



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Laboratório de Genética

Papel modulador do gene *MTHFR* nos níveis de Homocisteína na infeção por HPV

Joana Patrícia Rocha da Cunha

Orientado por:

Professora Doutora Maria Ângelo Ribeiro Marques Inácio

Coorientado por:

Professora Doutora Maria Clara Gomes da Fonseca Pedro Bicho

JUNHO'2024

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Manuel Bicho, Diretor do Laboratório de Genética e Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa, pela oportunidade que me ofereceu, para a realização deste projeto. Da mesma forma, queria agradecer à Professora Doutora Maria Clara Bicho, pela disponibilização da sua base de dados, fundamental para a concretização deste trabalho.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Maria Ângelo Ribeiro Marques Inácio, pela disponibilidade, paciência, ajuda e todo o apoio que sempre demonstrou, durante todo este percurso. À mestre Laura Aguiar, pela eficiência, e celeridade na assistência a este trabalho.

Aos meus colegas de curso, obrigado pelos laços de amizade, pela troca de experiências, palavras encorajadoras e de incentivo. Obrigada por me lembrarem que tudo se faz e que nunca estamos sozinhos nesta aventura.

Aos meus amigos e família, obrigada por sempre apoiarem as minhas conquistas como se fossem vossas. Obrigada pela paciência e compreensão que manifestam sempre que não posso estar presente em momentos importantes, quer pela distância, quer pelas horas intermináveis de estudo. Um especial obrigado à Inês, pelo abraço e palavras de conforto sempre disponíveis.

Ao João, obrigada por segurares a minha mão com força e confiança em cada passo desta jornada. Obrigada por todo o apoio, incentivo e paciência infinita. Este desafio teria sido mais complicado sem o conforto do teu abraço ou a calma das tuas palavras. A tua presença tornou tudo mais especial.

Por fim, aos melhores pais do mundo, obrigada por todo o amor incondicional que sempre me deram. Obrigada pelo apoio inabalável e encorajamento ao longo de todo o meu percurso. Obrigada por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos e por celebrarem comigo cada vitória, grande ou pequena, mesmo que muitas vezes a 380 quilómetros de distância. Obrigada por todos os sacrifícios que fizeram por mim, que tornaram esta conquista possível. Sou-vos eternamente grata por tudo. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

RESUMO

Introdução: O cancro do colo do útero é a quarta causa de morte por cancro em mulheres, a nível global. A infeção por Papilomavírus Humano é a principal causa para o desenvolvimento de cancro cervical, não sendo causa suficiente. Entre outros fatores potenciadores, existe a variação genética em genes modificadores. O metabolismo da homocisteína está envolvido nos processos de síntese, reparação e metilação de ADN, que estão muitas vezes desregulados na carcinogénese.

Objetivo: Estudar os níveis de homocisteína circulante na doença e na sua severidade, e compreender o papel modulador do gene *MTHFR* nesse fenótipo.

Metodologia: Os dados laboratoriais foram disponibilizados anteriormente, estando em bases de dados. A análise estatística foi realizada através do software *SPSS*. Efetuou-se o teste *U* de *Mann-Whitney* para avaliar diferenças dos níveis de homocisteína entre um grupo de mulheres saudáveis e grupos com diferentes graus de lesão cervical. Fez-se ajuste à idade através do teste de Regressão Logística Binária. Para perceber a influência do genótipo do *MTHFR* nos níveis de homocisteína, realizou-se o teste *T* de *Student*.

Resultados: Os níveis de homocisteína são inferiores em mulheres com patologia. O gene *MTHFR* não modula os níveis de homocisteína em mulheres infetadas com HPV.

Conclusão: Os níveis de homocisteína podem alterar o desenvolvimento de lesões precursoras ou malignas do colo do útero. Dadas as limitações deste trabalho, recomenda-se a realização de mais investigações que estudem o papel da homocisteína, associado ao papel de outras variantes genéticas que participem neste metabolismo, com amostras populacionais maiores, de forma a obter uma maior qualidade de resultados.

Palavras-chave: Homocisteína, *MTHFR*, Papilomavírus Humano, Displasia cervical, Cancro do colo do útero.

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the fourth leading cause of cancer death in women, globally. Human papillomavirus infection is the main cause for the development of cervical cancer, although it is not sufficient on its own. Among other contributing factors, there is genetic variation in modifier genes. Folate and homocysteine metabolism is involved in DNA synthesis, repair, and methylation processes, which are often dysregulated in carcinogenesis.

Objective: To study circulating homocysteine levels in the disease and its severity, and to understand the modulating role of the *MTHFR* gene in this phenotype.

Methodology: Laboratory data was previously available in databases. Statistical analysis was conducted using *SPSS* software. The *Mann-Whitney* non-parametric U test was used to assess differences in homocysteine levels between a group of healthy women and groups with different degrees of cervical lesions. Age was adjusted using the Binary Logistic Regression test. To understand the influence of the *MTHFR* genotype on homocysteine levels, the *Student's* T-test was performed.

Results: Homocysteine levels were lower in women with the condition. The *MTHFR* gene does not modulate homocysteine levels in HPV-infected women.

Conclusion: Homocysteine levels may alter the development of precancerous or malignant lesions of the cervix. Given the limitations of this study, further research is recommended to study the role of homocysteine and folate, associated with the role of other genetic variants involved in this metabolism, with population samples containing a larger number of participants to obtain higher-quality results.

Key-words: Homocysteine, *MTHFR*, Human Papillomavirus, Cervical Dysplasia, Cervical Cancer.

The author is exclusively responsible for this final paper, and the Faculty of Medicine of the University of Lisbon is not responsible for any of content presented in it.

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama do Vírus do Papiloma Humano tipo 16.	13
Figura 2. Ciclo de vida do Vírus do Papiloma Humano e organização do seu genoma.	16
Figura 3. Representação esquemática do Metabolismo da Homocisteína.	27
Figura 4. Distribuição de dados da concentração de homocisteína sérica no Grupo Controlo.	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Função dos genes relacionados com o HPV	14
Tabela 2. Estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia.....	24
Tabela 3. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, com outlier, e o Grupo ICC.....	38
Tabela 4. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, com outlier, e o Grupo HSIL+ICC.....	38
Tabela 5. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, com outlier, e o Grupo LSIL+HSIL+ICC.....	39
Tabela 6. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, sem outlier, e o Grupo ICC.....	39
Tabela 7. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, sem outlier, e o Grupo HSIL+ICC.....	40
Tabela 8. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, sem outlier, e o Grupo LSIL+HSIL+ICC.....	40
Tabela 9. Comparação dos valores de Homocisteína entre o Grupo TT e o Grupo CC+CT.....	41
Tabela 10. Comparação dos valores de Homocisteína entre o Grupo CT+TT e o Grupo CC.....	41

Lista de siglas e abreviaturas

ASC	Células pavimentosas atípicas
C	Citosina
CBS	Cistationina β -sintase
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
dTMP	Monofosfato de timidina
dUMP	Monofosfato de uridina
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
H₂S	Sulfeto de hidrogénio
Hcys	Homocisteína
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSIL	Lesão intraepitelial pavimentosa de alto grau
HSPG	Proteoglicanos de heparano de sulfato
ICC	Carcinoma invasivo das células pavimentosas
LSIL	Lesão intraepitelial pavimentosa de baixo grau
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MTHFR	Metileno tetrahidrofolato redutase
MTR	Metionina sintase
MTRR	Metionina sintase redutase
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Quadro de leitura aberto
PET scan	Tomografia por emissão de positrões
PNV	Programa Nacional de Vacinação
Rb	Retinoblastoma
SAM	S-adenosilmetionina
T	Timina
THF	Tetrahidrofolato

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. EPIDEMIOLOGIA	8
1.2. ETIOLOGIA	9
1.2.1. FATORES DE RISCO	9
1.2.2. VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)	10
1.3. FISIOPATOLOGIA.....	15
1.4. PREVENÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA.....	18
1.4.1. VACINAÇÃO	19
1.4.2. RASTREIOS	21
1.5. SINAIS E SINTOMAS, DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO	22
1.5.1. SINAIS E SINTOMAS	22
1.5.2. DIAGNÓSTICO	23
1.5.3. ESTADIAMENTO.....	23
1.6. TRATAMENTO	25
1.7. HOMOCISTEÍNA, FOLATO, METABOLISMO DE 1 CARBONO E RISCO DE CANCRO	26
1.8. GENE <i>MTHFR</i>	29
1.8.1. POLIMORFISMOS DO GENE <i>MTHFR</i>	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL	33
3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS	35
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL	35
4.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E DIFERENTES GRAUS DE LESÃO DO COLO DO ÚTERO	36
4.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DE <i>MTHFR</i> E OS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA	40
5. DISCUSSÃO	42
5.1. DISCUSSÃO DA CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL	42
5.2. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA E DIFERENTES GRAUS DE LESÃO DO COLO DO ÚTERO	43
5.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DE <i>MTHFR</i> E OS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA	45
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O cancro do colo do útero é um problema de saúde pública relevante. Este é o quarto cancro mais frequentemente diagnosticado e a quarta causa de morte por cancro em mulheres, a nível mundial (Sung et al., 2021). Apesar de tudo, é considerado um cancro prevenível. Tendo em conta esta prevalência tão elevada, principalmente em países menos desenvolvidos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem realizado um esforço na implementação de programas de prevenção. Estes visam diminuir a incidência e mortalidade por cancro do colo do útero. Para tal, a nível de prevenção primária, é oferecida a vacinação contra o Vírus do Papiloma Humano (HPV). A nível de prevenção secundária, têm sido implementados programas de rastreio nacionais. Além destas medidas preventivas, é necessário investir também num tratamento adequado e de qualidade (WHO, 2022).

De forma a garantir a eliminação do cancro do colo do útero até 2030, e tendo definido um limiar de incidência de 4 casos por 100 000, a OMS criou uma estratégia global com alvos “90-70-90”: 90% de raparigas até aos 15 anos com a vacinação completa contra o HPV; 70% das mulheres rastreadas com um teste de alta performance até aos 35 anos, e de novo aos 45 anos; 90% das mulheres que forem diagnosticadas recebem tratamento (WHO, 2022). Apesar dos países desenvolvidos já terem um grande avanço na implementação destas medidas, a situação nos países em desenvolvimento é variável (Bhatla et al., 2019). Assim, de modo a atingir estes alvos com sucesso, é necessário um maior investimento na formação dos profissionais de saúde, nas redes de comunicação com as comunidades e na monitorização das medidas de prevenção já implementadas.

1.1. Epidemiologia

Como já explicitado previamente, e segundo dados da GLOBOCAN 2020, este é o quarto cancro mais frequentemente diagnosticado e a quarta causa de morte por cancro em mulheres (Sung et al., 2021). Segundo a OMS, foi o oitavo cancro mais comum no geral, a nível global. Foi também a nona causa de morte por cancro, em 2022, com 661 044 novos casos e 348 186 mortes (WHO, 2024). É o cancro mais comum em 25 países, muitos dos quais pertencentes a África subsariana (WHO, 2024).

Segundo um estudo publicado na Acta Médica Portuguesa, em Portugal, por cada 100 mortes ocorridas por tumores malignos em mulheres em 2014, 2 foram por cancro do colo do útero. Quase 25% destes óbitos ocorreu em mulheres com idade inferior a 55 anos (Teixeira et al., 2019). Apesar disso, atualmente é considerado um cancro evitável, já que se inicia através de lesões pré-malignas, que demoram vários anos até malignizarem. Estas lesões podem ter uma deteção precoce por meio de citologias, mais conhecidas como exames de Papanicolau e testes de HPV, fundamentais para o diagnóstico precoce e tratamento bem-sucedido do cancro do colo do útero (Cohen et al., 2019).

É sabido que a infeção por HPV é uma causa necessária para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. As infeções do trato ano-genital causadas pelo HPV têm uma prevalência de 70 milhões de casos e uma incidência de 14 milhões de novas transmissões por cada ano. É, assim, uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns (Harden & Munger, 2017).

1.2. Etiologia

1.2.1. Fatores de risco

Existem vários fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. Estes incluem o uso de contraceptivos orais por mais de 5 anos, múltiplos parceiros sexuais, início precoce da vida sexual, multiparidade, dieta, tabagismo e imunossupressão, incluindo a que resulta da infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Bicho, 2011). O tabagismo está relacionado com um maior risco de carcinoma de células pavimentosas, mas não de adenocarcinoma. No entanto, este risco diminui para metade, 10 anos depois da cessação tabágica (Wiperman et al., 2018). O mecanismo por trás do aumento de risco deste cancro em mulheres que tomam contraceptivos orais parece estar relacionado com o efeito dos esteroides sexuais na expressão de oncogenes. Este risco também parece diminuir após a suspensão dos contraceptivos (Wiperman et al., 2018).

Apesar de tudo, o principal fator de risco é a infeção por HPV, uma infeção sexualmente transmissível. Esta é uma causa necessária para o desenvolvimento do

cancro do colo do útero (Teixeira et al., 2019). Sabe-se que a infecção persistente pelos subtipos de alto risco do HPV é a causa principal da maioria dos casos de cancro (Crosbie et al., 2013).

Por outro lado, há fatores semelhantes que podem contribuir para o aumento da suscetibilidade à infecção por HPV. Estes incluem predisposição genética, fatores hormonais, fatores sexuais e reprodutivos, infecção por *Chlamydia trachomatis*, resposta imune do hospedeiro à infecção e tabagismo. Além disso, também se tem colocado a hipótese de que alterações no microbioma vaginal podem contribuir para este processo (Castanheira et al., 2020). No entanto, os únicos fatores de risco claros para a persistência e progressão do HPV são imunodeficiência (como infecção por HIV ou transplantados) e o tipo de HPV (Crosbie et al., 2013; Rahangdale et al., 2022).

1.2.2. Vírus do Papiloma Humano (HPV)

O Vírus do Papiloma Humano é transmitido através da via sexual e é uma das infecções virais sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo. A maioria dos indivíduos sexualmente ativos, de ambos os sexos, vai adquirir este vírus em algum ponto da sua vida. Também se estima que a sua prevalência em países desenvolvidos atinge o seu pico em mulheres jovens, diminuindo após os 35 anos de idade (Crosbie et al., 2013). Estima-se que, a nível global, a prevalência de HPV em mulheres saudáveis com idade superior a 30 anos esteja por volta dos 11.7% (Bhatla et al., 2021). A prevalência de HPV tem um pico de 25% nas mulheres com menos de 25 anos (Bhatla et al., 2019), o que realça o facto de esta infecção ser transmitida pela via sexual.

A infecção por HPV afeta a pele e as membranas mucosas, causando lesões intraepiteliais pavimentosas, inicialmente de baixo grau, que normalmente regredem e desaparecem sem ser necessário algum tipo de intervenção. No entanto, pode manter-se detetável por um período prolongado, em cerca de 10% dos casos. Esta persistência da infecção pode depois levar ao desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (do inglês *cervical intraepithelial neoplasia, CIN*) de grau 2 ou superior (Teixeira et al., 2019).

É com base na patogénese do HPV que o projeto *LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions)* sugeriu

uma terminologia recomendada para reportar as lesões causadas pelo HPV, observadas nas citologias cervicais: lesão intraepitelial pavimentosa de baixo grau (LSIL, *low-grade squamous intraepithelial lesion*), que reflete uma infecção transitória com baixo risco de progressão; e de alto grau (HSIL, *high-grade squamous intraepithelial lesion*), uma infecção persistente com alto risco de progressão para cancro (Darragh et al., 2013). Em consequência, o modelo atualmente utilizado para a classificação das citologias cervicais é o sistema de Bethesda, que foi revisto em 2014. Este sistema divide os resultados em: “negativo para lesão intraepitelial ou malignidade”, “anomalia das células epiteliais” e “outro”. Por sua vez, as anomalias das células epiteliais podem corresponder a células pavimentosas, presentes no exocolo uterino, ou a células glandulares, pertencentes ao endocolo. As alterações a nível das células pavimentosas podem, então, ser classificadas como: ASC (células pavimentosas atípicas), LSIL, HSIL e ICC (carcinoma invasivo das células pavimentosas) (Pangarkar, 2022).

Em relação à classificação normalmente utilizada nos resultados da histopatologia cervical, relativa à displasia celular, as lesões de baixo grau (LSIL) correspondem à Neoplasia Intraepitelial Cervical I, ou CIN I (do inglês, *cervical intraepithelial neoplasia*), e as de alto grau (HSIL) correspondem ao CIN II e III. Adicionalmente, caso a displasia invada a membrana basal, recebe a classificação de Carcinoma *in situ* (CIS) (Waxman et al., 2012).

Estão atualmente identificados mais de 150 tipos de HPV, sendo que a maioria destes afeta o ser humano (Oyouni, 2023) e cerca de 45 infetam a mucosa genital (Oliveira et al., 2013). Os HPVs podem ser classificados como de baixo ou alto risco, com base na sua associação clínica a lesões precursoras, geralmente benignas, ou lesões com propensão para a progressão e malignidade (Bhat, 2022).

A infecção por um HPV de baixo risco, como os tipos 6 e 11, está associada a lesões de baixo grau. Pode originar condilomas cervicais ou CIN I/LSIL (Bhat, 2022). Além das lesões no útero, pode também causar verrugas ano-genitais ou hiperplasia epitelial focal oral (Doença de Heck), dependendo do local de infecção (Harden & Munger, 2017).

Os 13 subtipos de alto risco, ou oncogénicos, causam neoplasia intraepitelial, que pode progredir para carcinoma invasivo. Estes causam aproximadamente 5,2% de todos os cancros a nível mundial (Harden & Munger, 2017). Os tipos mais comuns associados ao cancro do colo do útero são, por ordem decrescente: 16, 18, 58, 33, 45, 31, 52, 35

(Crosbie et al., 2013). Mais especificamente, os tipos 16 e 18 são detetados em até 70% de todos os câncros do colo do útero (Harden & Munger, 2017). O tipo 16 tem sido detetado em 24% das mulheres com infecção por HPV, e o tipo 18 tem sido detetado em cerca de 9% (Crosbie et al., 2013). A infecção por HPV de alto risco também é responsável por 95% dos câncros anais, 70% dos orofaríngeos, 60% dos vaginais, 50% dos vulvares e 35% dos câncros do pênis (Gillison et al., 2008). O subtipo 16 é o mais frequentemente encontrado nestes câncros (Harden & Munger, 2017).

Apesar da infecção pelos tipos de HPV oncogénicos ser comum, 80% são eliminados dentro de 3 anos pelo sistema imune do hospedeiro. Apenas cerca de 3% progride para lesões pré-malignas ou malignas, normalmente num intervalo de 7 anos. Assim, a infecção por HPV é necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento de cancro do colo do útero. Ainda mais, como as partículas virais não são produzidas no tumor, a existência de cancro não traz uma vantagem evolutiva ao vírus. Portanto, o desenvolvimento de cancro é uma consequência rara, e não propriamente o “objetivo” da infecção por HPV (Nelson & Mirabello, 2023).

Estes são vírus pertencentes à família *Papillomaviridae*, com 50-60 nm de diâmetro, sem envelope. Cada partícula viral contém uma única molécula de ADN circular de dupla cadeia, com aproximadamente 8000 pares de bases (Harden & Munger, 2017). O seu genoma é dividido funcionalmente em duas regiões: uma região reguladora não-codificante (do inglês, *non-coding upstream regulatory region*, ou URR) e uma região codificante, representada por um quadro de leitura aberto (em inglês *open reading frame*, ou ORF) (Bhat, 2022) (**Figura 1**). Uma ORF é definida como uma sequência de codões, que se inicia com um codão de iniciação (normalmente AUG), que indica o início da tradução, seguida de um codão de terminação, ou “stop” (UAA, UAG ou UGA). A tradução termina após o quadro de leitura aberto, depois do codão de terminação, originando uma proteína (Kute et al., 2022).

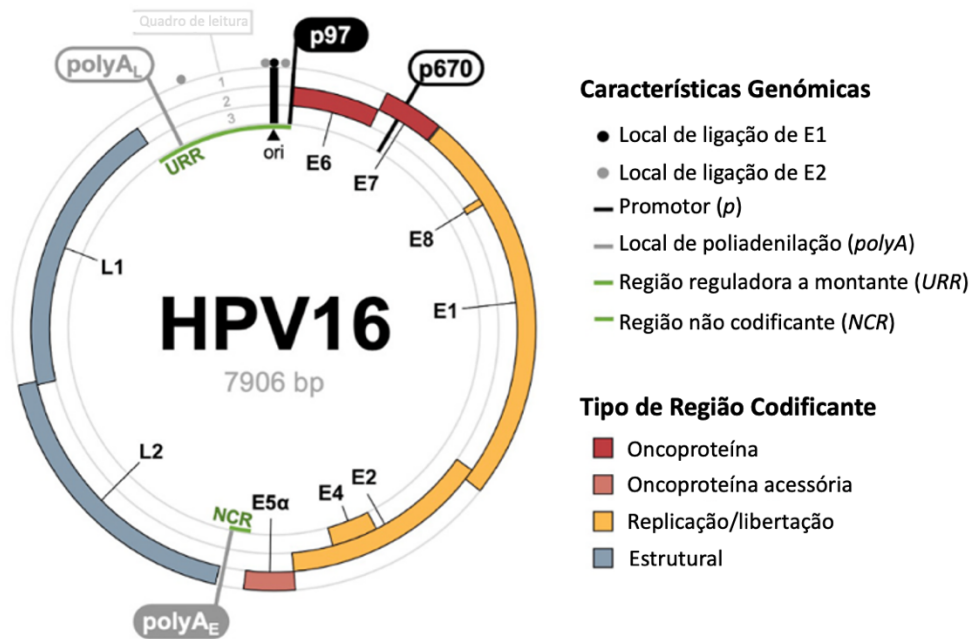


Figura 1. Diagrama do Vírus do Papiloma Humano tipo 16. O genoma circular do HPV16, composto por ADN de cadeia dupla, com aproximadamente 7900 pares de bases, é representado por 3 quadros de leitura: 1 (mais exterior), 2 (a meio), 3 (mais interior), onde o quadro de leitura 1 se inicia na posição 1 do genoma. Os quadros de leitura aberta codificantes de proteínas estão representados através de retângulos coloridos no quadro de leitura adequado. E8 (em 2), é codificada na sua totalidade dentro de E1 (em 1), e E4 (em 3) é codificada dentro de E2 (em 2). E4 é o único que ocupa o quadro de leitura aberta 3 no HPV16. Os promotores (*p*) iniciais e tardios estão representados por p97 e p670, respetivamente. Os locais de poliadenilação (*polyA*) iniciais e tardios estão representados por polyA_E e polyA_L, respetivamente. Os círculos pretos e cinzentos representam os locais de ligação de E1 e E2, respetivamente (Adaptado de *Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity*, 2023, Nelson & Mirabello).

A região não-codificante, apesar de não codificar proteínas, contém elementos necessários para a regulação da expressão génica e replicação do ADN. A região codificante ou ORF pode ser dividida em *early* ou *late region*, com base no tempo específico da duração desde a infeção. Os genes denominados *early* são expressos pouco tempo depois de ocorrer infeção e antes da replicação do ADN. Os produtos destes genes estão envolvidos na replicação e expressão de ADN viral e na transformação da célula hospedeira. Há um total de 7 *early genes*, desde o E1 ao E7 (Tabela 1). O seu número corresponde ao seu tamanho, ou seja, quanto maior o número, menor a ORF correspondente. A expressão dos produtos destes genes vai determinar se a infeção por HPV é ativa ou latente, ou se pode levar a transformação

maligna. Os *late genes*, L1 e L2, codificam proteínas estruturais das partículas virais, as proteínas major e minor, respetivamente, da cápside viral. São ativados nas fases finais do ciclo do vírus (Bhat, 2022). Como L1 é a ORF menos variável (mais conservada), a sua sequência é usada para definir os tipos de HPV. Apesar de tudo, L1 contém 5 regiões altamente variáveis, com cerca de 10-30 codões cada, que codificam “*outward-facing loops*”. Estes *loops* contêm epítomos dos anticorpos neutralizantes de L1, necessários para a imunidade induzida pelas vacinas. Assim, as diferenças genéticas em L1, usadas para definir os diferentes tipos, correspondem a diferenças antigénicas e podem refletir um processo de seleção natural envolvido na evasão imune (Nelson & Mirabello, 2023).

Tabela 1. Função dos genes relacionados com o HPV (Adaptado de *The ‘Why and How’ of Cervical Cancers and Genital HPV Infection*, 2022, Bhat).

Proteína	Função no ciclo de vida do vírus
E1	Replicação do genoma: Helicase de ADN dependente de ATP
E2	Replicação, transcrição, segregação e encapsidação do genoma Regulação da expressão génica celular; Regulação do ciclo celular e apoptose
E4	Remodelação da rede de citoqueratina; paragem do ciclo celular; montagem do virião
E5	Controlo do crescimento e diferenciação celular; modulação imune
E6	Inibição da apoptose e diferenciação; regulação da forma, polaridade, mobilidade e sinalização celular
E7	Controlo do ciclo celular; controlo da duplicação dos centrossomas
L1	Proteína <i>major</i> da cápside
L2	Proteína <i>minor</i> da cápside; recrutamento de L1; montagem do vírus

E6 e E7 são as oncoproteínas primárias do HPV. Nos tipos oncogénicos, a E6 degrada p53 e a E7 o pRb. Além disso, também interagem com outras proteínas das células do hospedeiro, de forma a atrasar a diferenciação celular, promover a replicação do ADN e escapar à imunidade do hospedeiro. Pensa-se que seja necessária uma expressão contínua destas duas oncoproteínas para a manutenção do cancro do colo do útero. E5 é uma oncoproteína acessória. Apesar de ter um papel de suporte na oncogénese, não é necessária para tal. É caracterizada por regiões transmembranares altamente hidrofóbicas, que fazem a infra regulação de complexos major de

histocompatibilidade (MHC) classe I. Interrompem a apresentação dos péptidos às células T citotóxicas (CD8⁺) tendo, portanto, um papel a nível da imunidade. E1 (helicase) e E2 (proteína de ligação ao ADN) são proteínas do núcleo, envolvidas na replicação e manutenção do genoma viral. Pensa-se que E4 esteja envolvida na amplificação e libertação de viriões. É uma das ORFs mais amplamente expressas (Nelson & Mirabello, 2023).

1.3. Fisiopatologia

A progressão para cancro do colo do útero é bem conhecida. Como já exposto anteriormente, sabe-se que se desenvolve a partir da infeção persistente por HPV de alto risco, especialmente os tipos 16 e 18 (Crosbie et al., 2013). Isto acontece porque esses subtipos oncogénicos infetam células metaplásicas na zona de transformação do colo do útero, tendo depois a capacidade de integrar o seu material genético no genoma do hospedeiro. Este processo, de uma forma resumida, leva à inativação dos genes supressores tumorais p53 e Retinoblastoma (Rb), à proliferação celular, que por sua vez levam a uma acumulação de mutações, processo que é fundamental para a transformação maligna das células cervicais (Rahangdale et al., 2022).

As partículas virais de HPV estão adaptadas aos tecidos do hospedeiro, mais especificamente nas células epiteliais em diferenciação da pele e mucosa e “exploram” a maquinaria celular do hospedeiro para seu próprio benefício (Bhat, 2022).

Como se sabe, as únicas células capazes de realizar a divisão celular no epitélio pavimentoso são as células basais. Tendo isso em conta, o HPV necessita de infetar estas células específicas, de modo a estabelecer uma infeção persistente (Crosbie et al., 2013) (**Figura 2**). Pensa-se que este vírus infeta as células basais do tipo estaminal, com um ciclo de vida prolongado, de forma a manter um número estável de cópias neste reservatório inicial de células infetadas (Harden & Munger, 2017). No entanto, o HPV não consegue infetar facilmente estas células. Isto acontece porque a camada basal está protegida por várias camadas acima e o vírus não consegue penetrar as células do epitélio pavimentoso superficial maduro do colo uterino, vulva e vagina (Bhat, 2022).

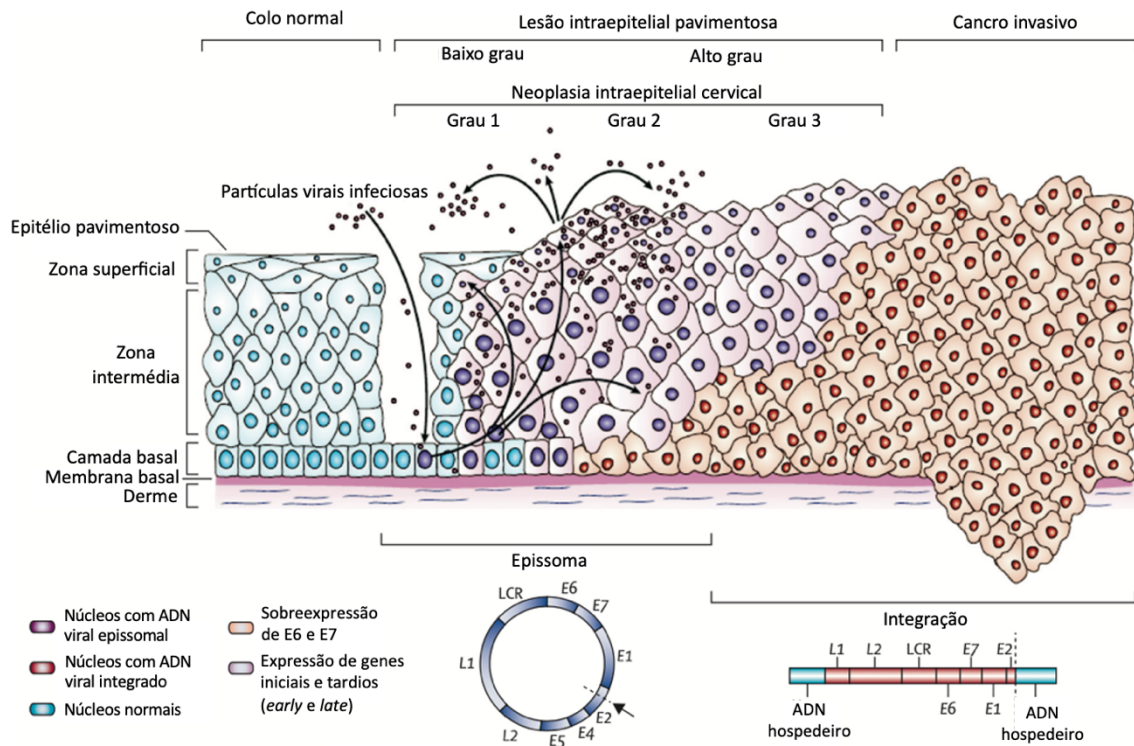


Figura 2. Ciclo de vida do Vírus do Papiloma Humano e organização do seu genoma.

As células basais no epitélio do colo uterino estão sobre a membrana basal, que é suportada pela derme. O vírus do Papiloma Humano tem acesso às células basais através de microlesões no epitélio cervical. Depois da infeção, os genes iniciais E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o ADN viral é replicado através do ADN epissomal. Nas camadas superiores do epitélio (zona intermédia e zona superficial), o genoma viral continua a replicar-se. São, então, expressos os genes tardios L1 e L2 e o gene E4. L1 e L2 são responsáveis pela formação da cápside que envolve o genoma viral, levando à formação de viriões nos núcleos. Posteriormente ocorre descamação dos vírus, que podem iniciar uma nova infeção. As lesões intraepiteliais de baixo grau apoiam a replicação viral. Infeções por HPVs de alto risco podem progredir para neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau. Caso não sejam tratadas, estas lesões podem progredir para cancro microinvasivo e invasivo. Este processo acontece pela integração do genoma do HPV nos cromossomas do hospedeiro (núcleos representados a vermelho na imagem), com perda ou disrupção de E2 e consequente sobre regulação da expressão dos oncogenes E6 e E7 (Adaptado de *Cervical Cancer, 2019, Cohen et al.*).

Para estabelecer uma infeção, é então necessário que ocorram microlesões no epitélio do colo do útero. O vírus consegue depois penetrar esta camada basal do epitélio através de interações com recetores das α -6-integrinas (Bhat, 2022). A camada basal exposta alberga várias moléculas envolvidas na sinalização e interação estrutural

na matriz extracelular. As mais importantes para o HPV são os proteoglicanos de heparano de sulfato (do inglês, *heparan sulfate proteoglycans*, HSPG) e os proteoglicanos de sulfato de condroitina. Os padrões de sulfatação das cadeias de polissacáridos nos proteoglicanos sofrem modificações que promovem vários processos importantes para a cicatrização de lesões, como o recrutamento de fatores de crescimento, proliferação celular e angiogênese. Estas modificações fornecem a “morada molecular”, que o HPV reconhece, no contexto de uma lesão. Após a ligação do vírus aos HSPG da membrana basal, o terminal-N da proteína L2 da cápside sofre uma clivagem proteolítica, que promove uma alteração da conformação da partícula viral. Esta alteração ocorre de tal forma que as regiões de L1, previamente obstruídas, ficam expostas, e o vírus torna-se assim capaz de se ligar à superfície celular de novas células epiteliais em divisão, enquanto estas tentam reparar a região lesada (Kines & Schiller, 2022). Portanto, como a cicatrização destas microabrasões implica uma replicação das células basais, com extensão lateral, o HPV aproveita este processo para seu próprio benefício (Crosbie et al., 2013).

A zona de transformação do colo do útero é uma região especialmente vulnerável a este processo, já que é uma zona de transição entre o epitélio colunar do endocolo e o epitélio pavimentoso do exocolo. Aqui, o epitélio não apresenta as microvilosidades típicas, que ligam as células epiteliais. Além disso, induz metaplasia como forma de proteção da exposição do tecido endocervical ao ambiente vaginal, tornando o epitélio mais vulnerável à entrada do vírus (Bhat, 2022).

Este processo de internalização do HPV na camada basal leva várias horas, até que o ADN viral é libertado e transportado até ao núcleo. A expressão precoce de genes é regulada nas células epiteliais basais e o ADN viral é significativamente amplificado (Crosbie et al., 2013).

Somente as células acima da camada basal, em diferenciação, que se destinam à maturação e senescência, e que não produzem a maquinaria replicativa necessária para a sobrevivência do vírus, podem passar pela replicação. Assim, para ultrapassar este obstáculo, o HPV codifica duas proteínas, E6 e E7. Estas proteínas, como já exposto anteriormente, promovem a proliferação celular, prolongam a progressão do ciclo celular e inibem a apoptose, contornando o problema inicial. Desta forma, a célula torna-se permissiva para a replicação viral e são geradas centenas ou até milhares de

genomas do HPV dentro de uma única célula (Crosbie et al., 2013). À medida que as células infetadas progridem para camadas mais superficiais do epitélio, há expressão das proteínas estruturais da cápside, L1 e L2. O ADN viral fica contido dentro da cápside e é depois libertado automaticamente quando as células à superfície sofrerem descamação (Bhat, 2022).

O ciclo de vida do HPV descrito leva de 2 a 3 semanas. Este é o tempo necessário para uma célula do colo do útero migrar das camadas basais do epitélio para as mais superficiais, amadurecer, passar por senescência e morrer (Crosbie et al., 2013). A célula deve passar por uma diferenciação terminal para completar o ciclo de vida do vírus, que é necessária para a libertação dos viriões. No entanto, em certas infeções por HPV de alto risco, as proteínas E6 e E7 são tão eficazes em bloquear os inibidores do ciclo celular, que as células infetadas nunca chegam a amadurecer. As células não sofrem apoptose e continuam a avançar através do ciclo celular. A instabilidade genómica resultante permite que as alterações genéticas se acumulem, levando, em última instância, à transformação maligna de uma célula infetada com HPV numa célula cancerígena invasiva (Crosbie et al., 2013).

Apesar da displasia de baixo grau (CIN I) normalmente regredir, pode progredir para uma displasia de alto grau (CIN II ou CIN III). O cancro do colo do útero ocorre, então, quando estas lesões de alto grau se estendem para além da membrana basal do epitélio cervical. Sem tratamento, cerca de 20% das mulheres com displasia de alto grau desenvolvem cancro cervical invasivo dentro de 5 anos (Wipperman et al., 2018).

1.4. Prevenção primária e secundária

O conhecimento da epidemiologia do HPV e o seu papel no desenvolvimento do cancro do colo do útero resultaram no desenvolvimento de duas estratégias *major* na prevenção e deteção atempada desta condição, nomeadamente: (1) vacinação contra o HPV; e (2) rastreios de lesões pré-malignas (Bhatla et al., 2021).

1.4.1. Vacinação

Esta estreita relação explica a razão dos programas de vacinação contra o HPV serem uma estratégia tão eficaz na prevenção do cancro do colo do útero. Segundo a OMS, estudos no Reino Unido, um dos primeiros países a implementar a vacina, mostram que a vacinação reduziu lesões pré-malignas e cancro do colo do útero em quase 90% (WHO, 2022). Uma revisão sistemática e meta-análise recente, que envolveu 60 milhões de indivíduos, com *follow-up* de 5-8 anos após vacinação, demonstrou uma redução de vários resultados significativos: prevalência do HPV 16 e 18 reduziu em 83% em raparigas entre os 13 e os 19 anos, e 66% entre os 20-24 anos; prevalência do HPV 31, 33 e 45 reduziu em 54% em idades dos 13-19 anos; houve uma redução dos condilomas anogenitais em 67% dos 15-19 anos, 54% dos 20-24 anos e 31% dos 25-29 anos. As lesões classificadas como CIN II+ diminuíram em 51% entre as raparigas rastreadas entre os 15-19 anos e 31% nos 20-24 anos (Drolet et al., 2019).

Estão atualmente disponíveis 3 vacinas contra o HPV, para a prevenção de lesões pré-malignas e cancro do colo do útero, vulva, vagina e ânus: (1) uma vacina bivalente, que tem como alvo os HPV 16 e 18; (2) uma quadrivalente, que além dos tipos 16 e 18, inclui também os tipos 6 e 11; (3) uma nonavalente, que inclui os tipos 31, 33, 45, 52 e 58, além dos tipos 6, 11, 16 e 18 (Bhatla et al., 2021). Ao incluir os HPV 6 e 11, as vacinas quadrivalente e nonavalente também previnem os condilomas anogenitais. Apesar de tudo, há também alguma evidência que mostra proteção cruzada para outros tipos de HPV não incluídos nas vacinas. Todas estas vacinas são recombinantes, compostas por partículas pseudovirais (do inglês *virus-like particles, VLPs*), de proteínas L1 do HPV e, portanto, não são infecciosas, já que não contêm ADN viral. Para raparigas e rapazes com idades entre os 9 e os 14 anos, é atualmente recomendado um esquema de duas doses (com um intervalo de 6-12 meses entre elas). No caso de idades iguais ou superiores a 15 anos ou imunodeprimidos, é recomendado um esquema de 3 doses (aos 0, 1-2 e 6 meses) (Bhatla et al., 2021).

Em Portugal, a vacina contra o HPV está incluída no Programa Nacional de Vacinação (PNV). Segundo a norma de 26 de janeiro, emitida nos termos da alínea a) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, e de acordo com o Despacho n.º 12434/2019, publicado no Diário da República, 2ª série – N.º 250 de 30 de dezembro de 2019, sobre o PNV, a vacina é aplicável, de forma gratuita, a raparigas com 10 anos.

Tendo em conta a transmissão por via sexual do HPV, o início da vacinação deve ser implementado em idades inferiores a 10-14 anos, de forma preventiva, para chegar aos jovens antes do início da sua atividade sexual (Bhatla et al., 2021). Desde outubro de 2020, no esquema vacinal recomendado, os rapazes com 10 anos nascidos a partir de 2009 passaram também abrangidos na população elegível para a vacina. Segundo esta norma, a vacina incluída no PNV é a nonavalente. Assim, além dos genótipos de alto risco, inclui também os que causam condilomas ano-genitais. É recomendada a sua administração em indivíduos com idade igual ou superior a 9 anos e inferior a 27 anos.

Segundo o relatório anual da vacinação de 2023, sobre dados do primeiro semestre de 2022, a vacinação contra o HPV apresentou uma cobertura de 89% em raparigas nascidas em 2010 e que, portanto, completaram os 12 anos nesse ano. A vacinação com a 1ª dose da vacina nos rapazes nascidos em 2010 e 2011 teve uma cobertura de 91%, idênticas às observadas nas raparigas. No entanto, nestas coortes, à data da colheita dos dados para o estudo, ainda não tinha sido atingida a meta dos 85% para o esquema completo (com a 2ª dose). No entanto, 85% a 87% dos rapazes nascidos em 2009 e 2010, ou seja, os primeiros a serem vacinados desde a implementação da norma de outubro de 2020, já tinham recebido a primeira dose desta vacina (Direção-Geral da Saúde (DGS), 2023). Assim, apesar de tudo, estes valores demonstram uma boa adesão à vacinação no nosso país. Esta alta taxa de vacinação contra o HPV poderá refletir-se no futuro numa diminuição do risco de desenvolvimento tanto de lesões pré-malignas e cancro, nomeadamente do colo do útero, da vagina, vulva, ânus e orofaringe, assim como de condilomas genitais. Esta é, portanto, uma medida importante para a Saúde Pública. A OMS recomenda que, de forma a atingir o objetivo de eliminar o cancro do colo do útero, os países devem atingir uma cobertura vacinal de 90% até 2030 (WHO, 2022). A forma mais eficaz de atingir este objetivo passa pela inclusão da vacina contra o HPV na imunização nacional e no investimento de estratégias de comunicação efetiva. Portugal está muito perto de atingir este objetivo.

1.4.2. Rastreios

Apesar da vacinação estar disponível e ser eficaz na prevenção da infeção por HPV, não fornece proteção aos indivíduos que já estejam previamente infetados. Além do mais, a vacina não protege contra todos os tipos de HPV (Harden & Munger, 2017). Portanto, enquanto a vacinação contra o HPV pretende prevenir a neoplasia cervical através da prevenção da infeção por HPV, o rastreio deteta lesões pré-malignas cervicais, como CIN de alto grau e adenocarcinoma *in situ* de forma precoce. Permite assim o seu tratamento eficaz, de forma a prevenir cancro invasivo e diminuir a taxa de mortalidade por cancro do colo do útero.

Existem vários métodos de rastreio: a citologia convencional, mais conhecida como exame Papanicolau, e mais recentemente, citologia em meio líquido e teste do HPV. Em países pouco desenvolvidos, também se procede à inspeção visual das lesões com ácido acético. Este processo envolve a deteção de lesões esbranquiçadas no colo uterino 1 minuto após aplicação de 3-5% de ácido acético (Bhatla et al., 2021). Além disso, mais recentemente, também se tem colocado a hipótese do uso da expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores p16 e Ki-67 como aliados no rastreio (Dovnik & Repše Fokter, 2023).

A nível nacional, existe um programa de rastreio organizado. Segundo o Despacho n.º 8254/2017, publicado a 21 de setembro no Diário da República, o rastreio é destinado “à população do sexo feminino, com idade igual ou superior a 25 anos e igual ou inferior a 60 anos”. São excluídas de forma definitiva mulheres que tenham realizado histerectomia total ou que tenham o diagnóstico de cancro do colo do útero. De forma temporária, são também escolhidas as mulheres que apresentem sinais ou sintomas ginecológicos. Este rastreio deve ser realizado a cada 5 anos, se normal, através de citologia vaginal em meio líquido, com pesquisa de ADN dos serotipos oncogénicos do HPV. Se a pesquisa for positiva para os serotipos 16 e 18, as utentes devem ser logo referenciadas para uma consulta de patologia cervical a nível hospitalar. Caso seja positiva para os restantes serotipos oncogénicos, deve ser realizada uma citologia. Se houver presença de células atípicas pavimentosas de significado indeterminado ou de alto grau, com células atípicas glandulares, assim como lesão intraepitelial de baixo ou alto grau, devem ser referenciadas para consulta de patologia cervical. Esta colheita deve ser repetida no prazo de um ano, caso a citologia tenha sido

negativa, mas a utente apresente um teste positivo para HPV anterior (Diário da República: II série, n.º 68, 2017).

A introdução de um programa de rastreio contra o cancro do colo do útero deve ser acompanhada de diretrizes que indiquem de forma clara o alvo de idades a rastrear, o tipo de teste e momento em que deve ser realizado, formas de comunicar esta estratégia à população-alvo e a abordagem a seguir no caso de um resultado positivo. Também deve mencionar os métodos de tratamento (crioterapia, ablação térmica, excisão eletrocirúrgica por alça (LEPP, do inglês *loop electrosurgical excisions procedure*) das lesões de displasia cervical e os critérios de tratamento para os cancros detetados através do rastreio (Bhatla et al., 2021).

A combinação da vacinação contra o HPV e os rastreios traz um enorme potencial de eliminar o cancro do colo do útero no futuro.

1.5. Sinais e Sintomas, Diagnóstico e Estadiamento

Apesar das recomendações a nível de prevenção e rastreio, o aparecimento de cancro do colo do útero continua a ser uma realidade. Por isso, torna-se de extrema relevância existir um conhecimento sobre a sua forma de apresentação clínica, como diagnosticar, estadiar e tratar.

1.5.1. Sinais e sintomas

Numa fase inicial, é relativamente comum que o cancro do colo do útero seja assintomático. Nestes casos, pode ser detetado apenas através de uma citologia positiva ou de forma acidental, com a visualização de uma lesão num exame pélvico de rotina. Um dos sintomas mais comuns nesta fase inicial é a hemorragia vaginal, irregular ou abundante, principalmente após as relações sexuais. Também pode aparecer um corrimento vaginal, que pode variar desde o aspeto aquoso, ao mucoide, ou purulento e com odor. Na doença avançada, pode ser experienciada dor pélvica ou lombar, com possível irradiação para os membros inferiores. Além disto, também podem apresentar alterações a nível dos hábitos intestinais ou alterações urinárias, queixas relacionadas

com pressão, hematúria, hematoquezias, ou até mesmo passagem vaginal de fezes ou urina, sugestivas de fístulas (Johnson et al., 2019).

1.5.2. Diagnóstico

Em relação à anamnese, deve ser realizado um exame pélvico completo a todas as mulheres que apresentem sintomas ou sinais que levantem a suspeita de um possível cancro cervical. A visualização do colo uterino através do espécuro pode revelar um colo de aspeto normal ou uma lesão visível a olho nu, dependendo do tamanho do tumor. No caso de aparecimento de uma lesão, deve-se proceder à realização de uma biópsia nessa zona. Além da avaliação através do espécuro, deve também ser realizado toque vaginal e reto-vaginal, de forma a avaliar o tamanho tumoral e o possível envolvimento dos tecidos envolventes da vagina. Também é possível suspeitar desta patologia no caso de aparecimento de adenopatias inguinais ou supraclaviculares (Johnson et al., 2019).

No caso de um exame pélvico ou uma citologia terem resultados anormais, opta-se pela realização de uma colposcopia, que é considerado o exame diagnóstico definitivo. Normalmente os exames de imagem, como a tomografia computadorizada, *PET scan*, ressonância magnética pélvica ou cistoscopia não são usados como parte do diagnóstico em si. No entanto, podem ser úteis no estadiamento e avaliação. O diagnóstico é feito com base no resultado histológico da biópsia do colo uterino. Os tipos histopatológicos mais frequentes de cancro do colo do útero são carcinoma de células pavimentosas (até 85% dos casos) e o adenocarcinoma (até 25%) (Johnson et al., 2019).

1.5.3. Estadiamento

O cancro do colo do útero invasivo propaga-se através de extensão direta para o paramétrio, vagina, útero e órgãos adjacentes, como a bexiga ou o reto. Também pode ter uma metastização através do sistema linfático, podendo localizar-se em gânglios linfáticos regionais, nomeadamente os obturadores, ilíacos externos, ilíacos internos, e posteriormente para os ilíacos comuns e para-aórticos. De forma mais tardia, também pode ocorrer metastização à distância por via hematogénica. Os locais mais comuns são os pulmões, fígado e osso (Bhatla et al., 2021; Wiperman et al., 2018).

O seu estadiamento é um dos fatores mais importantes para o prognóstico, seguido de outros fatores, como o volume do tumor, grau de invasão do estroma e invasão do espaço linfovascular. O estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) é atualmente um dos mais usados, e varia entre o estadio 0 e o IV (Tabela 2) (Johnson et al., 2019). O cancro do colo do útero é o único cancro ginecológico com um estadiamento clínico realizado antes da cirurgia, baseado no tamanho do tumor, profundidade de invasão, invasão de tecidos adjacentes e metástases à distância, normalmente nos pulmões, fígado e osso (Wipperman et al., 2018).

Tabela 2. Estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Adaptado de *Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management, 2019, Johnson et al.*)

Estádios FIGO	Definição
0	Carcinoma <i>in situ</i> (CIS) - Presença de células anormais na camada interior do colo, que se podem transformar em cancro e invadir os tecidos adjacentes.
I	Carcinoma cervical limitado ao colo.
IA	Carcinoma invasivo diagnosticado apenas por microscopia, com profundidade máxima de invasão < 5 mm.
IA1	Profundidade de invasão do estroma < 3 mm.
IA2	Profundidade de invasão do estroma \geq 3 mm e < 5 mm.
IB	Lesão clinicamente visível confinada ao colo ou lesão microscópica superior a IA2
IB1	Carcinoma invasivo com profundidade de invasão do estroma \geq 5 mm e dimensão máxima < 2 cm.
IB2	Carcinoma invasivo com dimensão máxima \geq 2 cm e < 4 cm.
IB3	Carcinoma invasivo com dimensão máxima \geq 4 cm.
II	Carcinoma cervical com invasão além do útero, mas não até à parede pélvica ou terço inferior da vagina.
IIA	Tumor sem invasão do paramétrio ou envolvimento do terço inferior da vagina.
IIA1	Lesão clinicamente visível com dimensão máxima < 4 cm e envolvimento de menos dos dois terços superiores da vagina.
IIA2	Lesão clinicamente visível com dimensão máxima > 4 cm e envolvimento de menos dos dois terços superiores da vagina.
IIB	Tumor com invasão do paramétrio, mas não até à parede pélvica.
III	Tumor com extensão até à parede pélvica e/ou envolvimento do terço inferior da vagina, e/ou que causa hidronefrose ou mau funcionamento renal, e/ou que envolve gânglios linfáticos pélvicos e/ou para-aórticos.
IIIA	Tumor invade o terço inferior vaginal, sem extensão até à parede pélvica

IIIB	Tumor com extensão à parede pélvica e/ou hidronefrose ou alteração renal
IIIC	Tumor invade gânglios linfáticos pélvicos e/ou para-aórticos, independentemente do tamanho e extensão tumoral.
IV	Tumor invade mucosa vesical ou retal (comprovado por biópsia), e/ou com extensão além da pelve.
IVA	Tumor invade órgãos pélvicos adjacentes.
IVB	Tumor invade órgãos à distância.

1.6. Tratamento

A escolha do tratamento depende de vários fatores, incluindo o estadió, a presença de metastização à distância, o tamanho do tumor e o estado geral da doente e suas comorbilidades e fatores de risco para recorrência (Wipperman et al., 2018). Pode incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou uma combinação dos anteriores (Johnson et al., 2019).

As mulheres com doença microinvasiva (estadio IA1) e sem invasão do espaço linfovascular podem ser tratadas com uma histerectomia simples, se as margens forem negativas. Na doença inicial (estadio IA-IB1), pode-se optar por uma histerectomia radical e linfadenectomia pélvica. Mulheres que não sejam candidatas à cirurgia podem realizar tratamento primário com radioterapia ou quimioterapia. Na doença localmente avançada (estadio IB3, IIA2, III, IVA), o tratamento passa pela quimioradioterapia. Em doentes com metastização à distância (estadio IVB), pode ser considerada quimioradioterapia, dependendo do prognóstico da doente. Também se pode optar por radioterapia paliativa e/ou quimioterapia sistémica, para controlo sintomático (Wipperman et al., 2018).

Caso haja um desejo de preservar a fertilidade, em estadios iniciais, pode-se realizar a conização (com ou sem linfadenectomia), ou cervicectomia radical. A conização consiste na excisão da porção em forma de cone do colo uterino, incluindo o exocolo, endocolo e zona de transformação. No entanto, estas opções não são recomendadas em tumores a partir do estadio IB1 e superiores a 2cm (Wipperman et al., 2018).

1.7. Homocisteína, Folato, Metabolismo de 1 carbono e risco de cancro

Nos últimos anos tem existido uma grande especulação em relação ao papel do folato e da homocisteína no risco de neoplasia cervical. Vários estudos observacionais de lesões pré-malignas e carcinoma invasivo cervical e estudos sobre o efeito da suplementação de folato na displasia cervical têm mostrado resultados conflituosos (Weinstein et al., 2001).

A homocisteína é um aminoácido com um papel importante em vários processos biológicos. Deriva da metionina e é homóloga da cisteína. A sua concentração pode ser regulada através de duas vias: remetilização de volta a metionina; ou transsulfuração para cisteína, com a produção simultânea de sulfeto de hidrogénio (H₂S) (**Figura 3**).

Existem vários fatores que podem condicionar o aumento dos níveis de homocisteína no organismo, tais como fatores genéticos, estilo de vida, dieta ou fármacos (Hermann & Sitdikova, 2021). A sua presença em níveis elevados está associada a um maior risco de desenvolvimento de doenças neurovasculares, demência, enxaqueca, epilepsia e até mesmo de dificuldades no neurodesenvolvimento. A neurotoxicidade da homocisteína pode ser explicada por stresse oxidante e lesão no ADN. A inflamação que ocorre quando os níveis de homocisteína estão aumentados leva a um aumento dos níveis de várias citocinas e ocasiona mudanças na metilação do ADN (Hermann & Sitdikova, 2021).

O H₂S também regula vários processos fisiológicos e tem um potencial de neuroproteção. Assim, a diminuição dos níveis de H₂S na hiperhomocisteinemia pode também ser um fator contribuidor para esta neurotoxicidade. Ademais, o aumento dos níveis de homocisteína é também conhecido como fator de risco para aterosclerose sistémica e doença cardiovascular, além de várias condições oculares, como retinopatia diabética e degenerescência macular relacionada com a idade. Esta disfunção na barreira entre a corrente sanguínea e a retina tem vindo a ser explicada pelo stresse oxidante, stresse no retículo endoplasmático, inflamação e alterações epigenéticas causadas pela hiperhomocisteinemia (Hermann & Sitdikova, 2021).

A hiperhomocisteinemia é definida quando o nível plasmático é superior a 15 µmol/L (Ravaglia et al., 2006). Observa-se um aumento dos níveis de Homocisteína em cerca de 5-7% da população no geral. O seu metabolismo depende da função de várias enzimas, tais como a metionina sintase (MTR), a metiltetrahidrofolato redutase

(MTHFR), a Cistationina β -sintase (CBS), a metionina sintase redutase (MTRR), entre outros. Depende também da disponibilidade de cofatores, tais como a vitamina B6, B12 e folato (Ostrakhovitch & Tabibzadeh, 2019).

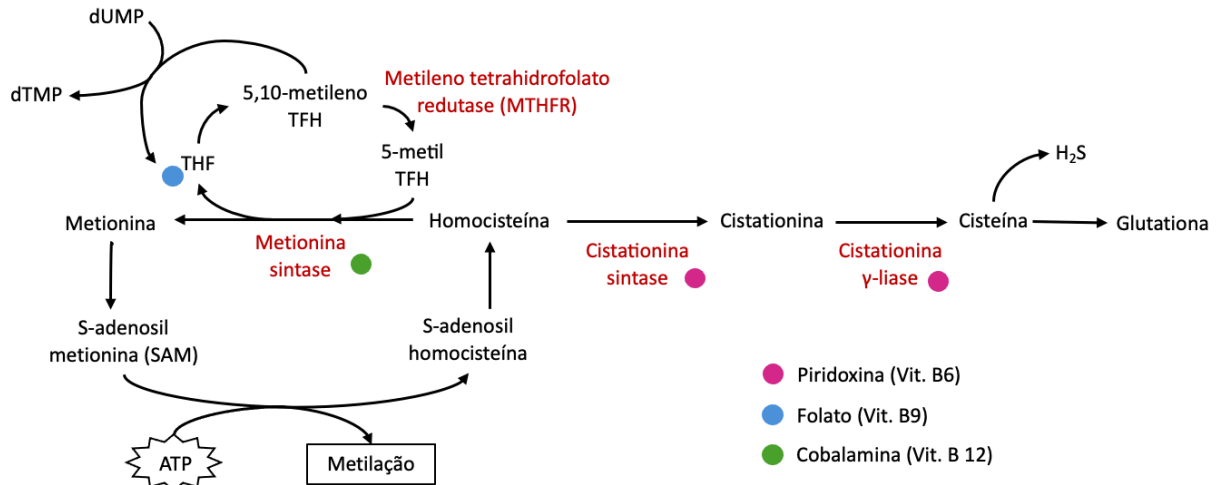


Figura 3. Metabolismo da Homocisteína. Representação esquemática dos passos-chave no metabolismo da homocisteína. *THF* = tetrahidrofolato, *ATP* = Adenosina Trifosfato, *H₂S* = sulfeto de hidrogénio. (Adaptado de *Routes of AA carbon skeleton metabolism*, AMBOSS, 2024; *Anti-inflammatory Role of Anthocyanins in the Prevention of Hyperhomocysteinemia-Mediated Cardiometabolic Diseases*, Bhatt et al., 2021; *One-Carbon Metabolism in Health and Disease*, Ducker & Rabinowitz, 2017).

Os níveis de homocisteína sérica podem ser considerados como um biomarcador sensível da escassez de folato (Weinstein et al., 2001). Por sua vez, o metabolismo do folato, ou vitamina B9, é a base de um conjunto alargado de transformações, conhecido como o metabolismo de monocarbonos (1C). Este é um processo metabólico universal e essencial para a função celular, onde há ativação e transferência de unidades de 1C usadas para vários processos biossintéticos, como a síntese de purinas e pirimidinas, metabolismo dos aminoácidos, como da metionina ou a remetilação da homocisteína e formação de S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é doadora de aminopropil e metil sendo, portanto, o agente primariamente responsável pela metilação de ADN (Weinstein et al., 2001). Enquanto a maioria das bactérias, fungos e plantas consegue sintetizar folato, os animais, incluindo o ser humano, necessitam de consumir folato na dieta. Devido ao seu papel essencial na síntese de ácidos nucleicos, a inibição do seu metabolismo impede a proliferação celular (Ducker & Rabinowitz, 2017). Níveis

inadequados de folato impedem a replicação de ADN e a divisão celular, tendo um impacto negativo nos tecidos com divisão celular rápida, como a medula óssea, levando a uma menor produção de células sanguíneas (Zarembaska et al., 2023). É na base deste processo que estão baseados os inibidores do metabolismo do folato, amplamente usados na quimioterapia. Alguns exemplos destes fármacos com atuação neste metabolismo são o metotrexato, um inibidor da dihidrofolato-redutase, o 5-fluorouracil ou o pemetrexed (Ducker & Rabinowitz, 2017). A interrupção deste metabolismo pode interferir com a síntese, reparação e metilação de ADN, que por si acaba por levar à promoção da carcinogénese. Além disso, baixos níveis de folato podem causar “*chromosomal fragile sites*”, que também podem estar envolvidos no aparecimento de cancro. O HPV pode ser integrado no genoma do hospedeiro nesses “*fragile sites*”, ou perto deles, contribuindo para o desenvolvimento de cancro cervical (Weinstein et al., 2001).

Portanto, níveis elevados de homocisteína podem, como já percebemos, levar à lesão no ADN e stresse oxidante, fatores que são conhecidos como contribuidores para a malignização. Alguns estudos têm relacionado os níveis de homocisteína com a possibilidade de desenvolvimento de alguns cancros (Rehman et al., 2020; Zhang et al., 2015), nomeadamente o cancro do colo do útero (Weinstein et al., 2001). Aparentemente, os níveis elevados de homocisteína podem estar associados a estadios mais avançados, sem diferenças estatisticamente significativas em estadios ainda iniciais (Hasan et al., 2019). Vários estudos clínicos epidemiológicos (Peitz et al., 2024; Piyathilake et al., 2004) têm mostrado que os níveis de folato podem não aumentar diretamente o risco de displasia cervical, mas sim aumentar a infeção por HPV. Assim, apesar da falta de associação estatística significativa entre os níveis de folato e displasia cervical, estes ensaios clínicos indicam que o folato pode estar relacionado com o HPV para o desenvolvimento de carcinogénese (Long et al., 2012).

Este aparente papel do folato na carcinogénese do tecido uterino tem levado a várias investigações de polimorfismos nas enzimas relacionadas com o seu metabolismo. Sabe-se que a enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) é essencial para a regulação do metabolismo do folato e metionina, ambos importantes na metilação e síntese de ADN (Long et al., 2012).

1.8. Gene *MTHFR*

O gene *MTHFR* está localizado no braço curto do cromossoma 1 (1p36.3), é composto por 12 exões e tem 20 374 pares de bases (Zarembaska et al., 2023). Fornece instruções para a síntese da enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR). Esta enzima tem a função de processar aminoácidos, sendo especialmente importante no metabolismo do folato, também conhecido como vitamina B9 (*MedlinePlus*, sem data).

Durante a transcrição do gene *MTHFR* ocorre excisão (mais conhecido do inglês como *splicing*) alternativa, que resulta em três moléculas diferentes de mRNA, com 7074, 7018 e 7071 pares de bases, que codificam polipéptidos de 697, 656 e 696 aminoácidos, respetivamente. Tendo isto em conta, distinguem-se então 3 variantes do transcrito do *MTHFR* humano: *MTHFR* 1, 2 e 3, que diferem na extremidade 5'. Assim, os diferentes tamanhos dos transcritos são explicados pelos diferentes locais de iniciação da transcrição (Zarembaska et al., 2023). Apesar de ainda não existir evidência sobre a relevância biológica desta variabilidade de transcrição, foram descobertos polipéptidos de aproximadamente 77kDa nos tecidos humanos, enquanto uma isoforma proteica de 70kDa foi detetada apenas no tecido hepático humano (Hombberger et al., 2000).

A enzima MTHFR, que é NADPH-dependente (Ducker & Rabinowitz, 2017), tem uma grande importância no metabolismo do folato e da homocisteína (Zarembaska et al., 2023). A MTHFR catalisa a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metileno-THF), uma forma de folato, em 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF), uma forma diferente de folato (**Figura 3**). O 5,10-metileno-THF é também essencial para a conversão de monofosfato de uridina (dUMP) em monofosfato de timidina (dTMP) (Hajjesmaeil et al., 2016).

O 5-metil-THF é o metabolito biologicamente ativo que advém da ingestão de ácido fólico (Zarembaska et al., 2023). É a forma primária de folato encontrada na corrente sanguínea (Ducker & Rabinowitz, 2017), representando cerca de 90% da concentração total de folato (Zarembaska et al., 2023). O ácido fólico em si não tem a capacidade de funcionar como uma coenzima. Necessita de ser reduzido em dihidrofolato (DHF) e posteriormente em THF (Zarembaska et al., 2023). O 5-metil-THF é necessário para o processo de conversão, mais especificamente remetilação, do aminoácido homocisteína no aminoácido metionina. Neste processo, a homocisteína é

substrato da enzima metionina-sintase (MTR), que é dependente da cobalamina (vitamina B12) (Ducker & Rabinowitz, 2017). Esta reação catalisada pela metionina sintase tem também como produto o tetraidrofolato que, tal como o metilenoTHF, está envolvido na síntese de purinas (Bicho, 2011).

O processo de remetilação da homocisteína é de extrema importância fisiológica, pois a metionina é um substrato usado para a formação de proteínas e outros componentes importantes, nomeadamente a SAM, através da SAM sintetase. A SAM é o segundo cofator enzimático mais comum, a seguir ao ATP (Ducker & Rabinowitz, 2017), e é necessária, como já exposto previamente, para a metilação de citosinas, lisinas e histonas no ADN e regulação da transcrição génica (Hajiesmaeil et al., 2016).

Existem várias patologias associadas a alterações neste gene, tais como a homocistinúria, alopecia areata, anencefalia, espinha bífida e surdez relacionada com a idade (*MedlinePlus*, sem data).

1.8.1. Polimorfismos do gene *MTHFR*

A primeira documentação do envolvimento do gene *MTHFR* numa doença foi reportada em 1972, por *Mudd et al.* e foi responsável por identificar doentes com homocistinúria, que foi atribuída a uma deficiência significativa na *MTHFR* obtida a partir de fibroblastos (Mudd et al., 1972).

Atualmente, têm sido identificados vários polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) no gene *MTHFR*. No entanto, estudos epidemiológicos têm mostrado que os mais frequentes são C677T e A1298C, que afetam a atividade enzimática e podem condicionar um risco maior ou menor de desenvolvimento de vários tipos de cancro (Botezatu et al., 2013; Hajiesmaeil et al., 2016).

A mutação mais comum é a transição de uma citosina (C) para uma timina (T) no nucleótido 677 (**C677T**) no exão 4, que resulta na substituição do aminoácido alanina por uma valina. Isto afeta o domínio catalítico da enzima, culminando na redução da sua atividade (Hajiesmaeil et al., 2016; Long et al., 2012). Este local é crucial para a ligação do dinucleótido de flavina e adenina (FAD) e para a estabilidade enzimática. O alelo

677T, ou seja, o alelo mutado, codifica uma enzima termolábil com atividade reduzida e menor afinidade para o seu cofator FAD (Zarembka et al., 2023).

A atividade residual da enzima MTHFR é cerca de 18-22% nos indivíduos homocigóticos (TT) para esta mutação, e de 56% para os heterocigóticos (CT) (Botezatu et al., 2013). Os indivíduos heterocigóticos, com alguma disfunção na síntese de 5-metil-THF, têm demonstrado uma ligeira elevação dos níveis plasmáticos de homocisteína (Zarembka et al., 2023).

A homocigotia do polimorfismo C677T foi frequentemente associada a diferentes tipos de cancro (colorretal, carcinoma hepatocelular) e doenças cardiovasculares (Botezatu et al., 2013).

As variações genéticas que levam a uma menor atividade da enzima MTHFR podem diminuir os níveis de folato, essencial para a síntese de pirimidinas e purinas, que por sua vez são importantes para a reparação de ADN. Podem também diminuir os níveis de SAM, necessários para metilação do ADN (Bicho, 2011; Hajiesmaeil et al., 2016). Isto é relevante porque esta enzima mantém os padrões de metilação de ADN e é uma forma essencial de controlo epigenético na estabilidade do genoma e regulação da transcrição génica (Botezatu et al., 2013). Assim, variantes neste gene vão levar a uma expressão génica instável, diminuição nos mecanismos de reparação do ADN, com consequente aumento das lesões no ADN e, como tal, um risco aumentado de carcinogénese. Por outro lado, uma diminuição da atividade da enzima MTHFR aumenta a disponibilidade de 5,10-metileno-THF, que aumenta a síntese de dTMP a partir de dUMP, levando à diminuição da incorporação de uracilo no ADN, e diminuindo assim o risco de carcinogénese (Hajiesmaeil et al., 2016).

Como já referido anteriormente, a diminuição da atividade enzimática MTHFR através do polimorfismo C677T tem sido associada a diferentes tipos de cancro (Chen et al., 1996; Kimura et al., 2000; Petrone et al., 2021; Shen et al., 2001). Algumas meta-análises sugerem que este polimorfismo pode não estar associado ao cancro do colo do útero (Xu et al., 2013; Yi et al., 2016). Pelo contrário, outra meta-análise sugere que o polimorfismo C677T está associado ao risco de cancro do colo do útero na população asiática, sendo necessária uma investigação mais detalhada na população caucasiana (Guo, 2012). *Luo et al.* sugere que este genótipo pode estar associado a um risco ligeiro de neoplasia cervical na população caucasiana, apesar do estudo não apresentar

robustez estatística (Luo et al., 2012). Ainda outra meta-análise sugere que o polimorfismo C677T aumenta substancialmente o risco de cancro cervical invasivo, mas no modelo recessivo (Yu et al., 2013). Também há meta-análises que sugerem que esta associação pode ser específica de raça (Mei et al., 2012; Wu et al., 2013). Apesar de tudo, um estudo realizado na população portuguesa não mostrou associação entre o polimorfismo C677T do MTHFR e infeção por HPV ou lesões cervicais *major* (Inácio et al., 2023). Assim, torna-se evidente a necessidade de uma maior investigação para perceber o verdadeiro papel deste polimorfismo na carcinogénese uterina.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar os níveis de homocisteína circulante na doença e na sua severidade e compreender o papel modulador do gene *MTHFR* nesse fenótipo (desenvolvimento de cancro do colo do útero e das suas lesões precursoras). O polimorfismo em estudo é o C677T do gene *MTHFR*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da amostra populacional

Neste estudo foi utilizada uma base de dados, com dados previamente obtidos, disponibilizados de forma organizada. Foram estudadas 63 mulheres, que se subdividiram num grupo patológico (que inclui os grupos LSIL, HSIL e ICC) de 32 mulheres, e num grupo controlo de 31 mulheres sem patologia.

As amostras dos grupos com patologia foram colhidas de mulheres previamente referenciadas ao Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil de Lisboa e do Porto. Por sua vez, as amostras obtidas para o grupo controlo foram fornecidas pelo Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Os valores dos níveis de concentração de homocisteína obtidos do plasma estão expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.2. Análise estatística

Foi realizada análise estatística dos dados organizados nesta base de dados através do *software IBM SPSS Statistics*, versão 29.0.1.1, para *Mac OS*.

As 3 populações com patologias foram comparadas com o grupo controlo da seguinte forma:

- Grupo Controlo vs. Grupo ICC;
- Grupo Controlo vs. Grupo HSIL+ICC;
- Grupo Controlo vs. Grupo LSIL+HSIL+ICC.

Foi avaliada a normalidade da variável “Concentração de Homocisteína” (*Hcys*) e da variável “Idade” para as populações em estudo. Para esta análise estatística, utilizou-se o teste *Kolmogorov-Smirnov* sempre que o número de indivíduos da amostra era igual ou superior a 30, e o teste *Shapiro-Wilk* quando o número de indivíduos era inferior a 30. A distribuição foi considerada normal sempre que $p > 0,05$. Para populações com distribuição normal são apresentados os valores da média e desvio padrão. Por sua vez, nas populações com distribuição não normal é apresentada a mediana, valor mínimo e valor máximo.

Para averiguar se existiam diferenças significativas entre populações para a variável *Hcys*, realizou-se o teste não paramétrico *U* de *Mann-Whitney*. Para um valor de $p \leq 0,05$, foi considerada a existência de diferenças estatisticamente significativas.

Foi também efetuado o teste de Regressão Logística Binária, com ajuste dos valores de p para a idade.

Posteriormente, realizaram-se mais testes para perceber a influência do genótipo do *MTHFR* nos níveis de homocisteína, apenas na população com HPV (ou seja, no grupo LSIL+HSIL+ICC). A análise estatística do polimorfismo do gene *MTHFR* foi realizada com o teste *T-student* e seguiu os seguintes modelos:

- Comparação da presença do alelo mutante (CT + TT) *versus* ausência do alelo mutante (CC);
- Comparação entre a presença de genótipo mutante (TT) *versus* os restantes genótipos (CC + CT).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra populacional

Como previamente descrito, este estudo foi realizado com recurso a uma base de dados com 63 mulheres, sendo constituído por um Grupo Controlo e um Grupo patológico, que, por sua vez, é constituído por várias categorias de lesões, nomeadamente LSIL, HSIL e ICC. O Grupo Controlo é constituído por 31 mulheres, sem patologia do colo do útero.

Através do teste *Kolmogorov-Smirnov*, averiguou-se uma distribuição normal da idade no Grupo Controlo ($p = 0,200$) e para o Grupo LSIL+HSIL+ICC ($p = 0,200$). Através do teste *Shapiro-Wilk*, determinou-se uma distribuição normal da idade para Grupo ICC ($p = 0,719$) e para o Grupo HSIL+ICC ($p = 0,481$).

As idades do Grupo Controlo apresentam uma média de 60 anos, com um desvio padrão de 1,275.

Por sua vez, as idades do Grupo ICC possuem uma média de 50 anos, com desvio padrão de 2,635.

As idades do Grupo HSIL+ICC apresentam uma média de 49,10 anos, com desvio padrão de 2,461.

Por último, as idades do Grupo LSIL+HSIL+ICC têm uma média de 42,69 anos, com um desvio padrão de 2,350.

Após a análise descritiva das idades, realizou-se o teste *T* de *Student* para amostras independentes. Com este teste averiguou-se que existem diferenças significativas entre as idades do Grupo Controlo e as idades do Grupo ICC ($p = 0,002$); entre as idades do Grupo Controlo e as idades do Grupo HSIL+ICC ($p < 0,001$) e entre as idades do Grupo Controlo e as idades do Grupo LSIL+HSIL+ICC ($p < 0,001$).

4.2. Associação entre os níveis de Homocisteína e diferentes graus de lesão do colo do útero

De modo a avaliar a influência dos níveis de homocisteína circulante na severidade da patologia do colo do útero, realizou-se uma análise estatística para a variável *Hcys*. Através do teste *Kolmogorov-Smirnov*, averiguou-se uma distribuição não normal dos níveis de homocisteína para o Grupo Controlo ($p < 0,001$) e uma distribuição normal para o Grupo LSIL+HSIL+ICC ($p = 0,200$). Através do teste *Shapiro-Wilk*, determinou-se uma distribuição normal de homocisteína para Grupo ICC ($p = 0,942$) e para o Grupo HSIL+ICC ($p = 0,909$).

No grupo Controlo verificou-se que a concentração de homocisteína varia entre o valor mínimo de 1,822 $\mu\text{mol/L}$ e o máximo de 168,625 $\mu\text{mol/L}$, com uma mediana de 13,016 $\mu\text{mol/L}$. Estes dados encontram-se representados nas **Tabelas 3, 4 e 5**.

Ao observar esta grande amplitude de valores, reparou-se que o valor de homocisteína de 168,625 $\mu\text{mol/L}$ era muito discrepante (*outlier* extremo) em relação aos restantes, como se pode observar na **Figura 4**.

Foi, então, criada uma variável *Hcys* sem esse *outlier* extremo e repetidos os testes estatísticos. Este novo Grupo Controlo sem *outlier*, constituído por 30 mulheres, não apresenta distribuição normal segundo o teste *Kolmogorov-Smirnov* ($p = 0,002$).

O Grupo Controlo sem o *outlier* extremo tem níveis de homocisteína que variam entre o mínimo de 1,822 $\mu\text{mol/L}$ e máximo de 72,753 $\mu\text{mol/L}$, com uma mediana de 12,29 $\mu\text{mol/L}$. Estes dados encontram-se representados nas **Tabelas 6, 7 e 8**.

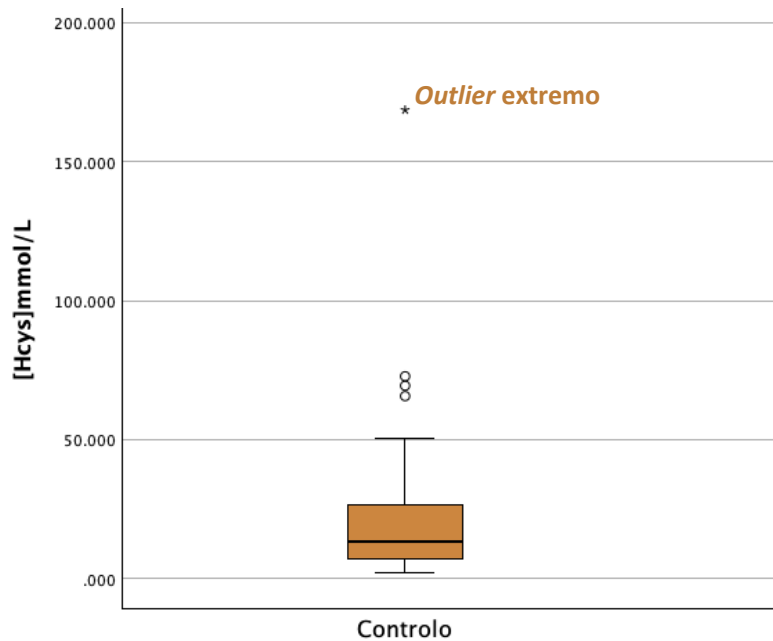


Figura 4. Distribuição de dados da concentração de homocisteína sérica no Grupo Controle. É possível observar o valor *outlier* extremo. *Hcys* = Homocisteína.

O Grupo ICC é constituído por 18 mulheres, com carcinoma invasivo do colo do útero. Neste grupo os níveis de homocisteína variam entre o valor mínimo e máximo 0,524 e 14,961 $\mu\text{mol/L}$, respetivamente, apresentando uma mediana de 6,967 $\mu\text{mol/L}$. Estes dados estão resumidos nas **Tabelas 3 e 6**.

O Grupo HSIL+ICC contém 20 mulheres, que apresentam lesão pavimentosa intraepitelial de alto grau ou carcinoma invasivo do colo do útero. Verificou-se que os valores da concentração de homocisteína neste grupo variam entre 0,524 $\mu\text{mol/L}$ (valor mínimo) e 14,961 $\mu\text{mol/L}$ (valor máximo), com uma mediana de 6,967 $\mu\text{mol/L}$. Estes dados estão resumidos nas **Tabelas 4 e 7**.

O Grupo LSIL+HSIL+ICC é constituído por 32 mulheres, com lesão pavimentosa de baixo ou alto grau ou carcinoma invasivo do colo do útero. Neste grupo os níveis de homocisteína variam entre valor mínimo e máximo de 0,524 e 14,961 $\mu\text{mol/L}$, respetivamente, apresentando uma mediana de 5,546 $\mu\text{mol/L}$. Estes dados estão resumidos nas **Tabelas 5 e 8**.

Como o Grupo Controlo não segue uma distribuição normal, realizou-se o teste *U* de *Mann-Whitney* para duas amostras independentes. Aqui, verificou-se que há uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de homocisteína do Grupo Controlo com o *outlier* e os dos níveis do Grupo ICC ($p = 0,012$) (**Tabela 3**), do Grupo HSIL+ICC ($p = 0,008$) (**Tabela 4**) e do Grupo LSIL+HSIL+ICC ($p < 0,001$) (**Tabela 5**). Realizou-se também o teste de Regressão Binária Logística, com ajuste para a idade, tendo-se perdido a significância das análises anteriores.

Tabela 3. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, com *outlier*, e o Grupo ICC

Controlo c/ outlier mediana min.-máx. (N)	ICC mediana min.-máx. (N)	Valor p não ajustado¹	Valor p ajustado²
13,016 1,822 – 168,635 (31)	6,967 0,524 – 14,961 (18)	0,012	0,093

¹ Teste *U* de *Mann-Whitney* – as medidas consideradas foram mediana, min-máx., (N).

² Regressão Logística Binária – ajustado para a idade.

Tabela 4. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, com *outlier*, e o Grupo HSIL+ICC

Controlo c/ outlier mediana min.-máx. (N)	HSIL+ICC mediana min.-máx. (N)	Valor p não ajustado¹	Valor p ajustado²
13,016 1,822 – 168,635 (31)	6,967 0,524 – 14,961 (20)	0,008	0,094

¹ Teste *U* de *Mann-Whitney* – as medidas consideradas foram mediana, min-máx., (N).

² Regressão Logística Binária – ajustado para a idade.

Tabela 5. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, com *outlier*, e o Grupo LSIL+HSIL+ICC

Controlo c/ outlier mediana min.-máx. (N)	LSIL+HSIL+ICC mediana min.-máx. (N)	Valor p não ajustado¹	Valor p ajustado²
13,016 1,822 – 168,635 (31)	5,546 0,524 – 14,961 (32)	< 0,001	0,072

¹ Teste *U* de *Mann-Whitney* – as medidas consideradas foram mediana, min-máx., (N).

² Regressão Logística Binária – ajustado para a idade.

Realizou-se o mesmo para o Grupo Controlo sem o *outlier*, tendo-se verificado uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de homocisteína do Grupo Controlo sem *outlier* e os níveis do Grupo ICC ($p = 0,017$) (**Tabela 6**), do Grupo HSIL+ICC ($p = 0,011$) (**Tabela 7**) e do Grupo LSIL+HSIL+ICC ($p < 0,001$) (**Tabela 8**). Realizou-se também o teste de Regressão Binária Logística, com ajuste para a idade, tendo-se perdido a significância das análises anteriores.

Tabela 6. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, sem *outlier*, e o Grupo ICC

Controlo s/ outlier mediana min.-máx. (N)	ICC mediana min.-máx. (N)	Valor p não ajustado¹	Valor p ajustado²
12,287 1,822 – 72,753 (30)	6,967 0,524 – 14,961 (18)	0,017	0,093

¹ Teste *U* de *Mann-Whitney* – as medidas consideradas foram mediana, min-máx., (N).

² Regressão Logística Binária – ajustado para a idade.

Tabela 7. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, sem *outlier*, e o Grupo HSIL+ICC

Controlo s/ outlier mediana min.-máx. (N)	HSIL+ICC mediana min.-máx. (N)	Valor p não ajustado¹	Valor p ajustado²
12,287 1,822 – 72,753 (30)	6,967 0,524 – 14,961 (20)	0,011	0,094

¹ Teste *U* de *Mann-Whitney* – as medidas consideradas foram mediana, min-máx., (N).

² Regressão Logística Binária – ajustado para a idade.

Tabela 8. Comparação estatística dos valores de Homocisteína entre os Grupos Controlo, sem *outlier*, e o Grupo LSIL+HSIL+ICC

Controlo s/ outlier mediana min.-máx. (N)	LSIL+HSIL+ICC mediana min.-máx. (N)	Valor p não ajustado¹	Valor p ajustado²
12,287 1,822 – 72,753 (30)	5,546 0,524 – 14,961 (32)	< 0,001	0,072

¹ Teste *U* de *Mann-Whitney* – as medidas consideradas foram mediana, min-máx., (N).

² Regressão Logística Binária – ajustado para a idade.

A análise com e sem *outlier*, resultou em valores de *p* semelhantes. Assim, assumiu-se que este valor discrepante não influencia os resultados obtidos. Os resultados desta análise estatística estão representados nas **Tabelas 3-8**.

4.3. Associação entre os Genótipos de *MTHFR* e os níveis de Homocisteína

De modo a perceber a influência do genótipo do *MTHFR* nos níveis de homocisteína, na população com HPV, realizou-se uma análise estatística entre os diferentes genótipos em estudo, tendo por objetivo perceber se a presença do alelo mutante (T) ou do genótipo homozigótico mutante (TT) teriam alguma influência nos níveis de homocisteína.

Através do teste *Shapiro-Wilk*, determinou-se uma distribuição normal de homocisteína para Grupo TT ($p = 0,144$), para o Grupo CC+CT ($p = 0,574$), para o grupo CC ($p = 0,694$), e para o Grupo CT+TT ($p = 0,108$).

O Grupo TT tem um total de 3 indivíduos, uma média de níveis de homocisteína de 4,699 $\mu\text{mol/L}$ e um desvio padrão de 2,595.

Por sua vez, o Grupo CC+CT tem um total de 26 indivíduos, uma média de níveis de homocisteína de 5,920 $\mu\text{mol/L}$ e um desvio padrão de 0,712.

O Grupo CC apresenta um total de 12 indivíduos, tendo uma média de níveis de homocisteína de 5,682 $\mu\text{mol/L}$ e um desvio padrão de 1,031.

Por fim, o Grupo CT+TT possui um total de 17 indivíduos, tendo uma média de níveis de homocisteína de 5,873 $\mu\text{mol/L}$ e um desvio padrão de 0,925.

Posteriormente, realizou-se o teste *T* de *Student* para amostras independentes. Com este teste verificou-se que não existem diferenças significativas entre os níveis de homocisteína entre o Grupo TT e o Grupo CC+CT ($p = 0,593$) (**Tabela 9**). Adicionalmente, concluiu-se também que não existem diferenças significativas entre os níveis de homocisteína entre o Grupo CT+TT e o Grupo CC ($p = 0,893$) (**Tabela 10**).

Tabela 9. Comparação dos valores de Homocisteína entre o Grupo TT e o Grupo CC+CT

Homocisteína <i>MTHFR</i> TT média \pm desvio padrão (N)	Homocisteína <i>MTHFR</i> CC+CT média \pm desvio padrão (N)	Valor p^1
4,699 \pm 2,595 (3)	5,920 \pm 0,712 (26)	0,593

¹ Teste *T* de *Student* – as medidas consideradas foram média \pm desvio padrão (N).

Tabela 10. Comparação dos valores de Homocisteína entre o Grupo CT+TT e o Grupo CC

Homocisteína <i>MTHFR</i> CT+TT média \pm desvio padrão (N)	Homocisteína <i>MTHFR</i> CC média \pm desvio padrão (N)	Valor p^1
5,873 \pm 0,925 (17)	5,682 \pm 1,031 (12)	0,893

¹ Teste *T* de *Student* – as medidas consideradas foram média \pm desvio padrão (N).

5. DISCUSSÃO

O cancro do colo do útero é o quarto cancro mais frequentemente diagnosticado e a quarta causa de morte por cancro em mulheres, a nível mundial (Sung et al., 2021). O principal fator de risco é a infeção pelo HPV, causa necessária, apesar de não suficiente, para o desenvolvimento desta patologia (Teixeira et al., 2019), principalmente pelos subtipos de alto risco (Crosbie et al., 2013).

O metabolismo da homocisteína é crucial para a metilação e síntese de ADN. Uma disfunção no seu metabolismo pode levar a um aumento das suas concentrações no plasma. A presença de hiperhomocisteinemia tem sido associada a um aumento da produção de radicais livres, stresse oxidante, inflamação sistémica e aumento do risco de desenvolvimento de diversas patologias, incluindo de cancro. A via de destoxificação de homocisteína inclui várias enzimas que estão envolvidas no metabolismo da homocisteína. Assim, mutações nestas enzimas podem contribuir para o desenvolvimento de cancro (Koklesova et al., 2021). Mais especificamente, tem sido feita uma associação entre polimorfismos no gene *MTHFR* e o desenvolvimento de cancro. Uma meta-análise que incluiu mais de 19 000 doentes e mais de 23 000 controlos saudáveis mostrou que a variante C677T é a mais comumente associada ao cancro do ovário e da mama (He & Shen, 2017). Em relação ao cancro do colo do útero e suas lesões precursoras, ainda não há um consenso, existindo resultados discordantes na literatura (Guo, 2012; Inácio et al., 2023; Luo et al., 2012; Xu et al., 2013; Yi et al., 2016; Yu et al., 2013).

5.1. Discussão da caracterização da amostra populacional

Relativamente à amostra populacional do estudo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na média das idades entre o Grupo Controlo e o Grupo ICC ($p = 0,002$), assim como entre o Grupo Controlo e o Grupo HSIL+ICC ($p < 0,001$) e entre o Grupo Controlo e o Grupo LSIL+HSIL+ICC ($p < 0,001$). O Grupo Controlo possui uma média de 60 anos. Em relação aos grupos com patologia do colo do útero, o Grupo ICC

apresenta uma média de 50 anos, o Grupo HSIL+ICC uma média de 49,10 anos, e o Grupo LSIL+HSIL+ICC uma média de 42,69 anos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o cancro do colo do útero afeta mais mulheres com idades compreendidas entre os 45 e os 60 anos (WHO, 2022). Assim, é possível concluir que as idades médias dos grupos com patologia deste estudo estão dentro do previsto.

Como já anteriormente exposto, a progressão da infeção persistente por um HPV de subtipo de alto risco para cancro do colo do útero é bem conhecida (Crosbie et al., 2013). A lesão intraepitelial de baixo grau pode progredir lentamente para uma lesão intraepitelial de alto grau e, eventualmente, cancro invasivo (Cohen et al., 2019). Neste estudo, as mulheres do Grupo Controlo apresentam uma média de idades superior à das mulheres dos grupos com patologia no colo do útero. Assim, torna-se questionável a necessidade de realização de um ajuste para a idade, dado que as mulheres do Grupo Controlo têm uma média de idades superior à média de aparecimento desta doença. Este ajuste faria mais sentido caso o Grupo Controlo tivesse uma média de idades inferior aos grupos com patologia, ou inferior a 60 anos, já que ainda teria alguma probabilidade de vir a desenvolver lesão do colo do útero.

5.2. Associação entre os níveis de Homocisteína e diferentes graus de lesão do colo do útero

Níveis elevados de homocisteína podem levar à lesão no ADN e stresse oxidante, fatores que contribuem para a malignidade (Weinstein et al., 2001). Já existem alguns estudos que relacionaram os níveis de homocisteína com o desenvolvimento de alguns cancros (Rehman et al., 2020; Zhang et al., 2015), inclusivamente o cancro do colo do útero (Weinstein et al., 2001). No entanto, a associação entre os níveis de homocisteína e o desenvolvimento de cancro do colo do útero ainda não é clara.

Neste estudo observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de homocisteína do Grupo Controlo, com e sem *outlier*, e todos os restantes grupos com patologia (**Tabelas 3-8**). Através da análise descritiva dos níveis de homocisteína nos diferentes grupos, observa-se que o Grupo Controlo tem uma

mediana de concentração plasmática de homocisteína superior em relação aos restantes grupos com patologia. No entanto, ao realizar o teste de Regressão Logística Binária, com o ajuste para a idade, os resultados deixam de ter significado estatístico.

Portanto, neste estudo, o nível mais elevado de homocisteína no Grupo Controlo em relação aos grupos com HPV, sugere que o aumento dos níveis de homocisteína circulante no plasma possa ser um fator protetor para o risco de desenvolvimento de cancro do colo do útero. Todavia, esta observação não está de acordo com o descrito na literatura, previamente descrita neste trabalho.

Os níveis de Homocisteína no Grupo Controlo poderão estar mais elevados por esta população ser mais envelhecida. A concentração de homocisteína sérica aumenta com a idade e atinge $16,5 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/L}$ em pessoas com 65 anos de idade. As concentrações mais elevadas de Homocisteína são encontradas em indivíduos com uma idade igual ou superior a 75 anos (Ostrakhovitch & Tabibzadeh, 2019). Esta pode ser uma possível razão para a perda do fator protetor que se observa quando se faz o ajuste para a idade.

As elevações da concentração de Homocisteína plasmática nas pessoas com maior idade podem dever-se à disfunção das enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína e vitaminas B, deficiências nutricionais nos cofatores vitamínicos ou outras condições do estilo de vida, como o uso de fármacos. Uma idade avançada também pode condicionar alterações na função renal, afetando a excreção de Homocisteína, podendo levar a aumento dos seus níveis plasmáticos (Ostrakhovitch & Tabibzadeh, 2019). Além disto, podem existir outros fatores confundidores que influenciam os níveis de Homocisteína no plasma além da idade, tais como a presença de deficiências nutricionais e vitamínicas, obesidade, inatividade física, hipertensão, etc. Sabe-se também que alguns fármacos, tais como fibratos, metotrexato e anticonvulsivantes (como a carbamazepina e o valproato) podem interferir com os cofatores das vitaminas envolvidas no metabolismo da Homocisteína. O consumo de álcool e de tabaco também podem influenciar estes resultados (Ostrakhovitch & Tabibzadeh, 2019). Assim, em investigações futuras, seria pertinente ter em conta estes diversos fatores, realizando ajustes dos níveis de homocisteína a cada um deles.

O polimorfismo C677T do *MTHFR* está associado a uma redução de cerca de 50-60% da atividade enzimática, o que conduz a um aumento do stresse oxidante. De forma a restabelecer a homeostasia e prevenir a disfunção endotelial provocada pela acumulação de espécies reativas de oxigénio, as células promovem um processo de destoxificação, que consome altos níveis de glutathiona (GSH), um antioxidante importante. No entanto, na presença do genótipo 677TT, ou seja, nos indivíduos homocigóticos, há uma depleção ainda maior de GSH. Isto acontece porque, com altos níveis de Homocisteína, esta sofre auto-oxidação, deixando de ocorrer a transsulfuração, que depois iria ser responsável por culminar na síntese de GSH. Este processo aumenta, então, o dano celular (Zarembka et al., 2023). Neste estudo, a diminuição dos níveis de homocisteína nas mulheres com algum grau de lesão do colo do útero pode estar também relacionada com um provável aumento da síntese hepática de GSH. Isto pode acontecer pelo facto da GSH estar já a ser utilizada no processo de metabolização de derivados do tabaco potencialmente carcinogénicos e das hormonas esteroides sexuais (Bicho, 2011). No entanto, neste estudo, não foi tido em conta o consumo de tabaco ou toma de contraceptivos orais. Assim, estes fatores podem ter influenciado os resultados observados.

5.3. Associação entre os Genótipos de *MTHFR* e os níveis de Homocisteína

Neste estudo, a análise da associação do polimorfismo C677T no gene *MTHFR* nos níveis de Homocisteína nas populações com patologia do colo do útero não mostrou resultados estatisticamente significativos.

A prevalência do polimorfismo C677T do *MTHFR* varia com a etnicidade e a localização geográfica, sendo relativamente frequente a nível mundial (Zarembka et al., 2023). Uma meta-análise mostrou que a prevalência mundial do alelo T foi estimada em 24%, enquanto a ocorrência do genótipo TT foi 7,7%. Ao avaliar os diferentes subgrupos, é possível observar que a população europeia ocupa o primeiro lugar, com uma prevalência do alelo T de 34%. A prevalência mais elevada do genótipo TT também está atribuída ao subgrupo europeu (Yadav et al., 2014). Neste estudo não foi tida em

consideração a etnicidade das participantes, o que pode ter influenciado de alguma forma os resultados obtidos.

É também de realçar que a amostra populacional deste estudo é pequena. Esta é, provavelmente, uma possível razão importante para a falta de significância estatística observada. Assim, em futuros estudos relacionados com o polimorfismo C677T no gene *MTHFR*, com uma maior amostra populacional e conseqüente robustez de resultados, seria pertinente colher plasma das mulheres em estudo e avaliar os valores séricos da concentração de homocisteína. A colheita destes valores é um método fácil, pouco invasivo e barato (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2024). Isto poderia ajudar a esclarecer se, pelo menos na população portuguesa, existe alguma associação entre o polimorfismo no *MTHFR* e os níveis de homocisteína.

Caso se verificassem associações, seria pertinente estudar se a suplementação vitamínica, aumento do consumo na dieta ou outras medidas que visem baixar os níveis de homocisteína seriam uma forma de prevenção do desenvolvimento do cancro. Até ao momento, existem dados limitados e insuficientes sobre o benefício da administração de folato na recorrência da neoplasia intraepitelial cervical (Sabihi et al., 2022). Isto pode ser relevante porque o folato tem uma relação inversa com a homocisteína (Koklesova et al., 2021). Um estudo já demonstrou que a suplementação de 5mg diários de folato durante 6 meses tinha o potencial de regredir o CIN1, e melhorar os níveis de homocisteína e de outros marcadores de inflamação e stresse oxidante (Asemi et al., 2016). Por sua vez, outro estudo recente mostrou que a suplementação com folato, apesar de ter mostrado alguns efeitos benéficos em certos biomarcadores, não alterou a recorrência de CIN II/III em mulheres obesas com deficiência de folato (Sabihi et al., 2022). Também já se tem correlacionado o *status* do folato e a metilação aberrante de ADN com a história natural da infeção por HPV (Flatley et al., 2009). Uma revisão sistemática, que avaliou resultados de 20 estudos, mostrou que a inclusão de alguns suplementos na dieta, onde estava incluído o folato, poderia ter efeitos benéficos em indivíduos com cancro do colo do útero (Gholamalizadeh et al., 2023). Assim, a literatura sugere um potencial papel da suplementação com folato na prevenção de lesões relacionadas com o cancro do colo do útero, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Já se tem estudado o papel da Homocisteína como biomarcador de diversas patologias, como na doença cardiovascular, distúrbios neurológicos, diabetes, vitiligo, disfunção renal e, inclusivamente, cancro (Rehman et al., 2020; Smith & Refsum, 2021). Em relação ao HPV, já se colocou a hipótese dos níveis de Homocisteína poderem ser usados como marcador tumoral, em casos de carcinoma oral de células pavimentosas, apesar de serem necessários mais estudos com amostras maiores e que descartem a influência de fatores dietéticos (Palaskar et al., 2022). No entanto, até à data, em relação ao cancro do colo do útero e suas lesões precursoras, ainda existe pouca evidência disponível. Assim, sugere-se também a realização de estudos que investiguem o papel potencialmente preditor dos níveis de homocisteína em relação ao risco de progressão de lesões do colo do útero para cancro invasivo. Descobertas neste campo podem permitir o uso deste biomarcador na prática clínica, no futuro.

6. CONCLUSÃO

O cancro do colo do útero é a quarta causa de morte por cancro em mulheres, a nível mundial, sendo um importante problema de saúde pública. O principal fator de risco para o seu aparecimento é a infeção pelo vírus do papiloma humano, principalmente pelos subtipos de alto risco. Apesar desta infeção ser atualmente considerada necessária para o desenvolvimento de lesões no colo do útero, não é suficiente.

O metabolismo da homocisteína é crucial para a metilação de ADN. Uma disfunção no seu metabolismo pode levar a um aumento das suas concentrações no plasma, com um conseqüente aumento da produção de radicais livres, stresse oxidante, inflamação sistémica e risco de desenvolvimento de diversas patologias, incluindo de cancro. Assim, mutações nas enzimas envolvidas no seu metabolismo podem contribuir para o desenvolvimento de cancro. O polimorfismo C677T no gene *MTHFR*, que codifica uma enzima envolvida no metabolismo da homocisteína, tem vindo a ser descrito na literatura como um provável risco de desenvolvimento de cancro. No entanto, em relação ao cancro do colo do útero e suas lesões precursoras, ainda não há um consenso.

Os resultados deste estudo mostraram que o gene *MTHFR* não modula os níveis de homocisteína em mulheres com infeção por HPV e os níveis de homocisteína não são maiores em mulheres com patologia.

No entanto, dado as limitações deste trabalho, recomenda-se a realização de mais investigações que estudem o papel da homocisteína e do folato, associado ao papel de outras variantes genéticas que participem neste metabolismo, com amostras populacionais que contenham um maior número de participantes, de forma a obter uma maior qualidade de resultados.

7. REFERÊNCIAS

AMBOSS. (2024, janeiro). *Routes of AA carbon skeleton metabolism*. <https://next.amboss.com/us/article/FK0gRS?q=homocysteine#Z60acf4751963420390fc8f2cf2f3705f>

Asemi, Z., Vahedpoor, Z., Jamilian, M., Bahmani, F., & Esmailzadeh, A. (2016). Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(6), 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.12.028>

Bhat, D. (2022). The 'Why and How' of Cervical Cancers and Genital HPV Infection. *CytoJournal*, 19, 22. https://doi.org/10.25259/CMAS_03_03_2021

Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2021). Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 155 Suppl 1(Suppl 1), 28–44. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13865>

Bhatla, N., Berek, J. S., Cuello Fredes, M., Denny, L. A., Grenman, S., Karunaratne, K., Kehoe, S. T., Konishi, I., Olawaiye, A. B., Prat, J., Sankaranarayanan, R., Brierley, J., Mutch, D., Querleu, D., Cibula, D., Quinn, M., Botha, H., Sigurd, L., Rice, L., ... Natarajan, J. (2019). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 145(1), 129–135. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12749>

Bhatt, N., Waly, M., & Ali, A. (2021). *Anti-inflammatory Role of Anthocyanins in the Prevention of Hyperhomocysteinemia-Mediated Cardiometabolic Diseases* (pp. 33–49). https://doi.org/10.1007/978-3-030-57839-8_3

Bicho, M. C. (2011). *Contribuição para o estudo de biomarcadores e co-fatores no cancro do colo do útero* [Tese de Doutorado]. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Botezatu, A., Socolov, D., Iancu, I. V., Huica, I., Plesa, A., Ungureanu, C., & Anton, G. (2013). Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(4), 543–549. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12032>

Castanheira, C. P., Sallas, M. L., Nunes, R. A. L., Lorenzi, N. P. C., & Termini, L. (2020). Microbiome and Cervical Cancer. *Pathobiology*, 88(2), 187–197. <https://doi.org/10.1159/000511477>

Chen, J., Giovannucci, E., Kelsey, K., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Spiegelman, D., Willett, W. C., & Hunter, D. J. (1996). A methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Research*, 56(21), 4862–4864.

Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *Lancet (London, England)*, 393(10167), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)

Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)*, 382(9895), 889–899.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)

Darragh, T. M., Colgan, T. J., Thomas Cox, J., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., McCalmont, T., Nayar, R., Palefsky, J. M., Stoler, M. H., Wilkinson, E. J., Zaino, R. J., Wilbur, D. C., & Members of the LAST Project Work Groups. (2013). The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: Background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 32(1), 76–115. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e31826916c7>

Diário da República: II série, n.º 68. (2017). *Despacho n.º 8254/2017 do Gabinete do Secretário de Estado Adjunto e da Saúde*. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/8254-2017-108189401>

Direção-Geral da Saúde (DGS). (2023). *Relatório anual da vacinação 2023*. https://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/dgs_pnv_2023-pdf.aspx

Dovnik, A., & Repše Fokter, A. (2023). The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(10), 8476–8491. <https://doi.org/10.3390/cimb45100534>

Drolet, M., Bénard, É., Pérez, N., & Brisson, M. (2019). Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: Updated systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 394(10197), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30298-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30298-3)

Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism*, 25(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>

Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A., & Powers, H. J. (2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(10), 2782–2789. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0493>

Gholamalizadeh, M., Ardekanizadeh, N. H., Aghakhaninejad, Z., Mohammadi, S., Majidi, N., Masoumvand, M., Bakhshimoghaddam, F., Ahmadzadeh, M., Tajadod, S., Askarpour, S. A., Khoshdooz, S., Kalantari, N., & Doaei, S. (2023). The effects of dietary supplements in patients with cervical cancer: A comprehensive systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*: X, 19, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.eurox.2023.100217>

Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., & Lowy, D. R. (2008). HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer*, 113(S10), 3036–3046. <https://doi.org/10.1002/cncr.23764>

Guo, L.-N. (2012). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and cervical cancer risk: A meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 13(5), 2193–2197. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.5.2193>

- Hajiesmaeil, M., Tafvizi, F., & Sarmadi, S. (2016). The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on susceptibility to human papilloma virus infection and cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 46, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.012>
- Harden, M. E., & Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 772, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>
- Hasan, T., Arora, R., Bansal, A. K., Bhattacharya, R., Sharma, G. S., & Singh, L. R. (2019). Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(2), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0216-4>
- He, L., & Shen, Y. (2017). MTHFR C677T polymorphism and breast, ovarian cancer risk: A meta-analysis of 19,260 patients and 26,364 controls. *OncoTargets and therapy*, 10, 227–238. <https://doi.org/10.2147/OTT.S121472>
- Hermann, A., & Sitdikova, G. (2021). Homocysteine: Biochemistry, Molecular Biology and Role in Disease. *Biomolecules*, 11(5), 737. <https://doi.org/10.3390/biom11050737>
- Homberger, A., Linnebank, M., Winter, C., Willenbring, H., Marquardt, T., Harms, E., & Koch, H. G. (2000). Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *European Journal of Human Genetics*, 8(9), 725–729. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200522>
- Inácio, Â., Aguiar, L., Rodrigues, B., Pires, P., Ferreira, J., Matos, A., Mendonça, I., Rosa, R., Bicho, M., Medeiros, R., & Bicho, M. C. (2023). Genetic Modulation of HPV Infection and Cervical Lesions: Role of Oxidative Stress-Related Genes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(10), 1806. <https://doi.org/10.3390/antiox12101806>
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2024). *Tabela de preços PNAEQ 2024*.
- Johnson, C. A., James, D., Marzan, A., & Armaos, M. (2019). Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(2), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003>
- Kimura, F., Franke, K. H., Steinhoff, C., Golka, K., Roemer, H. C., Anastasiadis, A. G., & Schulz, W. A. (2000). Methyl group metabolism gene polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *The Prostate*, 45(3), 225–231. [https://doi.org/10.1002/1097-0045\(20001101\)45:3<225::aid-pros4>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0045(20001101)45:3<225::aid-pros4>3.0.co;2-7)
- Kines, R. C., & Schiller, J. T. (2022). Harnessing Human Papillomavirus' Natural Tropism to Target Tumors. *Viruses*, 14(8), 1656. <https://doi.org/10.3390/v14081656>
- Koklesova, L., Mazurakova, A., Samec, M., Biringer, K., Samuel, S. M., Büsselberg, D., Kubatka, P., & Golubnitschaja, O. (2021). Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *The EPMA Journal*, 12(4), 477–505. <https://doi.org/10.1007/s13167-021-00263-0>
- Kute, P. M., Soukarieh, O., Tjeldnes, H., Trégouët, D.-A., & Valen, E. (2022). Small Open Reading Frames, How to Find Them and Determine Their Function. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.796060>

Long, S., Yang, X., Liu, X., & Yang, P. (2012). Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and susceptibility for cervical lesions: A meta-analysis. *PloS One*, 7(12), e52381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052381>

Luo, Y. L., Ye, P., Zhang, Q. H., Hu, T. T., Luo, M. H., Li, M. Q., & Chen, Q. (2012). Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Susceptibility to Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 7(9), e46272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046272>

MedlinePlus: Citing MedlinePlus. (sem data). Obtido 15 de setembro de 2023, de <https://medlineplus.gov/about/using/citation/>

Mei, Q., Zhou, D., Gao, J., Shen, S., Wu, J., Guo, L., & Liang, Z. (2012). The association between MTHFR 677C>T polymorphism and cervical cancer: Evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer*, 12, 467. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-467>

Mudd, S. H., Uhlenendorf, B. W., Freeman, J. M., Finkelstein, J. D., & Shih, V. E. (1972). Homocystinuria associated with decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 905–912. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(72\)80227-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(72)80227-4)

Nelson, C. W., & Mirabello, L. (2023). Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. *Tumour Virus Research*, 15, 200258. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2023.200258>
Oliveira, A., Delgado, C., Verdasca, N., & Pista, A. (2013). Indicadores de Prognóstico da Carcinogénese do Colo do Útero Associada à Infeção por Vírus do Papiloma Humano. *Acta Médica Portuguesa*, 26(2), 139–144. <https://doi.org/10.20344/amp.93>

Ostrakhovitch, E. A., & Tabibzadeh, S. (2019). Homocysteine and age-associated disorders. *Ageing Research Reviews*, 49, 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.010>

Oyouni, A. A. A. (2023). Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. *Journal of Infection and Public Health*, 16(4), 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.014>

Palaskar, S., Joshi, K., Mukkanwar, R., Pawar, R., Kulkarni, G., & Pawar, S. (2022). Utility of serum homocysteine in oral squamous cell carcinoma patients as a potential biomarker. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 26(3), 335–339. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_268_22

Pangarkar, M. A. (2022). The Bethesda System for reporting cervical cytology. *CytoJournal*, 19, 28. https://doi.org/10.25259/CMAS_03_07_2021

Peitz, J. G., Adebamowo, C. A., & Adebamowo, S. N. (2024). Association between Serum Folate and Vaginal High-Risk Human Papillomavirus Infections in United States Women. *The Journal of Nutrition*, 154(2), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.12.040>

Petrone, I., Bernardo, P. S., dos Santos, E. C., & Abdelhay, E. (2021). MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms in Breast Cancer, Gliomas and Gastric Cancer: A Review. *Genes*, 12(4), 587. <https://doi.org/10.3390/genes12040587>

Piyathilake, C. J., Henao, O. L., Macaluso, M., Cornwell, P. E., Meleth, S., Heimburger, D. C., & Partridge, E. E. (2004). Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Research*, 64(23), 8788–8793. <https://doi.org/10.1158/0008->

Rahangdale, L., Mungo, C., O'Connor, S., Chibwasha, C. J., & Brewer, N. T. (2022). Human papillomavirus vaccination and cervical cancer risk. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *379*, e070115. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-070115>

Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Chiappelli, M., Montesi, F., Bianchin, M., Licastro, F., & Patterson, C. (2006). Apolipoprotein E e4 allele affects risk of hyperhomocysteinemia in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(6), 1473–1480. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.6.1473>

Rehman, T., Shabbir, M. A., Inam-Ur-Raheem, M., Manzoor, M. F., Ahmad, N., Liu, Z., Ahmad, M. H., Siddeeg, A., Abid, M., & Aadil, R. M. (2020). Cysteine and homocysteine as biomarker of various diseases. *Food Science & Nutrition*, *8*(9), 4696–4707. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1818>

Sabihi, S., Vahedpoor, Z., Saraf-Bank, S., & Nourian, M. (2022). Effects of folate supplementation on recurrence and metabolic status of cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 in overweight and obese women: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, *76*(5), 666–670. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-01022-0>

Shen, H., Xu, Y., Zheng, Y., Qian, Y., Yu, R., Qin, Y., Wang, X., Spitz, M. R., & Wei, Q. (2001). Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: A case-control study. *International Journal of Cancer*, *95*(5), 332–336. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010920\)95:5<332::aid-ijc1058>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010920)95:5<332::aid-ijc1058>3.0.co;2-9)

Smith, A. D., & Refsum, H. (2021). Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention. *Journal of Internal Medicine*, *290*(4), 826–854. <https://doi.org/10.1111/joim.13279>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Teixeira, C., Pereira, A. M., Anes, E., Rodrigues, C., & Castanheira, M. J. (2019). Evolução Temporal da Mortalidade por Cancro do Colo do Útero em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, *32*(6), 427–433. <https://doi.org/10.20344/amp.8921>

Waxman, A. G., Chelmow, D., Darragh, T. M., Lawson, H., & Moscicki, A.-B. (2012). Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Obstetrics and gynecology*, *120*(6), 1465–1471.

Weinstein, S. J., Ziegler, R. G., Selhub, J., Fears, T. R., Strickler, H. D., Brinton, L. A., Hamman, R. F., Levine, R. S., Mallin, K., & Stolley, P. D. (2001). Elevated serum homocysteine levels and increased risk of invasive cervical cancer in US women. *Cancer Causes & Control: CCC*, *12*(4), 317–324. <https://doi.org/10.1023/a:1011290103779>

WHO. (2022, setembro 13). *The cancer we can eliminate – WHO/Europe urges Member States to consign cervical cancer to history*. <https://www.who.int/europe/news/item/13-09-2022-the-cancer-we-can-eliminate---who-europe-urges-member-states-to-consign-cervical-cancer-to-history>

WHO. (2024, fevereiro 1). *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services*. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>

Wipperman, J., Neil, T., & Williams, T. (2018). Cervical Cancer: Evaluation and Management. *American Family Physician, 97*(7), 449–454.

Wu, C. Y., Yang, M., Lin, M., Li, L. P., & Wen, X. Z. (2013). MTHFR C677T polymorphism was an ethnicity-dependent risk factor for cervical cancer development: Evidence based on a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics, 288*(3), 595–605. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2721-3>

Xu, X., Zou, L., & Wang, D. (2013). Cervical cancer with polymorphism in MTHFR C677T gene: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Biology Reports, 40*(1), 255–262. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2056-3>

Yadav, U., Kumar, P., & Rai, V. (2014). Global prevalence of MTHFR C677T gene polymorphism: A meta-analysis of population based studies. *Indian Journal of Clinical Biochemistry, 29*, 123.

Yi, K., Yang, L., Lan, Z., & Xi, M. (2016). The association between MTHFR polymorphisms and cervical cancer risk: A system review and meta analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics, 294*(3), 579–588. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4037-6>

Yu, L., Chang, K., Han, J., Deng, S., & Chen, M. (2013). Association between Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to cervical cancer: A meta-analysis. *PloS One, 8*(2), e55835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055835>

Zarembaska, E., Ślusarczyk, K., & Wrzosek, M. (2023). The Implication of a Polymorphism in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Homocysteine Metabolism and Related Civilisation Diseases. *International Journal of Molecular Sciences, 25*(1), 193. <https://doi.org/10.3390/ijms25010193>

Zhang, D., Wen, X., Wu, W., Guo, Y., & Cui, W. (2015). Elevated homocysteine level and folate deficiency associated with increased overall risk of carcinogenesis: Meta-analysis of 83 case-control studies involving 35,758 individuals. *PloS One, 10*(5), e0123423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123423>