospecmol.org

ABSTRACT

Background: Toll like receptor 9 (TLR9) is considered one of the most important pattern recognition receptors (PRRs), because it leads to the recruitment of immune cells to the infection sites through the recognition of CpG islands. There are evidence that single nucleotide polymorphisms (SNPs) on TLR9 gene may be associated with susceptibility to some diseases due to deficiency in the immune system. **Objective:** The aim of this study was to determine, through *in silico* tools, how nsSNPs can affect the molecular structure and function of TLR9. **Methods:** dbSNP database (NCBI) was consulted to list TLR9 nonsynonymous. The polymorphisms that generate a variation of hydrophobicity equal or greater than 50% were selected for analysis through 16 algorithms. Thirteen algorithms were part of dbNSFP v3.0 database and three individual algorithms (MUPRO, SNPs&GO e SNAP 2) were selected due to their particular characteristics. **Results:** Ninety-seven TLR9 nsSNPs were evaluated by algorithms. Of the 65 nsSNPs in endosomal region, 12 were predicted as deleterious which can be quite striking, once this region is responsible for the recognition of bacterial or viral DNA. Of the 28 in cytoplasmic region, four deleterious nsSNPs were predicted in Toll Receptor interleukin-1 domain (TIR), important to signaling pathway responsible for the production of proinflammatory cytokines. Only 3 nsSNPs in transmembrane domain were evaluated, but two nsSNPs were considered deleterious. **Conclusion:** the prediction of structural and functional impacts of TLR9 nsSNPs may have high correlation with diseases caused by pathogenic agents.

Keywords: TLR9, nonsynonymous polymorphism, algorithms.

INTRODUCTION

Innate immunity is a first defense mechanism of the organism acting against infectious agents, such as bacteria, fungi and viruses. This mechanism is essential for the subsequent activation of adaptive immunity, responsible for recognizing pathogens invading through lymphocytes [1]. There are cells responsible for mediate the innate immunity such as phagocytic cells, dendritic cells and NK cells, that recognize the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through pattern recognition receptors (PRR) [2]. Toll like receptors (TLRs), type I transmembrane proteins, are a characteristic PRR, that is responsible for recognition molecular structures found in various pathogens, as virus and bacteria. The activation of the TLRs produces proinflammatory cytokines, activating the innate immune system through gene induction [3].

In humans, it has been identified ten TLRs isoforms presents in macrophages, dendritic cells and neutrophils, they are classified according to the cellular localization into the subfamily of cell surface TLRs and the subfamily of intracellular TLRs located in the endosome. The six TLRs expressed on the cell surface (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) are responsible for recognizing components of the microbial membrane as lipids, lipoproteins and proteins. On the other hand, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 are intracellular and acts in the recognition nucleic acids from bacteria and viruses [4]. Among these, the TLR9 is considered one of the most important PRRs, because it leads to the recruitment of immune cells to the infection sites through the recognition of CpG islands (cytosine-guanine-phosphodiester). These islands are a characteristic of prokaryotic cells once it is 20x higher than in eukaryotic genomes, making this mechanism of recognition a key step in innate immunity [5].

The Toll-Like Receptor 9 is a protein composed of 1032 amino acids, whose gene is located on the short arm of chromosome 3 (3p21.3) and has two exons [6]. As all Toll like receptors, TLR9 is characterized by having an extracellular (endosomal) domain consisting of leucine-rich repeats (LRRs); a transmembrane domain and a cytoplasmic tail that consists of a conserved region known as Toll Receptor Interleukin-1 (TIR) domain [7]. Once the pathogen DNA is bounded to TLR9 endosomal domain, occurs the dimerization of the receptor which recruits adapter proteins as the myeloid differentiation primary response 88 (MyD88). After MyD88 interacts with TIR domain, it forms a complex with associated kinase Receptor Interleukin-4 (IRAK4), that phosphorylates Kinase Associated Receptor Interleukin-1 (IRAK1) that together with TNF receptor linked to factor 6 (TRAF6), dissociates from the TLR9. The TRAF6 interacts with protein kinase complex (TAK1) enabling it to phosphorylate IKB kinase complex (IKK), releasing the nuclear factor kappa B (NF- κ B), which translocate to the nucleus and activates the expression of genes encoding cytokines such IL-6, IL-1 and tumor necrosis factor (TNF), relevant to the inflammatory response [6].

TLR9 plays a critical role in detecting DNA from invading agents, being an important factor for correct immune response [8]. There are evidence that single nucleotide polymorphisms (SNPs) on TLR9 gene may be associated with susceptibility to some diseases due to deficiency in the immune system [9]. Some examples are systemic lupus erythematosus (SLE) [10], cervical cancer [3] and Tuberculosis [11].

A polymorphism that leads to amino acid change is defined as non-synonymous (nsSNPs). These kind of mutation can affect the stability of the protein structure, which may cause partial or total loss of molecule function [12]. *In silico* methods applying bioinformatics tools are used to predict structural and functional impacts caused by

nsSNPs and its association to disease development [13]. In this context, the use of algorithms allows the analysis of large amounts of biological data and are already a approach to assess the impact of nsSNPs on protein stability and/or function[14]. Thus, the aim of this study was to determine, through *in silico* tools, how snSNPs can affect the molecular structure and function of TLR9.

METHODOLOGY

Dataset construction

Data mining was performed using the dbSNP database (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), to identify SNPs in human TLR9 gene. nsSNPs were selected and submitted to an additional screening step according to hydrophobicity degree variation upon amino acid change. The polymorphisms that generate a variation of hydrophobicity equal or greater than 50% were selected for algorithms analysis.

Algoritm analysis

The **table 1** lists the algorithms employed to perform the mutations classification in deleterious or neutral variants. According to the value of threshold for each algorithm, the result was classified into a binary system: 1 was attributed to the result above the threshold, implying in deleterious effect; the result below the threshold was assumed as 0, implying neutrality. A total of 16 algorithms were employed, generating a maximum score in binary system of 16, considering 13 algorithms for functional prediction, one algorithm for structural prediction and two algorithms of functional and structural prediction. Of the 16 algorithms applied, 13 were part of dbNSFP v3.0 database, that predicts polymorphisms impact and records all possible nsSNP in the human genome, compiling forecasts from 13 algorithms of prediction and 7 of

conservation [15]. However, for this work proposal there were considered only the 13 algorithms listed and briefly described above: (1) **SIFT**, algorithm based on the conservation of alignment of multiple sequences (MSA) by sequence homology, to predict if nsSNPs affect protein function [16]; (2) **LRT**, a possibility ratio test that uses sequence homology to identify with precision deleterious nsSNPs [17]; (3) **MutationTaster**, evaluates the pathogenic potential of changes in the DNA sequence by detecting functional consequences [18]; (4) **Mutation Assessor** predicts the functional effects of amino acid substitutions based on evolutionary conservation [19]; (5) **FATHMM** (Functional Analysis through Hidden Markov Models), combines evolutionary conservation in homologous sequences with pathogenicity weights [20]; (6) **PROVEAN** (Effect Variation Protein Analyzer) analyzes the harmful effect of variations caused by nsSNPs based in conservation analysis (MSA) [21]; (7) **VEST 3** (Variant Effect Scoring Tool), prioritizes rare nsSNPs with probable involvement in human diseases and shows a good performance in identifying functional consequences of variations [22]; (8) **CADD** (Combined Annotation Dependent Depletion) has several notes of the genome and is able to analyze substitutions, insertions and deletions of nucleotides [23]; (9) **DANN** (Annotation of Deleterious Genetic Variants Using Neural Networks), performs functional analysis using neural networks [24]; (10) **fathmm** (Functional Analysis Hidden Markov Models v2.3) provides functional effects of nsSNPs through the combination of sequence conservation, also being able to predict non-coding mutations [25]; (11) **MetaSVM** and (12) **MetaLR**, are based on Support Vector Machine (SVM) and Logistic Regression (LR), respectively, to analyze functional impacts caused by mutations [15]; (13) **POLYPHEN2** (Polymorphism Phenotyping v2), evaluates the impact caused by substitution of amino acids in the protein structure and function, based on physical and evolutionary information [26].

Additionally to the algorithms from dbNSFP, there were selected three individual algorithms due to their particular characteristics: MUpro for structural prediction, SNPs&GO for functional prediction and SNAP2 for structural and functional impact prediction. (14) **MUpro** provides protein stability changes upon mutations using a set of programs based learning machines (SVM), and neural network, but just SVM output was considered based on authors recommendations [27]. (15) **SNPs&GO**, method based in Support Vector Machines (SVM) which provides mutations associated with disease and analyze proteins from input information such as sequence and / or tridimensional structure [28], (16) **SNAP 2** (Screening for Non-Acceptable polymorphisms) algorithm based on Neural Networks for predicting functional effects by using of standards evolutionary conservation for alignments of multiple sequence. This tool doesn't predict mutation like disease or not, but as a change of molecular function or not [29].

Whereas the highest score obtained by SNPs through the sum of algorithms was 13, we select nsSNPs whose effects are considered more susceptible to structural and functional impact on the protein. We separate the algorithms of functional prediction (13) of the algorithms of structural and functional prediction (3), setting a cut-off greater than 50%, selecting SNPs that showed score from 7 according to the functional algorithms and those with score from 2 according to the structural algorithms.

RESULTS

A total of 2479 polymorphisms were described in dbSNP for TLR9. Among these only 797 were from *Homo sapiens*. All 367 nsSNPs were analyzed for hydrophobicity changes, and only 97 nsSNPs were selected for further analysis. The distribution of the selected mutations in TLR9 protein domains showed 65 nsSNPs in endosome region, 3

in the transmembrane domain and 28 in cytoplasmatic region. The **figure 1** represents the workflow of dataset construction based on established methodology and the quantitative results obtained after each screening step.

Among 97 nsSNPs evaluated through algorithms only 18 were selected as the most deleterious according to the cut-off established for the binary system classification (**Table 2**). The molecular distribution of the polymorphisms in TLR9 structure allows the identification of mutations occurring in key sites to receptor function, and they are represented according to domain distribution in the **figure 2**.

There were selected 12 mutations occurring in LRRs. Arg216Cys (rs147453407) polymorphism, in LRR6, showed deleterious prediction in 9 of the 13 functional algorithms. The change of cysteine for the arginine involves the substitution of a basic amino acid whose degree of hydrophobicity is 0 by a neutral whose degree of hydrophobicity is 0.680. The Asn242Ile (rs774632252) polymorphism, in the LRR7 region, was also considered deleterious in 9 functional algorithms. The exchange of an asparagine to an isoleucine causes the substitution of a polar amino acid whose a degree of hydrophobicity corresponding to 0.236 to apolar amino acid of hydrophobicity degree 0.943.

In the region LRR8, Gly253Arg (rs746908600) was predicted as deleterious by algorithms 8 functional. The replacement of a glycine by a arginine implies in the change of a non-polar and neutral amino acid whose degree of hydrophobicity is 0.501 for a polar amino acid, basic whose degree of hydrophobicity is 0. In Region LRR9, Arg285Cys (rs753032218) and Arg305Cys (rs773233756) polymorphisms were also deleterious according to 8 functional algorithms.

In Region LRR13, there is Arg397Cys (rs199736549) polymorphism, considered deleterious by 7 functional algorithms. In region LRR14, there are two nsSNPs:

Asp421Val (rs764944818) considered deleterious for 7 functional algorithms as result of an exchange of an aspartic acid for a valine, causing the change of a polar amino acid, whose degree of hydrophobicity is 0.028 for nonpolar amino acid, neutral of degree of hydrophobicity 0.825; and Gly429Arg (rs561203848) polymorphisms, considered deleterious for 7 functional algorithms, a change of a nonpolar glycine to neutral arginine led to a variation of hydrophobicity from 0.501 to 0. In region LRR15, the Ser496Leu polymorphism (rs777140542), also considered deleterious in 7 functional algorithms, results in the change of one polar amino acid, whose degree of hydrophobicity is 0.359 to an apolar amino acid hydrophobicity degree 0.943. In LRR18, Arg575Cys (rs752229105) polymorphism was predicted as deleterious by 7 functional algorithms. In region LRR20, the Arg601Trp (rs200714733) polymorphism, deleterious by 7 functional algorithms, showed a dramatic change from polar arginine whose degree of hydrophobicity is 0, to the nonpolar tryptophan with degree of hydrophobicity 0.878.

In the transmembrane domain, Ser822Leu (rs770242862) and His836Tyr (rs758340283) polymorphisms were considered deleterious. In Ser822Leu mutation was considered deleterious for 10 functional algorithms. Results from the change of a serine, polar amino acid whose degree of hydrophobicity is 0.359 to a leucine, nonpolar amino acid, neutral whose degree of hydrophobicity is 0.943. In His836Tyr mutation, considered deleterious to 8 functional algorithms, occurs change of a histidine, polar amino acids, basic, whose degree of hydrophobicity is 0.165, to a tyrosine, nonpolar amino acid, neutral whose degree of hydrophobicity is 0.880.

According to our analysis, the 4 nsSNPs (Ser926Leu, Arg977Cys Ser991Ile and Arg1023Trp) are in the TIR domain. In mutation Ser926Leu (rs775545937), considered deleterious for 10 functional algorithms, occurs the change of a serine, polar amino acid

whose degree of hydrophobicity is 0.359, to a leucine, nonpolar amino acid, neutral whose degree of hydrophobicity 0.943. Arg977Cys (rs375003304) polymorphism is considered deleterious by 8 functional algorithms. In Ser991Ile (rs779252979) mutation, considered deleterious to 9 functional algorithms, occurs the change of a serine, polar amino acid whose degree of hydrophobicity is 0.359, with an isoleucine, nonpolar amino acid, neutral of degree of hydrophobicity 0.943. For Arg1023Trp (rs200896211) mutation, considered deleterious to 9 functional algorithms, occurs the change of a arginine, polar amino acids, basic whose degree of hydrophobicity is 0, by a tryptophan, nonpolar amino acid, neutral degree of hydrophobicity 0.878.

DISCUSSION

Several studies have described nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) in TLR9 gene as contributing factors to increased susceptibility to many diseases. The endosomal domain of TLR9 protein plays a critical role in the recognition of cytosine-phosphate-guanine (CpG) islands through the interaction between Regions Rich in Leucine (LRRs) and CpG-DNA pathogens (Ohto *et al.*, 2015). Through our selection of SNPs, whose deleterious result in protein proved to be quite high according to the algorithms, the stocks of nsSNPs, as Asn242Ile, Ala768Glu, Arg216Cys, Arg305Cys, Arg285Cys, Gly253Arg, Asp421Val, Ser496Leu, Arg575Cys, Arg601Trp, Arg397Cys and Gly429Arg in endosomal region, can be quite striking, because it is the region responsible for the recognition of bacterial or viral DNA and structural changes brought about by the exchange of amino acids in this region, can lead off on important sites for this recognition.

nsSNPs as Ser822Leu and His836Tyr, which were found in the transmembrane region of TLR9, may be considered important due to the membrane characteristics

which have polar and nonpolar regions where TLR9 residues lying in this region are responsible for stabilization the molecule. Then, a drastic variation in the degree of hydrophobicity of amino acids, caused by mutations that make this region may destabilize the molecule.

According to Chen *et al.*, 2015 [6], Toll Receptor interleukin-1 domain (TIR) present in TLR9 binds to this TIR domain in the adapter protein MyD88, initiating the signaling pathway responsible for the production of proinflammatory cytokines. According to our analysis, the 4 nsSNPs (Ser926Leu, Ser991Ile, Arg1023Trp and Arg977Cys) are located in this region and are considered extremely important because mutations in this region may reduce the recruitment of molecules responsible for activating genes that produce cytokines (NF- κ B), increasing the susceptibility of the individual to have diseases.

Other types of mutations were evaluated for TLR9 in different studies. Lee *et al.*, 2016 [8], suggests that the polymorphism -1486T>C (rs187084), located in TLR9 promoter region, is associated with development of systemic lupus erythematosus (SLE) in Asian populations. The polymorphism 4-44A>G rs352139, located in the intron region, is significantly associated with the risk of Tuberculosis (TB) in Mexican population [6]. According to a meta-analysis carried in China, the presence of the polymorphism -1237T>C (rs5743836), located in the upstream region, may be a risk factor in increased susceptibility to Inflammatory bowel diseases (IBDs) mainly in Caucasians [30]. Another study in chinese women shows that in cervical cancer patients the frequency of the polymorphism 2848G>A (rs352140), in the promoter region of TLR9 gene was significantly higher, but there is a lack of functional impact identification [31].

CONCLUSION

Through our study, we found polymorphisms that may have correlation with diseases caused by pathogenic agents, such as viruses and bacteria, according the prediction of structural and functional impacts through deleterious polymorphism in TLR9 molecule. These nsSNPs could alter the protein structure due to change in amino acid changes in the degree of hydrophobicity, and consequently inhibit the pathogen recognition function.

REFERÊNCIAS

- [1] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Control of adaptive immunity by the innate immune system, *Nat Immunol.* 16 (2015) 343–353.
- [2] X. Cao, Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2015) 35–50. doi:10.1038/nri.2015.8.
- [3] X. Mu, J. Zhao, X. Yuan, X. Zhao, K. Yao, Y. Liu, et al., Gene Polymorphisms of Toll-Like Receptor 9 –1486T/C and 2848G/A in Cervical Cancer Risk, *Int. J. Gynecol. Cancer.* 25 (2015) 1173–1178. doi:10.1097/IGC.0000000000000494.
- [4] S.C. Hall, D.K. Agrawal, Toll-like receptors, triggering receptor expressed on myeloid cells family members and receptor for advanced glycation end-products in allergic airway inflammation, *Expert Rev. Respir. Med.* 10 (2016) 171–184. doi:10.1586/17476348.2016.1133303.
- [5] S. Pandey, T. Kawai, S. Akira, Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a016246. doi:10.1101/cshperspect.a016246.

- [6] Z. Chen, W. Wang, J. Liang, J. Wang, S. Feng, G. Zhang, Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis, *BMC Pulm. Med.* 15 (2015) 57. doi:10.1186/s12890-015-0049-4.
- [7] T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways., *Front. Immunol.* 5 (2014) 461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- [8] Y.H. Lee, S.J. Choi, J.D. Ji, G.G. Song, Association between toll-like receptor polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update, *Lupus.* (2016) 1–9. doi:10.1177/0961203311422711.
- [9] K. Zhu, J. Teng, J. Zhao, H. Liu, A. Xie, Association of RAGE gene polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population, *Neurosci. Lett.* 559 (2014) 158–162. doi:10.1016/j.neulet.2013.11.038.
- [10] Q. Xi, Y. Liao, Y. Wu, L. Wang, Is there association between TLR9 polymorphism and SLE susceptibility?, *Mol. Immunol.* 66 (2015) 274–275. doi:10.1016/j.molimm.2015.03.252.
- [11] A.D. Graustein, D.J. Horne, M. Arentz, N.D. Bang, T.T.H. Chau, G.E. Thwaites, et al., TLR9 gene region polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Vietnam, *Tuberculosis.* 95 (2015) 190–196. doi:10.1016/j.tube.2014.12.009.
- [12] R. Vaser, S. Adusumalli, S.N. Leng, M. Sikic, P.C. Ng, SIFT missense predictions for genomes., *Nat. Protoc.* 11 (2016) 1–9. doi:10.1038/nprot.2015.123.
- [13] C. George Priya Doss, N. Nagasundaram, C. Chakraborty, L. Chen, H. Zhu, Extrapolating the effect of deleterious nsSNPs in the binding adaptability of flavopiridol with CDK7 protein: a molecular dynamics approach, *Hum. Genomics.* 7 (2013) 10. doi:10.1186/1479-7364-7-10.

- [14] P. Fariselli, P.L. Martelli, C. Savojardo, R. Casadio, Structural bioinformatics INPS : predicting the impact of non-synonymous variations on protein stability from sequence, (2015) 1–6. doi:10.1093/bioinformatics/btv291.
- [15] X. Liu, C. Wu, C. Li, E. Boerwinkle, dbNSFP v3 . 0 : A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Non-synonymous and Splice Site SNVs, (2015).
- [16] N. Sim, P. Kumar, J. Hu, S. Henikoff, G. Schneider, P.C. Ng, SIFT web server : predicting effects of amino acid substitutions on proteins, 40 (2012) 452–457. doi:10.1093/nar/gks539.
- [17] S. Chun, J.C. Fay, Identification of deleterious mutations within three human genomes, (2009) 1553–1561. doi:10.1101/gr.092619.109.2001.
- [18] J.M. Schwarz, D.N. Cooper, M. Schuelke, D. Seelow, MutationTaster2 : mutation prediction for the deep-sequencing age, Nat. Publ. Gr. 11 (2014) 361–362. doi:10.1038/nmeth.2890.
- [19] B. Reva, Y. Antipin, C. Sander, Predicting the functional impact of protein mutations : application to cancer genomics, (2011) 1–14. doi:10.1093/nar/gkr407.
- [20] H.A. Shihab, J. Gough, M. Mort, D.N. Cooper, I.N.M. Day, T.R. Gaunt, Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts, 8 (2014) 1–6. doi:10.1186/1479-7364-8-11.
- [21] Y. Choi, G.E. Sims, S. Murphy, J.R. Miller, A.P. Chan, Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels, 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0046688.
- [22] H. Carter, C. Douville, P.D. Stenson, D.N. Cooper, R. Karchin, Identifying Mendelian disease genes with the Variant Effect Scoring Tool, BMC Genomics. 14 (2013) S3. doi:10.1186/1471-2164-14-S3-S3.

- [23] M. Kircher, D.M. Witten, P. Jain, B.J. O’Roak, G.M. Cooper, J. Shendure, HHS Public Access, *Nat Genet.* 46 (2014) 310–315. doi:10.1038/ng.2892.A.
- [24] D. Quang, Y. Chen, X. Xie, DANN : a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants, (2014) 1–2.
- [25] H.A. Shihab, J. Gough, D.N. Cooper, P.D. Stenson, G.L.A. Barker, K.J. Edwards, et al., Predicting the Functional , Molecular , and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden, (2012). doi:10.1002/humu.22225.
- [26] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, et al., A method and server for predicting damaging missense mutations a, *Nat. Publ. Gr.* 7 (2010) 248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248.
- [27] J. Cheng, A. Randall, P. Baldi, Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines, 1132 (2006) 1125–1132. doi:10.1002/prot.20810.
- [28] E. Capriotti, R. Calabrese, P. Fariselli, P.L. Martelli, R.B. Altman, R. Casadio, WS-SNPs & GO : a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation, *BMC Genomics.* 14 (2013) S6. doi:10.1186/1471-2164-14-S3-S6.
- [29] M. Hecht, Y. Bromberg, B. Rost, Better prediction of functional effects for sequence variants, *BMC Genomics.* 16 (2015) S1. doi:10.1186/1471-2164-16-S8-S1.
- [30] J. Shang, X. Wang, W. Wang, H. Pan, S. Liu, L. Li, et al., Association between Toll-Like Receptor 9 -1237T / C Polymorphism and the Susceptibility of Inflammatory Bowel Diseases : A Meta-Analysis, 57 (2016) 153–164.
- [31] Z. Lai, X. Pan, gene polymorphisms associated with increased susceptibility of

human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer, 9 (2013).

doi:10.1177/0300060513483398.

Table 1: List of algorithms used to analyze mutations

Algorithm	Method	Analysis	Threshold	Pros and Cons
SIFT	Position specific scoring matrix	Functional	>0.05	Pros: Quoted from the main algorithms, simple input.
POLYPHEN 2	Naïve Bayes + Supervised machine-learning	Structural/ Functional	0.45833	Pros: Very quoted and Accepted//Cons: Humor has low accuracy, generating high false positive rate
LRT	Likelihood ratio test of codon neutrality	Functional	LR _{Tori} >0.001 e _{um} w>1	Pros: Commit all change once
Mutation Taster	Naïve bayes classifier	Functional	0.31709	Pros: Commit all changed once, accepted amino acid substitutions and insertions and deletions of nucleotide//Cons: You can not make local use
Mutation Assessor	Combinatorial entropy formalism	Functional	H (high)	Pros: Commit all change once// Cons: Does not have any degree of confidence in your results
FATHMM	Hidden markov models (HMMs)	Functional	0.81332	Pros: Simple Input, low index of false positive//Cons: constraints disk space
PROVEAN	Delta alignment score	Functional	> 0.542	Pros: Commit all change once, simple input
VEST 3	Random forest (RF)	Functional	> = 0.9	Pros: Prouses a statistical hypothesis testing framework to assign p-values to predictions
CADD	Support vector machine (SVM)	Functional	>= 20	Pros: Integrates several notes genome, analyzing substitutions, insertions and deletions of nucleotides
DANN	Neural network	Functional	>=0.95	Pros: Uses a neural network with several hidden layers of units between the input and output layers
fathmm	Multiple kernel learning	Functional	>0.28317	Pros: Local Algorithm high performance, providing for functional impact of coding and non-coding mutations.
MetaSVM	Radial kernel support vector machine	Functional	0.82268	Pros: Ensemble scores of highest discriminative power compared to other deleterious prediction scores.
MetaLR	Logistic regression	Functional	0.81113	Pros: Ensemble scores of highest discriminative power compared to other deleterious prediction scores.
Mupro	Support vector machine (SVM) e neural network	Structural	>-0.5	Pros: SVM is more precise than the Neural Network//Cons: Analysis of a mutation at a time
SNAP 2	Neural network	Structural/ Functional	>50	Pros: Output for all possible mutations, reliability score (0-9)
SNP&GO	Support vector machine (SVM)	Functional	>0.5; RI≥5	Pros: Highly specific and indicated to identify false positives//Cons: Low sensitivity

Figure 1: Pipeline of the computational analysis to determine the polymorphism that can be related to the misfunction of TLR9.

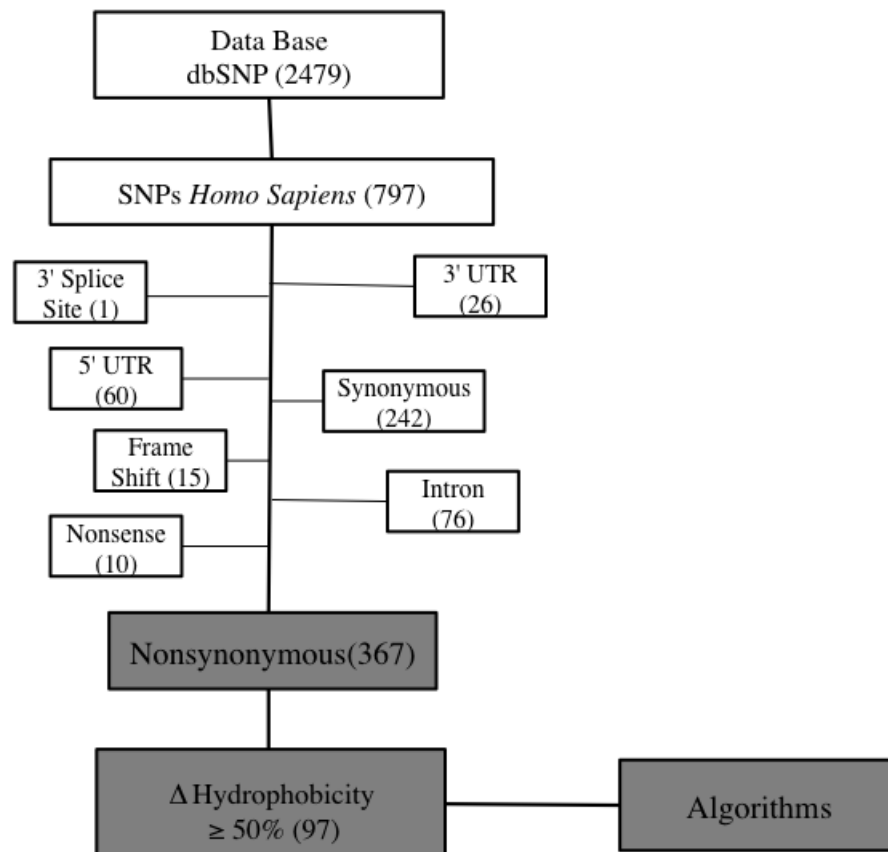
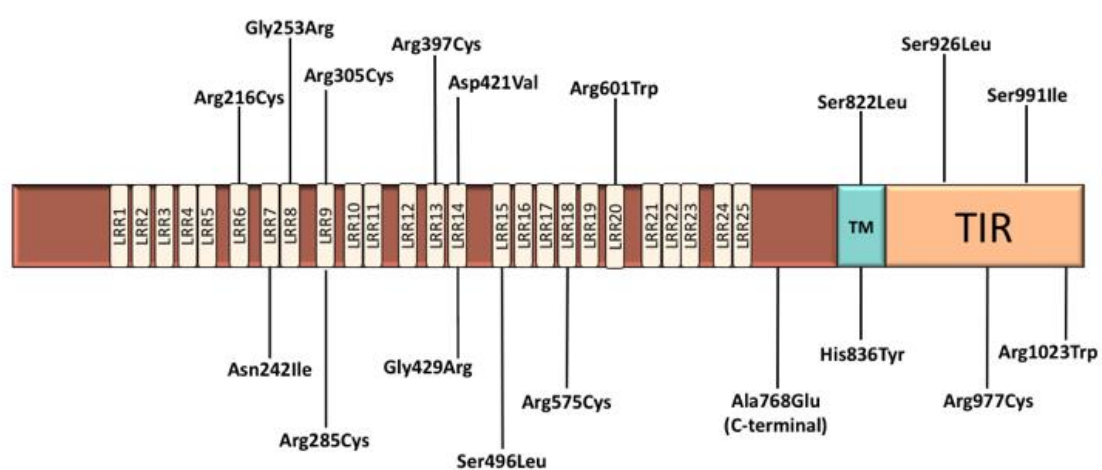


Tabela 2: Binary system score

ID	AA Change	Domain	SIFT	LRT	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	PROVEAN	VEST3	CADD	DANN	fathmm	Meta SVM	Meta LR	SNPs & GO	Polyphen2	MUpro	SNAP ₂	Total
rs147453407	Arg216Cys	Endosomal	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	11
rs774632252	Asn242Ile	Endosomal	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	12
rs746908600	Gly253Arg	Endosomal	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	10
rs753032218	Arg285Cys	Endosomal	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	10
rs773233756	Arg305Cys	Endosomal	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	10
rs199736549	Arg397Cys	Endosomal	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	9
rs764944818	Asp421Val	Endosomal	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	10
rs561203848	Gly429Arg	Endosomal	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	9
rs777140542	Ser496Leu	Endosomal	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	10
rs752229105	Arg575Cys	Endosomal	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	10
rs200714733	Arg601Trp	Endosomal	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	10
rs200548286	Ala768Glu	Endosomal	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	12
rs770242862	Ser822Leu	Transmembrane	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13
rs758340283	His836Tyr	Transmembrane	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	10
rs775545937	Ser926Leu	Cytoplasmic	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	13
rs375003304	Arg977Cys	Cytoplasmic	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	11
rs779252979	Ser991Ile	Cytoplasmic	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	12
rs200896211	Arg1023Trp	Cytoplasmic	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	11

Figure 2: Domain distribution of the selected polymorphisms.



6. MANUSCRITO 2: CORRELATION BETWEEN POLYMORPHISMS RECEPTOR IN TOLL LIKE 9 (TLR9) AND LESION CERVICAL BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV)

Manuscript to be submitted for publication in the journal Molecular Biology Reports

Impact factor: 2.024

Gisnayle Ana da Silva Pereira¹, Sandra Elizabeth Barbosa da Silva¹, Carlos Henrique de Madeiros Castelletti^{1,2}, Nicodemos Pontes Telles³, Danyelly Bruneska Gondim Martins^{1,4}

¹Molecular Prospecting and Bioinformatics Group – ProspecMol; Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - LIKA/UFPE.

²Agronomic Institute of Pernambuco – IPA.

³Pathology Department- UFPE

⁴Biochemistry Department – CCB/UFPE.

Correspondence: Gisnayle Ana da Silva Pereira

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

e-mail: gsilva@prospecmol.org

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is among the main types of cancer worldwide and the third type of tumor that more frequent in the female population in Brazil. This cancer is associated with infection by the human papillomavirus (HPV), which evade the innate immune system. Toll-like receptors (TLR) are located in the cell membranes, and TLR9 recognizes CpG islands unmethylated from bacterial and viral DNA in cytoplasm.

Methods: 57 patients under surveillance in Family Unit Health (Recife – PE, Brazil) were included in the study. Cervical samples were evaluated for TLR9 polymorphism, HPV infection and cytological abnormalities. PCR-RFLP was used to analyze TLR9 polymorphisms 7021T>G (Met85Arg), 7191G>A (Glu115Gln), 7351C>T (Ala168Val), 7986G>T (Asp380Tyr) and 8159G>T (Met347Ile) polymorphisms using RFLP.

Results: The T allele in 8159G>T polymorphism showed association with cervical lesions ($p=0.0005$). No mutant allele was found for 7191G>A (Glu115Gln); while no mutant heterozygous genotype was observed for 7351C>T (Ala168Val), 7021T>G (Met85Arg) and 7986G>T (Asp380Tyr). No association was found HPV infection or bacterial vaginosis.

Conclusions: TLR9 8159G>T (Met347Ile) polymorphism seems to have a role in cervical lesion, but further studies will reveal the molecular impact of this polymorphisms in the HPV infection and development of cervical lesions.

Keywords: Cervical cancer, HPV, TLR9 polymorphism

INTRODUCTION

The cervical cancer is among the main types of cancer worldwide and is considered currently the third type of tumor most frequent in female population in Brazil. There is an estimate of 596,000 new cases of cancer for the years 2016 and 2017 in the Brazilian population (INCA, 2015).

All current cases of cervical cancer described are associated with infection by the human papillomavirus (HPV), a sexually transmitted virus. HPV affects men and women and has particular tropism for epithelial cells, replicate in the nucleus of squamous epithelial cells (Rodrigues; Sousa, 2015). Through abrasions on the epithelial surface, this virus infects cells in the basal layer of the epithelium. Inside the cell the capsid is disorganized and the viral DNA is released and transported into the cell nucleus (Crosbie *et al.*, 2013). HPV16 and 18 genotypes are known for its prevalence in cervical intraepithelial lesions and cervical carcinomas (Hammer *et al.*, 2016).

The detection of invading microorganisms is measured by Pattern Recognition Receptor (PRR), present in phagocytic cells, NK cells and dendritic cells (Natural Killer), which recognize patterns Molecular Associated Pathogens (PAMPs) (Cao, 2016). Among the main PRRs are the Toll like receptors (TLRs), transmembrane proteins of the type I, responsible for the recognition of molecular structures found in microorganisms, and for generating signals that produce cytokines pro inflammatory (Mu *et al.*, 2015). In humans, ten TLRs were identified in macrophages, dendritic cells and neutrophils. They are synthesized in the endoplasmic reticulum and according to the place where they are present are classified in two subfamilies: cell surface TLRs and intracellular TLRs, located in the endosome (Hall; Agrawal, 2016).

Among the types of TLRs located in the endosome, the TLR9 is considered one of the most important PRR for the activation of the innate immune response against intracellular pathogens, because it leads to the recruitment of immune cells to the infection sites by recognizing islands CpG (cytosine-phosphodiester guanine) unmethylated present in the bacterial and viral DNA (Pandey; Kwai; Akira, 2015). The TLR9 is characterized by having an extracellular domain, consisting of leucine-rich repeats (Lrrs). However, in the case of an endosomal receptor, this area can also be known as endosomal domain, besides having a transmembrane domain and a cytoplasmic tail composed by a conserved region known as domain Toll Interleukin-1 Receptor (TIR) (Kawasaki; Kawai, 2014).

The link between pathogen DNA and TLR9 promotes dimerization which recruits adapter proteins also comprised by the TIR domain, for example, the myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88). Then, the signaling pathway of TLR9 will induce the release of nuclear factor kappa B (NF- κ B), which translocates to the nucleus and activates the expression of IL-6, IL-1 and tumor necrosis factor (TNF), relevant to the inflammatory response (Chen *et al.*, 2015).

TLR9 rs187084 polymorphism was associated to a significant increased risk of cervical cancer (Mu *et al.*, 2015), while rs352140 polymorphism showed possible significant association with increased susceptibility of infection by HPV16 in women with cervical cancer in Chinese women (Zhen *et al.*, 2013). The aim of this study was to identify the role of five missense polymorphisms Met85Arg (rs55979550), Glu115Gln (rs184563116), Ala168Val (rs201098493), Asp380Tyr (rs201499670) and Met347Ile (rs201448668) in cervical lesions, HPV infection and bacterial vaginosis.

MATERIAL AND METHODS

Patient samples

This study was performed with 94 women aged from 16 to 63 years, under surveillance in Family Unit Public Health (Olinda – PE, Brazil). Cervical samples were harvested during the routine gynecological inspection, from the ectocervix and endocervix by using a spatula and cytobrush (Kolplast, Brazil), respectively. Collected cells were applied onto a glass slide, identified and stored in absolute ethanol (Vetec, Brazil; Sigma-Aldrich Corporation) until sample preparation for cytopathology test. The residual cells in cytobrush were stored in PBS buffer pH7.0 (Life Technologies, USA) and used for HPV identification and HPV genotyping. The exclusion criteria were: HIV infection, pregnancy and post-partum, history of transplant, history of partial or complete uterus removal, and immunocompromised patients. This work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964) and the experiments were performed after the human subjects have signed an understanding and consent declaration. The Health Science Center Committee of the Federal University of Pernambuco previously approved this research under the code CEP/CCS/UFPE 275/08.

Cytopathological analysis

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

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

HPV molecular analysis

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

followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 62°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The final extension step was performed at 72°C for 7 min. Ultrapure water was used as negative control. Samples were assumed as positive after at least two amplifications for MY09/11 or GP5+/6+ among four tests, being two for each primer set. Amplicons were analyzed on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (10mg/ml).

HPV genotyping

The PapilloCheck® Test Kit was used according to manufacturer's instructions (Greiner Bio-One GmbH, Germany). PapilloCheck® Test Kit detects and differentiates 24 types of human papillomavirus, including 18 high-risk/probable high-risk HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) and 6 low-risk HPV (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44/55) by DNA chip technology. The test cannot distinguish between HPV-55 and HPV-44 due to cross-reaction, and the manufacturer instructions do not differentiate the high-risk HPV of the probable high-risk HPV. Slide scanning and data analysis were performed in Greiner Bio-One CheckScanner™ and CheckReport™ Software, respectively. Only samples positive for HPV-DNA or cytological abnormalities were included in the genotyping kit.

Primer design

For the design of primers set up a table using the local SNP database dbSNP collected from NCBI (v.144), adding information about protein region, amino acid change, degree of hydrophobicity, polarity and acid-base character. The local database was imported into the CLCBio software which selected only the endosomal region of TLR9, based on the importance of this region in the recognition of pathogens.

Endonucleases coincident with the SNPs were selected for use, and may recognize the sequence of the relevant gene or the mutated sequence. Enzymes sensitive to DNA methylation were excluded to avoid possible errors of interpretation. These parameters allowed the selection of 5 SNPs: Met85Arg (rs55979550), Glu115Gln (rs184563116), Ala168Val (rs201098493), Asp380Tyr (rs201499670) and Met347Ile (rs201448668).

Two regions were selected for study: R1 - to identify three polymorphisms Met85Arg ((7021T>G) rs55979550) digested by *NcoI*, Glu115Gln (7191G>A) rs184563116) digested by *TaqI* and Ala168Val ((7351C>T) rs201098493) digested by *SphI*; R2 - to identify two polymorphisms Asp380Tyr ((7986G>T) rs201499670) digested with *TaqI* and Met347Ile ((8159G>T) rs201448668) digested by *NcoI*. The primer sequences generated by the software were analyzed against the entire human genome to confirm their specificity and evaluated by sequencing analysis.

Amplification and RFLP

After tests to check the optimization of the annealing temperature of primers and the primer concentration to be used, R1 amplification was prepared to a final volume of 50µL, containing 4µL DNA extracted, 2µL of each primer solubilized for concentration of 10 pmoles/µL, using 17µL ultrapure water and 6.25µL of GoTaq Green Master Mix (Promega). The PCR conditions were: denaturation for 2 min at 95°C followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing for 30 sec at 61°C, and extension at 72°C for 1 min. The final elongation step was performed at 72°C for 5 min. The fragments were observed in agarose gel 1% using ethidium bromide (10mg/ml). R1 amplicon (765 bp) was treated with *NcoI* enzyme (Promega) to a final volume of 20µL, containing ultrapure water 5.3µL, 2µL buffer (10X) (Promega) 0.2µL bovine serum albumin (BSA), 12µL PCR reaction containing the DNA of the patient and 0.5µL

enzyme, incubated at 37°C for 1h. *SphI* enzyme (New England's BioLabs) was used to a final volume of 25µL containing 10µL of ultrapure water, 2.5µL cutsmart buffer (10X), 12µL PCR reaction containing the DNA of the patient and 0.5µL enzyme, incubated at 37°C for 15 min. The fragments were observed in agarose gel 1% using ethidium bromide (10mg/ml). *TaqI* (New England BioLabs) was prepared in the same conditions mentioned for the *SphI* enzyme and incubated at 65°C for 15 min. In agarose gel the *NcoI* showed 530 and 235 bp fragments, *TaqI* showed 405 and 360 bp fragments, while *SphI* showed 567 and 198 bp fragments.

For R2, the amplicon (473 bp) was obtained in a reaction prepared to a final volume of 37.5µL containing 3µL of DNA extracted, 3µL of each primer solubilized for concentration of 10 pmoles/µL, using 9.75µL ultrapure water and 18.75µL of Green Master GoTaq mix (Promega). The ultrapure water was used as negative control. The PCR conditions were similar to R1 PCR, with 58°C annealing step. R2 fragments were obtained treating amplicon with *NcoI* and *TaqI* enzymes in the conditions mentioned above. R2 *NcoI* digestion resulted in 338 and 135 bp fragments, while *TaqI* presented 306 and 167 bp fragments. The amplicon and the fragments from RFLP were observed in agarose gel 1% using ethidium bromide (10mg/ml).

Statistical analysis

Data were statistically analyzed using Prism statistical software (Version 4.03) to calculate the crude odds ratio (OR), using 95% confidence intervals (CI) by Fischer exact test, considering $p < 0.05$ as statistically significant.

RESULTS

A total of 57 patients samples were used for the TLR9 polymorphism evaluation. The socio-demographic and clinical aspects of the studied population are shown in **Table 1**. The majority of the women has less than two household income and no more than high school educational level. Married women were almost 36.8% of population studied, more than 50% reported first sexual intercourse after 16 years and were multiparous. The majority didn't use oral contraceptive and didn't do tubal ligation. Smoking habit was less frequent in the population studied, but alcohol consumption was more frequent. Twenty-seven patients were positive for HPV infection and HPV genotype was determined in 25 samples. HPV16 was present in five samples and in one of the samples also was found HPV66 and 44/55. HPV18 wasn't found in samples. Twelve patients showed cytological abnormalities, six LSIL and six HSIL.

The variation 7191G>A (Glu115Gln), only G/G genotype was found in samples, but in 7351C>T (Ala168Val), 44 samples were described as C/C and only one was described as C/T. The genotype distribution of 7021T>G (Met85Arg) was 84.2% T/T and 15.8% T/G. The genotype distribution of 7986G>T (Asp380Tyr) showed 96.49% G/G, corresponding to 55 samples, one sample presented G/T genotype, and one sample presented T/T genotype. Regarding to 8159G>T (Met347Ile) showed 85.9% G/G and 14.1% G/T.

Table 2 summarizes the distribution of 7021T>G and 8159G>T polymorphisms according to cytopathology finding, showing higher frequency of T/T and G/G genotypes. In the polymorphism 8159G>T, sample with allele G and T was associated with cervical lesions. However, it is necessary to improve the number of samples

analyzed to reinforce the correlation between the polymorphism and the development of cervical lesions.

The TLR9 7021T>G and 8159G>T polymorphisms showed no association with HPV infection (**Table 3**) HPV risk genotype (**Table 4**). Regarding to bacterial vaginosis, no association was found (**Table 5**).

DISCUSSION

Toll-like receptors play an important role in the immune system because they are proteins involved in regulating the inflammatory response and in some cases have been described for their performance against development of cancer. Currently several studies have described the key role of polymorphisms in TLRs genes in increased susceptibility to cervical carcinoma. In TLR9 the 2848G> A (rs352140) polymorphism had an important role in modifying the immune response in the host (Zidi *et al.*, 2015). According to the analysis carried out in three genetic variants of Toll-like receptor 9: rs187084, rs352140, and rs5743836, the polymorphism rs187084 was suggested as may be associated with an increased risk of cervical cancer, but a greater number of patients control is needed to better analyze the correlations between this polymorphism and cancer (Wan *et al.*, 2014). The rs352140, through of a meta-analysis was associated with a greater risk of cancer, while the polymorphism rs187084 and rs5743836 showed no significant increased risk of cancer (Zhang *et al.*, 2013).

This is the first report about the five polymorphisms 7021T>G (Met85Arg), 7191G>A (Glu115Gln), 7351C>T (Ala168Val), 7986G>T (Asp380Tyr) and 8159G>T (Met347Ile) and their role in cervical lesions, HPV infection and bacterial vaginosis. Due to the small number of samples our study have some limitations, preventing proper

assessment of the influence of polymorphisms in the development of HPV infection and cervical lesions, there is need for a larger sample, and the absence of cervical cancer samples reduces the possibility to understand the real role of polymorphisms analyzed in cervical cancer.

REFERENCE

- [1] Instituto Nacional de Cancer, Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil, 60 (2014) 63–64.
- [2] A.F. Rodrigues, J.A. Sousa, PAPILOMAVIRUS HUMANO: PREVENÇÃO E DIAGNÓSTICO, (2015) 1–14.
- [3] A. Hammer, A. Rositch, F. Qeadan, P.E. Gravitt, J. Blaakaer, cancer : A systematic review and meta-analysis, 00 (2016) 1–9. doi:10.1002/ijc.29959.
- [4] E.J. Crosbie, M.H. Einstein, S. Franceschi, H.C. Kitchener, Human papillomavirus and cervical cancer, Lancet. 382 (2013) 889–899. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7.
- [5] M.A.P. de Lima, C.G.L. da Silva, S.H.B. Rabenhorst, Papel das Proteínas Precoces do Papilomavirus Humano na Carcinogênese Role of the Human Papillomavirus Early Proteins in the Carcinogenesis, 59 (2013) 565–573.
- [6] X. Cao, Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease, Nat. Publ. Gr. 16 (2016) 35–50. doi:10.1038/nri.2015.8.
- [7] X. Mu, J. Zhao, X. Yuan, X. Zhao, K. Yao, Y. Liu, et al., Gene Polymorphisms of Toll-Like Receptor 9 –1486T/C and 2848G/A in Cervical Cancer Risk, Int. J.

- Gynecol. Cancer. 25 (2015) 1173–1178. doi:10.1097/IGC.0000000000000494.
- [8] S.C. Hall, D.K. Agrawal, Toll-like receptors, triggering receptor expressed on myeloid cells family members and receptor for advanced glycation end-products in allergic airway inflammation, *Expert Rev. Respir. Med.* 10 (2016) 171–184. doi:10.1586/17476348.2016.1133303.
- [9] S. Pandey, T. Kawai, S. Akira, Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a016246. doi:10.1101/cshperspect.a016246.
- [10] T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways., *Front. Immunol.* 5 (2014) 461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- [11] Z. Chen, W. Wang, J. Liang, J. Wang, S. Feng, G. Zhang, Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis, *BMC Pulm. Med.* 15 (2015) 57. doi:10.1186/s12890-015-0049-4.
- [12] Z. Lai, X. Pan, gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer, 9 (2013). doi:10.1177/0300060513483398.
- [13] S. Zidi, I. Sghaier, E. Gazouani, A. Mezlini, Evaluation of Toll-Like Receptors 2 / 3 / 4 / 9 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Evolution, (2015). doi:10.1007/s12253-015-0009-6.
- [14] G. Wan, Y. Cao, W. Li, Y. Li, W. Zhang, F. Li, Associations Between TLR9 Polymorphisms and Cancer Risk : Evidence from an Updated Meta-analysis of 25 , 685 Subjects, 15 (2014) 8279–8285.

- [15] L. Zhang, H. Qin, X. Guan, K. Zhang, Z. Liu, The TLR9 Gene Polymorphisms and the Risk of Cancer: Evidence from a Meta-Analysis, 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0071785.

Table 1. Socio-demographic and clinical profile of 57 patients enrolled in the study.

Characteristics	N	(%)
Household income, minimum wage (R\$) ^{a,b}		
>1	11	19.3
>2	28	49.1
2-5	9	15.8
Educational level ^c		
High school or less	52	91.2
Incomplete college	1	1.7
College graduate	1	1.7
Matrimonial status		
Single	12	21
Married	21	36.8
Divorced	7	12.3
Widow	3	5.3
Age of first sexual intercourse, years ^d		
>16	24	42.1
≥16	30	52.6
Sexual partners ^b		
>3	27	47.4
3-7	24	42.1
>7	5	8.77
Parity		
Nulliparous	0	0
Primiparous	16	28,1
Multiparous (2-11)	32	56.1

Abortion ^e			
Yes (1-5)	17	29.8	
No	32	56.14	
Oral contraceptive ^c			
Yes	4	7.02	
No	53	93	
Tubal ligation ^c			
Yes	19	33.3	
No	38	66.7	
Smoking habit			
Yes	16	28.1	
No	41	71.9	
Alcohol consumption			
Yes	29	50.9	^a
No	28	49.1	:

minimum wage = R\$ 622.00; ^b: 8 patients without salary income and 1 patients did not answer the question; ^c: 1 patient did not have schooling; ^d: 3 patients did not answer the question; ^e: excluding 8 patients that never were pregnant.

Table 2. TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles according to the cytopathology findings.

Variant		Cytopathology		p-value	OR (95% CI)
		Negative (%)	Positive (%)		
Genotype					
7021T>G	T/T	37 (82.2)	9 (90)		Reference
	T/G	8 (17.8)	1 (10)	1	0.51 (0.06-4.65)
8159G>T	G/G	38 (84.4)	11 (91.7)		Reference
	G/T	7 (15.6)	1 (8.3)	1	0.49 (0.05-4.46)
Allele					
7021T>G	T	45 (84.9)	12 (92.3)		Reference
	G	8 (15.1)	1 (7.7)	0.67	0.47 (0.05-4.12)
8159G>T	G	45 (97.8)	12 (63.1)		Reference
	T	1 (2.2)	7 (36.9)	0.0005	26.2 (2.9-234)

Table 3. TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles, according to the presence of HPV-DNA in cervical samples.

Variant		HPV-DNA		p-value	OR (95% CI)
		Negative (%)	Positive (%)		
Genotype					
7021T>G	T/T	25 (83.3)	23 (85.2)	1	Reference
	T/G	5 (16.7)	4 (14.8)		0.87 (0.20-3.64)
8159G>T	G/G	27 (90)	22 (81.4)	0.46	Reference
	G/T	3 (10)	5 (18.6)		2.04 (0.44-9.52)
Allele					
7021T>G	T	30 (85.7)	27 (87.1)	1	Reference
	G	5 (14.3)	4 (12.9)		0.89 (0.22-3.66)
8159G>T	G	30 (90.9)	27 (84.3)	0.47	Reference
	T	3 (9.1)	5 (15.7)		1.85 (0.40-8.49)

Table 4. TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles, according to the HPV genotyping.

Variant		HPV genotyping		p-value	OR (95% CI)
		LR-HPV (%)	HR-HPV (%)		
Genotype					
7021T>G	T/T	9 (81.8)	17 (94.4)		Reference
	T/G	2 (18.2)	1 (5.6)	0.54	0.26 (0.02-3.33)
				-	-
8159G>T	G/G	8 (72.7)	16 (88.8)		Reference
	G-T	3 (27.3)	2 (11.2)	0.34	0.33 (0.04-2.41)
Allele					
7021T>G	T	11 (84.6)	18 (94.7)		Reference
	G	2 (15.4)	1 (5.3)	0.55	0.30 (0.02-3.78)
8159G>T	G	11 (78.6)	18 (90)		Reference
	T	3 (21.4)	2 (10)	0.62	0.41 (0.06-2.84)

Table 5. TLR9 7021T>G and 8159G>T genotypes and alleles, according to the presence of bacterial vaginosis (BV).

Variant		Bacterial vaginosis		<i>p-value</i>	OR (95% CI)
		Negative (%)	Positive (%)		
<i>Genotype</i>					
7021T>G	T/T	44 (84.6)	4 (80)		Reference
	T/G	8 (15.4)	1 (20)	1	1.37 (0.13-13.9)
8159G>T	G/G	45 (86.5)	4 (80)		Reference
	G/T	7 (13.5)	1 (20)	0.54	1.61 (0.15-16.5)
<i>Allele</i>					
7021T>G	T	52 (86.7)	5 (83.3)		Reference
	G	8 (13.3)	1 (16.7)	1	1.3 (0.13-12.6)
8159G>T	G	52 (88.1)	5 (83.3)		Reference
	T	7 (11.9)	1 (16.7)	0.56	1.49 (0.15-14.6)

7. CONCLUSÃO

Através do presente estudo, identificamos polimorfismos não sinônimos na TLR9 que podem ter alta correlação com doenças causadas por agentes patogênicos, de acordo com a predição de danos estruturais e funcionais de polimorfismos deletérios na molécula. Tais nsSNPs podem alterar a estrutura protéica devido a alterações no grau de hidrofobicidade de através da mudança de aminoácidos, interferindo no papel da TLR9 na imunidade inata, por inibição na função de reconhecimento de patógenos e consequentemente, aumentando a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer cervical através da infecção pelo Papilomavírus humano

8.ANEXOS

8.1 Lista de aminoácidos

Nº	AMINOÁCIDO	ABREVIATURA	SÍMBOLO
1	Alanina	Ala	A
2	Cisteina	Cys	C
3	Acido aspártico	Asp	D
4	Acido glutámico	Glu	E
5	Fenilalanina	Phe	F
6	Glicina	Gly	G
7	Histidina	His	H
8	Isoleucina	Ile	I
9	Lisina	Lys	K
10	Leucina	Leu	L
11	Metionina	Met	M
12	Asparagina	Asn	N
13	Pirrolisina	Pyl	O
14	Prolina	Pro	P
15	Glutamina	Gln	Q
16	Arginina	Arg	R
17	Serina	Ser	S
18	Treonina	Thr	T
19	Selenocisteina	Sec	U
20	Valina	Val	V
21	Triptofano	Trp	W
22	Tirosina	Tyr	Y

8.2 Questionário padronizado para obtenção de informações sócio demográficas, comportamentais e clínicas

		Cod. Pronex
1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO		DATA:
Local de coleta	Grupo do participante (preenchimento posterior)	
Número do prontuário	☐ controle ☐ caso	
2. INFORMAÇÕES PESSOAIS		
Nome		
Data de nascimento	Idade	Sexo: ☐ F ☐ M
Endereço Atual		
Bairro	Cidade	
Município	UF	CEP:
Zona ☐ Urbana ☐ Rural	Tempo de residência atual:	
Telefone		
Proximidades: ☐ mineradora ☐ arte c/ pedra sabão ☐ fábricas/indústrias ☐ outros		
Residência anterior:		
Bairro:	Cidade:	UF:
Zona:	Tempo de residência:	
Proximidades: ☐ mineradora ☐ arte c/ pedra sabão ☐ fábricas/indústrias ☐ outros		
3. SITUAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA		
Etnia ☐ branca ☐ parda ☐ preta ☐ amarela ☐ indígena		
Situação conjugal: ☐ solteira ☐ casada ☐ viúva ☐ separada ☐ união consensual (estável)		
Qual a sua escolaridade: ☐ nenhuma ☐ NS/Recusa		
☐ Fund. menor incompleto ☐ Fund. menor completo ☐ Fund. maior incompleto ☐ Fund. Maior completo ☐ Médio incompleto ☐ Médio completo ☐ Superior incompleto ☐ Superior completo		
Profissão: _____ Tempo: _____ CBO ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐		
Sua principal ocupação? _____ Tempo: _____ CBO ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐		
(Por Exemplo: Motorista de ônibus, mecânico de automóveis, Office boy, auxiliar de pesquisa, veterinária, etc.)		
Onde a Sra. trabalha? _____ COD ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐		
(Ex: Oficina de automóveis, escritório de contabilidade, veterinária, restaurante, etc.)		
Qual foi a ocupação que a Sra. teve por mais tempo? _____ COD ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐		
(Por exemplo: Auxiliar de escritório, arquiteta, enfermeira, bombeiro hidráulico, etc.)		
A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho, em que ficava em contato com produtos químicos?		
☐ não		
☐ sim ☐ NS/NR		
Que tipos de Produtos Químicos?		
☐ Tintas	☐ Combustíveis/lubrificantes	☐ preservativos de madeira
☐ Solvente	☐ inseticidas, pesticidas e herbicidas	☐ Corantes e pigmentos
☐ Resinas	☐ ácidos e cáusticos fortes	☐ produto para fabricação de plásticos
☐ produto para fabricação de borracha	☐ NS/NR	
☐ Outros produtos químicos _____ (especifique)	COD ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐	(cód. Posterior)

A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com metais pesados, como cromo, cádmio, níquel ou outros? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR Que tipo de metais pesados? ☐ Cromo ☐ Cádmio ☐ Níquel ☐ Mercúrio ☐ Chumbo ☐ NS/NR ☐ Outros metais pesados _____ (especifique) COD (cód. Posterior)		
A Sra. tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com algum tipo de radiação? ☐ Não ☐ Sim ☐ NS/NR Que tipo de radiação? ☐ Solar ☐ Raio X e outras radiações ionizantes ☐ NS/NR ☐ Outras radiações _____ (especifique) COD (cód. Posterior)		
Contando com salário, pensão, aluguel, bico, etc., em que faixa de renda a Sra. se encaixa: ☐ Não tenho renda ☐ Menos de 1 S.M. ☐ De 1 a menos de 2 S.M. ☐ De 2 a menos de 3 S.M. ☐ De 3 a menos de 5 S.M. ☐ De 5 a menos de 10 S.M. ☐ De 10 a menos de 20 S.M. ☐ De 20 a menos de 30 S.M. ☐ De 30 a menos de 40 S.M. ☐ De 40 a menos de 50 S.M. ☐ 50 S.M ou mais ☐ NS/Recusa		
3.8 N° de pessoas no domicílio :		
4. HISTÓRIA SEXUAL E REPRODUTIVA		
Relações Sexuais ☐ sim ☐ não (pular para 5)		
Idade da primeira relação sexual		Número de parceiros
A Sra. está grávida ou amamentando? ☐ Sim, estou grávida ☐ Não, não estou grávida/amamentando ☐ Sim, estou amamentando ☐ NS/NR		
Número de gestações		Idade da primeira gestação
Idade que nasceu o primeiro filho		Número de abortos
Número de partos	Normal	Cesária
5. HISTÓRICO CLÍNICO		
Qual é a sua altura? m ☐ NS/NR Qual é o seu peso? Kg ☐ NS/NR		
Com que frequência vai ao ginecologista? ☐ mensal ☐ trimestral ☐ semestral ☐ anual ☐ nunca ☐ NS/NR Quando fez o último exame preventivo? ☐ menos de 1 ano ☐ 1 ano ☐ mais de 1 ano ☐ indeterminado ☐ nunca ☐ NS/NR A Sra. já fez exame de Papanicolau? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR Qual foi o resultado? ☐ negativo ☐ positivo ☐ NS/NR		
Qual o seu método contraceptivo atual? ☐ não uso (pular para próximo) ☐ NS/Recusa ☐ ligadura de trompa ☐ injeção ☐ coito interrompido ☐ DIU ☐ outro ☐ implante ☐ tabelinha ☐ camisinha feminina ☐ pílula ☐ espermaticida ☐ preservativo ☐ método do muco ☐ diafragma ☐ anel vaginal ☐ adesivo ☐ vasectomia do parceiro ☐ pílula do dia seguinte Quanto tempo de uso? ☐ menos de 1 ano ☐ mais de 1 ano ☐ NS/NR		
A Sra. está na menopausa? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR A Sra. utiliza medicação para menopausa? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR Qual o tipo ? ☐ hormonal ☐ químico ☐ NS/NR		
Algum mal estar? ☐ não ☐ tontura ☐ fraqueza ☐ náuseas ☐ sonolência ☐ coceira, Onde? _____ ☐ dor, onde? _____		

Algun médico, enfermeiro ou agente comunitário de saúde já lhe disse que a Sra. tem pressão alta? ☐ não
☐ sim
 Atualmente, a Sra. está usando o remédio para baixar sua pressão?
☐ não ☐ sim

Alguma vez a Sra. fez exame de sangue para medir o seu colesterol? ☐ Não
☐ sim ☐ NS/NR
 Quando foi a última vez que a Sra. fez exame para medir o seu colesterol?
☐ Há até 6 meses ☐ Há mais de 6 meses até 1 ano
☐ Há mais de 1 ano até 2 anos ☐ Há mais de 2 anos até 5 anos
☐ Há mais de 5 anos ☐ NS/NR
 Algun médico, enfermeiro ou nutricionista já lhe disse que a Sra. tem colesterol alto? ☐ Não
☐ sim ☐ NS/NR

A Sra. já fez exame para medir o açúcar no sangue ou diagnosticar diabetes? ☐ Não
☐ sim ☐ NS/NR
 Algun médico já lhe disse que a Sra. tem diabetes? ☐ Não
☐ sim
 Depois que disseram que a Sra. é diabética, algum médico, enfermeiro ou nutricionista receitou uma dieta para diabetes (pouco açúcar, pouco macarrão, etc)? ☐ Não
☐ sim
 A Sra. está seguindo essa dieta? ☐ Não
☐ sim
 Depois que disseram que a Sra. é diabética, algum médico lhe receitou remédio para o seu diabetes?
☐ não ☐ sim
 Esse remédio é:
☐ Apenas comprimido ☐ injeção de insulina ☐ ambos
 Atualmente, a Sra. está tomando os remédios para diabetes? ☐ Não
☐ sim

Tem alguma outra doença crônica? ☐ não
☐ sim Quais? _____

Atualmente, a Sra. faz uso de alguma outra medicação? ☐ Não
☐ sim ☐ NS/NR
 Quais? ☐ imunossupressora ☐ antibiótico ☐ cardiovascular ☐ psicotrópico ☐ NS/NR
 Outra? _____ Quanto tempo? _____

Já fez alguma cirurgia? ☐ não
☐ sim
 Quais? _____ Quando? _____
 Quais? _____ Quando? _____

A Sra. já recebeu transfusão sanguínea? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR
 A Sra. já recebeu algum transplante? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR

Algun médico já disse que a Sra. tem ou já teve câncer? ☐ Não
☐ sim
 O médico disse para a Sra. qual é o local deste câncer? ☐ Não
☐ sim
 Qual era a localização deste câncer na época do diagnóstico?
 (Se útero, perguntar se foi/ é câncer de colo do útero ou de corpo do útero. Se ela não souber anotar ÚTERO SOE). _____ COD ☐☐☐☐
 Qual era a sua idade quando disseram que a Sra. tinha (este) câncer? ☐☐☐ Anos
 A Sra. iniciou tratamento para este câncer? ☐ não ☐ sim

A Sra. continua em tratamento para este câncer? ☐ não ☐ sim

Por que a Sra. não está se tratando atualmente?

☐ Tratamento foi concluído ☐ Abandonei ☐ NS/NR

☐ Outro _____ (especifique)

A Sra. já fez algum tratamento radiológico pélvico? ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR

A Sra. já apresentou algum dos problemas abaixo? ☐ Não ☐ NS/NR

☐ infecção por HPV ☐ corrimento ☐ prurido ☐ ardência

☐ Clamídia ☐ candidíase ☐ gonorréia ☐ sífilis

☐ Outros _____ (especifique)

Algum médico já lhe disse que a Sra. tem ou teve algumas das seguintes doenças? ☐ não

☐ Doença da coluna ou costas ☐ Artrite/Reumatismo (não infeccioso/Gota)

☐ Tendinite/LER (Lesão de esforço repetitivo) ☐ Ataque do coração

☐ Angina ou doença das coronárias ☐ Insuficiência cardíaca

☐ Derrame ☐ Dengue ☐ Depressão ☐ Enfisema

☐ Asma ☐ Cirrose do fígado ☐ Hepatite ☐ Tuberculose

☐ Malária ☐ Hanseníase ☐ AIDS/SIDA ☐ Outra _____

6. HISTÓRICO FAMILIAR

Algum parente com doença crônica? ☐ não ☐ NS/NR

☐ sim

Grau de parentesco: _____ Qual doença? _____

Grau de parentesco: _____ Qual doença? _____

Algum parente com câncer? ☐ não ☐ NS/NR

☐ sim

Grau de parentesco: _____ Qual tipo? _____

Grau de parentesco: _____ Qual doença? _____

7. TABAGISMO

Fuma? ☐ não

☐ fumava mas parei (pular o próximo bloco)

☐ sim

Há quanto tempo fuma? ☐ anos ☐ meses ☐ NS/NR

Qual tipo de cigarro?

☐ de palha ☐ com filtro ☐ sem filtro ☐ charuto ☐ cachimbo ☐ indiano

Quantidade por dia?

☐ 1 a 3 ☐ 4 a 6 ☐ 7 a 10 ☐ mais de 10 ☐ Maço ☐ outro Qual? _____

Quanto tempo depois de acordar a Sra. fuma o primeiro cigarro?

☐ Nos primeiros 5 minutos ☐ De 6 minutos a 30 minutos

☐ De 31 minutos a 60 minutos ☐ Após 60 minutos

A Sra. já parou de fumar por pelo menos 1 dia, porque estava tentando seriamente parar de vez?

☐ não ☐ sim

Quando foi a última vez que a Sra. tentou parar de fumar?

☐ Durante o último mês ☐ Mais de um mês até 6 meses atrás

☐ Mais de 6 meses até 12 meses atrás ☐ Há mais de 12 meses

Alguma vez a Sra. já experimentou ou tentou fumar cigarros, mesmo uma ou duas tragadas?

☐ não ☐ sim

A Sra. fica em contato com a fumaça do cigarro de outras pessoas em sua casa, trabalho ou escola?

☐ não ☐ sim

Há quanto tempo a Sra. parou de fumar?

☐ anos ☐ meses ☐ NS/NR

Quando a Sra. fumava, quantos cigarros a Sra. fumava, em média, por dia?

☐ Cigarros por dia ☐ Maços por dia ☐ NS/NR/Variável

A Sra. parou de fumar porque tinha algum problema de saúde que foi causado ou que piorou por causa do cigarro?

☐ não ☐ sim

Para parar de fumar a Sra. :

☐ Recebeu algum tipo de tratamento com profissionais de saúde ou usou algum tipo de medicamento

☐ Parou por conta própria

Qual foi o tipo de tratamento ou medicamento que a Sra. recebeu?

☐ Recebeu orientações em consulta com médico ou enfermeiro ou psicólogo

☐ Participou de grupos para ajudar o fumante a parar

☐ Fez tratamento com laser ou acupuntura

☐ Usou adesivos ou chiclete de nicotina

☐ Usou outros tipos de medicamentos? _____

☐ Outros _____

8. HISTÓRICO ALIMENTAR

Consome Bebidas alcoólicas? ☐ não

☐ não agora, mas já consumiu (*pular para próximo bloco*)

☐ sim

Qual o tipo ?

☐ Aguardente ☐ Cerveja ☐ Vinho ☐ whisky ☐ licor

☐ outros _____ ☐ NS/NR

Com que idade que iniciou? _____

Com que frequência costuma beber?

☐ diariamente ☐ semanalmente ☐ mensalmente ☐ raramente

Qual a quantidade de copos/dia?

☐ 1 a 2 ☐ 3 a 4 ☐ 5 a 6 ☐ mais de sete ☐ outros

Com que idade que parou de beber? _____

Por quantos anos bebeu? _____

Passou por algum tratamento para parar de beber?

☐ não ☐ sim ☐ NS/NR

8.3 - Cozimento

Ingere broto de samambaia? ☐ não

☐ sim ☐ NS/NR

A quantos anos ingere? _____

Qual a forma de preparo? ☐ cru ☐ cozido ☐ outros

Qual o número de água desprezadas? _____

Qual a quantidade de porções que ingere por vez ?

☐ 1 a 2 colheres ☐ 3 a 4 colheres

☐ Vezes por

☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês ☐ Rara/Nunca

Usa Fogão a Lenha? ☐ não

☐ sim ☐ já usei

Tem Fogão a Lenha em casa? ☐ não

☐ sim

A quanto tempo? _____

Você cozinha neste fogão? ☐ sim ☐ não **A quanto tempo?** _____

Você costuma queimar madeira para outro fim: ☐ sim ☐ não

8.4 Alimentos

A Sra. come frango? ☐ Não

☐ Sim

Com que frequência a Sra. come frango?

☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês

☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Quando a Sra. come frango, o que normalmente faz com a pele:

- ☐ Sempre retira a pele antes de comer
☐ Algumas vezes retira
☐ Nunca retira
☐ NS/NR
- ☐ Na maioria das vezes retira
☐ Quase nunca retira
☐ Não come carne que tenha muita gordura

A Sra. come carne vermelha? ☐ Não

☐ Sim

Com que frequência a Sra. come carne?

- ☐ ☐ Vezes por dia ☐ ☐ Vezes por semana ☐ ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Quando a Sra. come carne vermelha, o que normalmente faz com a gordura visível:

- ☐ Sempre retira
☐ Algumas vezes retira
☐ Nunca retira
☐ NS/NR
- ☐ Na maioria das vezes retira
☐ Quase nunca retira
☐ Não come carne que tenha muita gordura

Com que frequência a Sra. come:**Alimentos na brasa (ex: churrasco)?**

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Bife ou carne cozida?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Hambúrguer ou carne moída?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Lingüiça ou salsicha (exceto de frango)?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Peixe?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Carne de porco?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Queijo ou requeijão?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Manteiga ou margarina?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Biscoitos?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Bolos e tortas?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Batata frita?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Carnes ou peixes conservados no sal (ex: bacalhau, charque, pé de porco)?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Enlatados ou conserva (ex: milho, ervilha, palmito, azeitona, salsicha, extrato ou massa de tomate)?

- ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês
☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR

Frios (ex: presunto, mortadela, salame, apresuntado)? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Leite e derivados (ex: achocolatado, iogurtes, vitaminas)? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Frutas e sucos de frutas preparados a partir da fruta, polpa ou concentrado? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Batata cozida, batata-doce, batata-baroa, aipim, cará, inhame? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Outros legumes (ex: abobrinha, beterraba, chuchu, cenoura, quiabo, vagem)? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Hortalças (ex: agrião, alface, brócolis, chicória, couve, couve-flor, espinafre, repolho)? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Feijões (ex: preto, mulatinho, fradinho, roxo), lentilha, ervilha seca ou grão de bico? ☐ Vezes por dia ☐ Vezes por semana ☐ Vezes por mês ☐ Menos que uma vez por mês/raramente ☐ NS/NR Sem contar saladas, com que frequência a Sra. costuma colocar sal no prato de comida? ☐ Nunca coloca sal no prato de comida ☐ Provo e coloco se estiver sem sal ☐ Coloco quase sempre mesmo sem provar
9. ATIVIDADE FÍSICA Em quantos dias de uma semana comum a Sra. caminha por pelo menos 10 minutos seguidos? (ex: em casa, no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer ou como forma de exercício) ☐ Dia(s) na semana ☐ Nenhum ☐ NS/NR A Sra. faz atividades MODERADAS, por pelo menos 10 minutos seguidos, no trabalho, por lazer, por esporte, como forma de exercício, como parte das suas atividades dentro de casa, no quintal ou qualquer outra atividade que aumente moderadamente a sua respiração ou batimentos do coração? (ex: pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa ou no quintal, como varrer, aspirar, cuidar do jardim ou trabalhos como soldar, operar máquinas, empilhar caixas) ☐ não ☐ sim ☐ NS/NR Em quantos dias de uma semana comum, a Sra. faz essas atividades MODERADAS, por pelo menos 10 minutos seguidos? ☐ Dia(s) na semana ☐ NS/NR

AO QUESTIONADOR

ESTADO DE ATENÇÃO DO ENTREVISTADO ☐ bastante disperso ☐ disperso ☐ atento ☐ bastante atento ☐ outros
COMPREENSÃO DO ENTREVISTADO ☐ não compreende ☐ compreende com dificuldade ☐ compreende

Entrevistador _____

8.3 Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado para participar, como voluntária, na pesquisa **“SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DO COLO UTERINO”**. Após ser esclarecida sobre os objetivos do projeto, e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco pelo telefone 81 21268588.

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

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

A) Sua contribuição consiste na doação de sangue, células epiteliais e/ou biópsia para diagnósticos laboratoriais a partir de amostras da região perineal, vulva, vagina e/ou colo do útero. A coleta de sangue não faz parte do procedimento padrão de exames ginecológicos implementados pelo Ministério da Saúde, sendo este um desconforto adicional.

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

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

C) Assim como num exame ginecológico periódico, existe apenas um desconforto no momento da observação do colo do útero, de onde será feita uma coleta. Os riscos relacionados à coleta de sangue, que não faz parte do exame ginecológico periódico,

são: leve desconforto no momento da coleta, e possibilidade de surgimento de um pequeno trauma no local da coleta que desaparecerá após 24 ou 48 horas.

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

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

Eu, _____

(nome da paciente)

portadora do RG _____, residente a _____

_____ fone: _____ aceito

participar desta pesquisa.

Nome da mãe: _____

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

Olinda: ____/____/____

Assinatura da paciente

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha 1

Assinatura da testemunha 2

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos, através dos telefones (81) 2126-8484 / Fax: (81) 2101-8485, falar com **Danyelly Bruneska Gondim Martins**, pesquisadora responsável pela pesquisa.

8.4 Aprovação do comitê de ética em pesquisa



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

Of. N.º 403/2008 - CEP/CCS

Recife, 18 de Dezembro de 2008

Registro do SISNEP FR – 215803

CAAE – 0267.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 275/08

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

Pesquisador Responsável: Danyelly Bruneka Gondim Martins

Senhora Pesquisadora:

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

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

Atenciosamente

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

José Ângelo Rizzo
Vice-Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A

Dra. Danyelly Bruneka Gondim Martins

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE