

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANGELO BORGES DE MELO NETO

Sequenciamento de nova geração revela que a regulação positiva de *PNMA3* e *RASSF2* está associada à resistência quimioradioterápica em pacientes com câncer de colo uterino

PATOS DE MINAS - MG

AGOSTO DE 2022

ANGELO BORGES DE MELO NETO

Sequenciamento de nova geração revela que a regulação positiva de *PNMA3* e *RASSF2* está associada à resistência quimioradioterápica em pacientes com câncer de colo uterino

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia como
requisito para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes

Co-orientador: Dr. Fábio Ribeiro Queiroz

PATOS DE MINAS – MG

AGOSTO DE 2022

ANGELO BORGES DE MELO NETO

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M528 Melo Neto, Angelo Borges de, 1996-
2022 Sequenciamento de nova geração revela que a regulação positiva de PNMA3 e RASSF2 está associada à resistência quimioradioterápica em pacientes com câncer de colo uterino [recurso eletrônico] / Angelo Borges de Melo Neto. - 2022.

Orientador: Matheus de Souza Gomes.

Coorientador: Fábio Ribeiro Queiroz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.527>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Gomes, Matheus de Souza, 1981-, (Orient.). II. Queiroz, Fábio Ribeiro, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Sequenciamento de nova geração revela que a regulação positiva de *PNMA3* e *RASSF2* está associada à resistência quimioradioterápica em pacientes com câncer de colo uterino

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia como
requisito para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 26/08/ 2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes



Dr. Fábio Ribeiro Queiroz



Dra. Cristina Ribas Fürstenau



Dra. Carolina Pereira de Souza Melo

Patos de Minas – MG

2022

Dedico esta dissertação com o objetivo de obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, em primeiro lugar a **Deus**:

- “pois, Nele, foram criadas todas as coisas, nos céus e sobre a terra, as visíveis e as invisíveis, sejam tronos, sejam soberanias, quer principados, quer potestades. Tudo foi criado por meio Dele e para Ele.” **Cl 1:16**
- Porque Ele nos disse: “Então Jesus tornou a falar-lhes, dizendo: Eu sou a luz do mundo; quem me segue de modo algum andarás em trevas, mas terá a luz da vida” **Jo 8:12**
- Sendo Ele, portanto, o Princípio:
“No princípio, Deus criou os céus e a terra.” **Gn 1:1**;
“No princípio era o Verbo, e o Verbo estava com Deus, e o Verbo era Deus. Ele estava no princípio com Deus. Todas as coisas foram feitas por Ele, e sem Ele nada do que foi feito se fez. Nele estava a vida, e a vida era a luz dos homens.” **Jo 1:1-4**
- Concluindo ser, o Princípio e o Fim:
“Eu sou o Alfa e o Ômega, o princípio e o fim, o primeiro e o derradeiro.” **Ap22:13**

E após **Ele** dedico à minha amada **esposa, Isabela Elias**, minha companheira de todos os dias, onde quer que eu esteja e em qualquer coisa que eu faça. Assim, espero todos os dias que continue me escolhendo e apoiando. Por fim, dedico este trabalho **à todas as mulheres** que lutam contra o câncer e espero muito descobrir algo que contribua com a melhora na vida de todas vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela minha criação, salvação e pelo Espírito Santo que habita em mim. Que todo meu trabalho seja para Tua Glória e, muito obrigado por esta oportunidade!

Agradeço à minha **esposa, Isabela Elias**, por ter me encontrado nesse mundo repleto de pessoas, de possibilidades, de opções, de escolhas, de ocasiões e, mesmo sob inúmeros outros fatores ter me escolhido, me amado e me apoiado!

Agradeço aos **meus pais, Saulo e Myriam** por toda a minha criação, construção de caráter, ensinamentos, pela paciência, pelos elogios, pelas críticas, por me conduzir na vida cristã e pela minha vida!

Agradeço a minha **irmã, Pollyanna**, que independente da total diferença entre nós segue buscando pela minha felicidade e sucesso, seja pessoal ou profissional e por ter me dado a oportunidade de ser tio. Assim, agradeço também ao **Lorenzo!**

Agradeço aos meus **avós, Angelo, Edith, João e Gasparina**, porque a origem de toda essa família veio de vocês, toda a base para a construção da minha vida nessa Terra!

Agradeço aos meus parentes, em especial ao meu **primo Matheus**, que deu todo o início à minha carreira científica e como biotecnologista e por ser um irmão durante a vida!

Agradeço em especial aos meus **orientadores:**

Matheus de Souza Gomes, pesquisador, orientador e amigo especial, por ter me dado a oportunidade de explorar uma área em ascensão no mundo da ciência e que recentemente tem se ingressado no cenário médico hospitalar, principalmente em se tratando do Brasil: a bioinformática. Além disso, por ter me acolhido tanto durante a graduação quanto na pós-graduação, sempre me apoiando e alimentando a minha coragem e persistência no aprendizado. Além de não me permitir desistir e de ter me oferecido a oportunidade de participação no trabalho que resultou no meu primeiro artigo científico publicado, como segundo autor e, em vários outros a serem submetidos, sendo responsável direto na construção da minha carreira científica!

Fábio Ribeiro Queiroz, pesquisador e orientador especial, por pensar e agir diferentemente de mim em quase 100% das ocasiões, me impondo desafios e propostas, mas me apoiando, me dando oportunidades, me ensinando e mostrando ao mesmo tempo que também pensa e age semelhantemente a mim. No entanto, muitas vezes me propõe o contrário para me mostrar o outro lado de cada “história”. Além de confiar em mim na participação em inúmeros trabalhos e ter me dado a oportunidade de submeter o meu primeiro artigo científico como primeiro autor! Sendo responsável direto na construção da minha carreira científica!

Agradeço em especial a minha **parceira** direta **Natália Custódio**, por compartilharmos conhecimento juntos e porque sem ela este trabalho não teria sido concretizado!

Agradeço em especial ao **Wander de Jesus Jeremias**, por todos os conselhos, orientações e colaborações não apenas neste trabalho, mas para todo o grupo, bem como por me estender a mão em tudo o que lhe cabia, sendo verdadeiramente um companheiro nessa jornada científica!

Agradeço também em especial a toda a **equipe do Instituto Mario Penna**:

Em primeiro lugar à **Letícia da Conceição Braga**, por me aceitar efetivamente nas pesquisas envolvendo bioinformática e análises moleculares frente ao desafio no desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem no prognóstico e tratamento do câncer de colo uterino (CCU). Por me ensinar cada vez mais sobre o ponto de vista médico frente a pesquisas como esta e por sempre me apoiar e sustentar, me mantendo resiliente e persistente mediante elogios e aplausos ou críticas construtivas e sugestões.

Agradeço à **Carolina Pereira de Souza Melo** uma excelente profissional, recentemente conhecida, mas que pode agregar muito no meu conhecimento e na avaliação deste trabalho. Muito obrigado por aceitar o nosso convite e por participar conosco na ciência!

Em seguida agradeço a todos os outros do **Instituto** envolvidos neste trabalho, pela oportunidade, pelo conhecimento, pelos ensinamentos e colaborações de todos vocês: **Izabela. F. G de Amorim**, **Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Salles** e todos os outros membros que participaram direta ou indiretamente deste estudo.

Agradeço a todo o meu grupo de pesquisa do **Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares (LBAM)**:

A **Tamires Alves Caixeta** por ser minha parceira direta ou indiretamente em todas as pesquisas conduzidas pelo laboratório, estando presente desde o início da minha trajetória em Bioinformática e à disposição em muitas das vezes que necessitei.

Ao **Laurence Rodrigues do Amaral**, por conduzir inúmeras análises e colaborar em todos os projetos e trabalhos efetivados pelo grupo, além de ter me auxiliado e ensinado quando precisei.

A todos os outros, por toda a participação direta ou indireta neste trabalho.

Agradeço à **Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas** e a todos os seus membros, em especial:

À **Tháise**, professora especial que me orientou durante a graduação, me ensinou e me deu algumas das primeiras oportunidades de pesquisa!

À **Cristina**, professora incrível a quem devo muito, pois me ofereceu o meu primeiro trabalho a ser apresentado em congresso, pois me ofereceu a primeira oportunidade de me ingressar em um mestrado, quando iniciei em Belo Horizonte. Além de ter participado na publicação do meu primeiro artigo científico!

Ao **Milton**, por auxiliar na montagem e funcionamento do meu computador pessoal e por todos os outros computadores do **LBAM**, de modo com que toda pesquisa em bioinformática possa efetivamente acontecer.

Ao **João Victor Nunes**, mestrando em Biotecnologia pelo **PPGBIOTEC** e amigo desde a infância, que me apoiou e esteve presente durante toda a graduação e o mestrado, no que condiz às disciplinas de ambos os programas e na colaboração durante o estudo para a ingressão no **PPGBIOTEC**.

Agradeço a todos meus amigos, **Lucas Silveira, Bruno Gontijo, Gabriel de Sousa, Vinicius Ferreira e Gustavo Resende**, que em diferentes períodos da minha vida estiveram sempre com o braço estendido e me apoiando de alguma forma! Agradeço ao **CNPq** e a **CAPES** pelo financiamento deste projeto de pesquisa e pelo fornecimento das bolsas de estudo!

Por fim, agradeço a todas as pessoas que influenciaram neste trabalho e na minha carreira científica!

RESUMO

O câncer de colo uterino (CCU) afeta mulheres no mundo todo e os índices de mortalidade devido a esta patologia são próximos de 50%, o que é devido principalmente ao seu diagnóstico tardio e à resistência a tratamentos quimiorradioterápicos como à cisplatina (RCP). *Hallmarks* do câncer como a inibição da apoptose são associadas a esta resistência, mas os fatores envolvidos nestas vias de morte celular no CCU ainda são pouco conhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) relacionados à apoptose entre pacientes Responderas (R) e Não-responderas (NR) à quimiorradioterapia, bem como o número de células imune no microambiente tumoral destas mulheres. Com esta finalidade, 21 pacientes R e 10 NR foram incluídas no estudo e suas células não-tronco tumorais (CNTTs) foram selecionadas por citometria de fluxo e submetidas a sequenciamentos de RNA. Todas sequencias obtidas com baixa qualidade e adaptadores foram removidos, enquanto aquelas selecionadas foram mapeadas unicamente a *loci* específicos do genoma humano e quantificadas quanto à sua expressão. Por fim, análises de expressão diferencial gênica, de ontologia gênica (GO), estatísticas e árvores de decisão foram realizadas para a obtenção de potenciais biomarcadores da resistência quimiorradioterápica. Paralelamente foi feita a avaliação morfológica do nº de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) e eosinófilos associados ao tecido tumoral (TATES) de 23 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão. Ao todo 2519 DEGs com $\log_2FC > 1$ ou < -1 e valor de p.ajustado < 0.05 foram considerados, sendo 117 deles associados a apoptose e somente 8 relevantes conforme análises de GO, estatística e de árvore de decisão. Destes 8 DEGs, *PNMA3* e *RASSF2* foram encontrados superexpressos em pacientes NR e com baixa expressão em R, conforme valores de \log_2FC , z-score e a razão entre médias normalizadas de expressão entre os grupos R e NR. Além disso, o número de TILs intratumorais e TATES foram superiores em pacientes R enquanto no grupo NR houve um maior número no ambiente estromal. Portanto, os genes *PNMA3* e *RASSF2* foram definidos como potenciais biomarcadores associados a apoptose e à resistência quimiorradioterápica, visto a sua predominância em pacientes NR e os inúmeros trabalhos associando as famílias destes genes com a regulação da apoptose. Adicionalmente, um maior nº de TILs e TATES no microambiente intratumoral foram associados com respostas quimiorradioterápicas favoráveis no CCU, mas mais estudos são necessários para caracterizar tanto estes DEGs quanto o perfil destas células imune neste câncer.

Palavras-chave: Câncer de colo uterino (CCU); Apoptose; Biomarcadores; Resistência à quimiorradioterapia; *PNMA3*; *RASSF2*.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) affects women in global scale and many factors are responsible for the high mortality rate related to this cancer, such as chemoradiotherapy resistance including the cisplatin resistance (CPR) and late diagnosis. Between the hallmarks of cancer is the inhibition of apoptotic pathways, a modulation weakly known considering both the chemoradiotherapy resistance and CC. Thus, the objective of this study was to identify differentially expressed genes (DEGs) related to apoptosis between Responder (R) and Non-responder (NR) patients to the chemoradiotherapy, as well as the number of immune cells in the tumor microenvironment (TME). For this purpose, 21 R and 10 NR women were included in this study and cervical cancer non-stem-like cells (CCNSCs) were selected in Fluorescence-activated cell sorting (FACS). Then, the RNA-Seq was performed and all sequences were evaluated according to quality, and those with Phred < 25 as well as adapters were trimmed. The sequences pass-filter were uniquely mapped to the specific *Homo sapiens* genome loci and the read counts were submitted to the differential expression analysis comparing R to NR patients. Finally, the selection of the biomarkers was achieved in gene ontology (GO), statistical and decision tree analyses, as well as the n° of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and tumor associated tissue eosinophilia (TATES) were evaluated in morphometric analysis. In morphometric analysis, 23 patients were included according to inclusion criteria. Altogether, 2519 DEGs with $\log_2FC > 1$ or < -1 and p value < 0.05 were found, 117 of them were linked to apoptosis and only 8 were relevant according to statistical and decision tree analyses. Between the relevant DEGs, the *PNMA3* and *RASSF2* were upregulated in NR patients and downregulated in R considering all analyses performed. Furthermore, a high number of intratumoral TILs and TATES occurred in the R group, while the NR had a high number of stromal TILs. Therefore, the genes *PNMA3* and *RASSF2* upregulated in NR patients were considered as potential biomarkers related to apoptosis and chemoradiotherapy resistance, as well as a larger n° of intratumoral TILs and TATES were associated to the positive chemoradiotherapy responses in CC. Nonetheless, more studies still need to be done to confirm the likely interactions among *PNMA3*, *RASSF2*, apoptosis and chemoradiotherapy resistance in the CC.

Keywords: Cervical cancer (CC); Apoptosis; Biomarkers; Chemoradiotherapy resistance; *PNMA3*; *RASSF2*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Qualificação do principal problema a ser abordado.....	12
1.2 Hipóteses.....	13
1.3 Objetivos.....	13
1.4 Justificativa.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Câncer de colo uterino: da prevenção ao tratamento.....	15
2.2 Biomarcadores da apoptose no câncer.....	18
2.3 Biomarcadores da Apoptose e resistência quimiorradioterápica no Câncer de colo uterino...27	
3 ARTIGO	34
4 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Qualificação do principal problema a ser abordado

O CCU, apesar ter sido o quarto câncer de maior incidência e mortalidade entre mulheres no mundo e no Brasil no ano de 2020, teve um número de mortes superior à de cânceres como o de mama e colorretal em relação à quantidade de mulheres afetadas por cada uma destas patologias. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) entre 2019 e 2020, de 16710 mulheres diagnosticadas com CCU, 6627 (39.66%) morreram devido a esta patologia (INCA, 2022).

Em um estudo envolvendo 631 mulheres de cinco regiões brasileiras, 81.8% delas foram diagnosticadas com CCU em estágio localmente avançado ou superior (FIGO IIB-IV). Chama a atenção o fato de 85.1% delas, mesmo tendo realizado pelo menos um teste Papanicolau durante sua vida e 58.4% a cada 1 a 3 anos, não foi o suficiente para mudar esta realidade. Desta forma, é evidente uma elevada mortalidade devido ao CCU, mesmo sob a frequente realização de triagens clínicas das pacientes, tornando-a uma doença de rápida progressão e agravamento.

O tratamento padrão para o CCU em estágios avançados consiste em cirurgia acompanhada de quimioradioterapias, sendo os principais agentes quimioterápicos a cisplatina ou a carboplatina associadas ao uso de paclitaxel. Porém, sob estes tratamentos o tempo médio de sobrevivência para pacientes em estágio avançado ou com recorrência é de somente um ano, devido a inúmeros mecanismos de resistência como à cisplatina (RCP).

Uma das causas da RCP é o bloqueio das vias apoptóticas mediante a inibição de fatores pró-apoptóticos como de caspases ou a ativação de anti-apoptóticos como de certas proteínas da família BCL-2. Contudo, os mecanismos utilizados pelas células cancerígenas para regular a inativação das vias de morte celular e a RCP ainda não são bem conhecidos. Desta maneira, há uma crescente busca por biomarcadores da quimioradioresistência e da apoptose frente ao CCU, na tentativa desenvolver métodos de diagnóstico, prognóstico e tratamento mais eficazes.

Diante disso, alguns estudos mostraram o receptor LGR5 acoplado a proteínas G, um conhecido biomarcador para células tronco tumorais, superexpresso em linhagens de CCU resistentes a diferentes concentrações de cisplatina. No entanto, em câncer colorretal foram demonstrados papéis tanto oncogênicos quanto supressores tumorais mediados por LGR5, o que torna esta proteína um marcador molecular questionável, visto sua variação funcional em diferentes tipos de células.

Resistências a tratamentos radioterápicos também são descritas no CCU e podem ser

mediadas pela baixa expressão de *GADD45a*, uma proteína de resposta a danos no DNA. Em concordância com estes resultados, estudos com câncer pulmonar mostrou um aumento na expressão de *GADD45a* vinculado à sensibilidade ao tratamento com cisplatina. Observações como esta tornam essa molécula um marcador molecular viável tanto para a detecção de radioresistência quanto quimioresistência, mas não atribuídas unicamente ao CCU. Adicionalmente, em outros trabalhos, foi observada a ação do gene *TIP1* tanto inibindo a apoptose quanto provocando a RCP em linhagens de CCU, porém, observações semelhantes foram feitas em outros cânceres (JIANG J et al., 2021).

Todavia, a presença de marcadores moleculares associados à apoptose e (ou) à RCP no CCU não consistem nos únicos fatores responsáveis pela eficácia no prognóstico e tratamento desta patologia. Desta maneira, devido à heterogeneidade do microambiente tumoral (TME) é necessário o conhecimento sobre o conjunto de células tanto intratumorais quanto estromais que o compõe, o que inclui as células leucocitárias. Neste cenário, o número, a distribuição e o tipo de células do sistema imunológico envolvidas no tumor são determinantes nos processos oncogênicos e supressores tumorais.

Assim, em trabalhos anteriores realizados pelo grupo, um maior número de TILs CD8+ e PD-L2+ foram observados em mulheres R comparadas a NR, caracterizando um ambiente inflamatório como contribuinte nas respostas quimioradioterápicas no CCU. Logo, a procura por biomarcadores específicos tanto para a apoptose quanto para a quimioradioresistência relacionadas ao CCU, bem como o padrão de células imunológicas envolvidas neste câncer é de extrema importância. Diante disso, análises de expressão diferencial gênica comparando mulheres R com NR aos tratamentos quimioradioterápicos e análises morfométricas para a avaliação de TILs e TATES são potenciais alternativas para o encontro destes biomarcadores.

1.2 Hipóteses

Genes diferencialmente expressos em mulheres com CCU estão vinculados à resistência frente aos tratamentos quimioradioterápicos e à inibição da apoptose.

1.3 Objetivos

Objetivo geral:

Avaliar potenciais marcadores moleculares associados à resistência quimioradioterápica e à inibição da apoptose no CCU, bem como o perfil de células imune envolvidas no microambiente tumoral.

Objetivos específicos:

- Avaliar os Genes Diferencialmente Expressos (DEGs) em células não-tronco tumorais de CCU comparando mulheres R e NR aos tratamentos quimiorradioterápicos;
- Avaliar os DEGs com ontologias gênicas relacionadas à apoptose e à resistência a tratamentos quimiorradioterápicos no CCU;
- Avaliar os DEGs identificados em pacientes NR como potenciais biomarcadores associados à resistência quimiorradioterápica e à inibição da apoptose;
- Avaliar os DEGs identificados em pacientes R como potenciais biomarcadores associados à sensibilidade quimiorradioterápica e à ativação da apoptose;
- Avaliar o número, a distribuição e o tipo de células imune envolvidas no microambiente tumoral de pacientes R e NR.

1.4 Justificativa

O CCU em estágios iniciais de desenvolvimento ou precocemente diagnosticado pode ser tratado de maneira mais eficiente por meio de quimio e radioterapias ou por procedimentos cirúrgicos. Além disso, campanhas que visam a imunização de mulheres contra o vírus HPV bem como a realização de exames periódicos, acompanhamentos clínicos frequentes e o tratamento daquelas diagnosticadas com a doença tendem a reduzir drasticamente o número de casos e objetivam erradicar a patologia dentro de alguns anos. No entanto, em casos de metástases o CCU apresenta altos índices de recorrência com baixa expectativa de vida e resistência aos tratamentos disponíveis por parte das mulheres afetadas. Deste modo, como estes processos estão associados a modulações de mecanismos apoptóticos, a descoberta de biomarcadores desta via torna-se um importante alvo para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Além disso, estes mesmos marcadores moleculares também poderiam facilitar na escolha de terapias já existentes menos invasivas e mais eficazes, o que aumentaria a expectativa de vida das mulheres com CCU e reduziria os riscos de complicações pós-tratamento. Arelado a isso, o conhecimento das células do sistema imunológico envolvidas no microambiente tumoral permite a compreensão sobre quais mecanismos de defesa são responsáveis pelas respostas aos tratamentos quimiorradioterápicos. Portanto, ao se definir os biomarcadores da apoptose e resistência terapêutica, bem como as células imune envolvidas no CCU, a expectativa de erradicar este câncer torna-se uma possível realidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de colo uterino: da prevenção ao tratamento

Em 1842 foi demonstrada a associação entre o nº de relações sexuais com a ocorrência do CCU e a partir de 1970 foram levantadas as primeiras hipóteses entre as infecções por papilomavírus humano (HPV) como a causa principal deste câncer (ZUR HAUSEN, 2009). Recentemente já são conhecidos os principais fatores de risco associados ao CCU, como sendo as infecções causadas por certos tipos de HPV, o status socio-econômico, o número de parceiros sexuais, a idade no primeiro ato sexual, o número de gestações e o frequente uso de tabaco (KASHYAP et al., 2019). Dentre estes, as infecções com HPVs de alto risco, como pelos subtipos 16 e 18, representam mais de 75% dos casos de CCU, sendo estes vírus transmitidos principalmente durante relações sexuais desprotegidas, o que correlaciona a vida sexualmente ativa, com as infecções por HPVs e o CCU (FOWLER; MAANI; JACK, 2022).

Contudo, tem sido demonstrado que praticamente 99.7% ou todos os casos de CCU estão vinculados a pelo menos uma infecção prévia com HPVs de alto risco, mesmo que os testes de PCR para a detecção destes vírus dêem negativos. Em um mesmo estudo, a ocorrência de PCRs falso negativas foi apontada devido a falhas na amplificação de sequências alvo por prováveis deleções vinculadas à integração do DNA viral ao genoma hospedeiro (WALBOOMERS et al., 1999). Além destes fatores, é conhecido que apesar da existência de mais de 200 subtipos de HPVs, somente alguns são oncogênicos e caracterizados como de baixo ou alto risco. Assim, alguns destes vírus como os subtipos 6 e 11 são capazes de causar lesões intraepiteliais escamosas (LSIL/HSIL) também conhecidas como neoplasias cervicais intraepiteliais (CIN 1-3), mas não desenvolvem um carcinoma, ao contrário de subtipos como os 16 e 18 (BURD, 2003; FARIDI et al., 2011).

A capacidade de HPVs como o 16 em causar transformações celulares na camada epitelial do colo uterino contribuindo para o desenvolvimento de displasias e a origem de carcinomas invasivos, ocorre principalmente devido a oncoproteínas como E6 e E7 mediante inúmeras vias celulares (YIM; PARK, 2005). As oncoproteínas E6 foram primariamente caracterizadas por se ligar à proteína p53 não mutante e mediar a sua degradação por ativação da via de ubiquitinas- proteassomo de maneira dependente da proteína E6-AP (UBE3A). No entanto, a simples interação entre p53-E6 sem a ocorrência de degradações pode ocasionar o bloqueio de p53 e, portanto, a inibição da apoptose e favorecer a progressão do ciclo celular, de modo a contribuir com o desenvolvimento tumoral (THOMAS; PIM; BANKS, 1999).

Recentemente, já são conhecidas inúmeras ações de E6 na progressão do CCU, com todas elas afetando direta ou indiretamente as vias apoptóticas. Dentre estas há a degradação de fatores pró-apoptóticos como Bak, bem como de membros como MCM7, c-Myc, E6BP/ERC-55, paxilina e AIF, de modo a favorecer a sobrevivência das células tumorais bem como sua posterior continuidade proliferativa e invasiva (SHIMADA et al., 2020). Não diferentemente, as oncoproteínas E5 e E7 estão também envolvidas com diferentes mecanismos de inibição das vias apoptóticas, mas o conjunto de fatores anti-apoptóticos induzidos por HPVs variam conforme o seu potencial oncogênico de acordo com o subtipo viral considerado (JIANG; YUE, 2014).

Considerando todas estas abordagens é que os programas de prevenção ao CCU estão fundamentados na vacinação contra HPVs. Atualmente, estão disponíveis as vacinas Cervarix (bivalente) ou Gardasil 9, que reduziram o risco de lesões pré-câncer e a suas progressões para CIN-2/3 em mulheres de 15 a 45 anos em escala global (GATES et al., 2021). As triagens clínicas pela a realização de testes Papanicolau, de citologia líquido-baseada, de detecção de HPVs e inspeções visuais com ácido acético/Lugol de igual modo são responsáveis pela redução no número de casos de CCU.

Assim, há inúmeros projetos centralizados no diagnóstico precoce e tratamento deste câncer, a exemplo de um projeto governamental chinês que ofereceu programas de triagem para mais de 70 milhões de mulheres em mais de 1500 regiões (ZHANG, S. et al., 2020). Diante disso, é recomendada a realização de testes de HPV a cada 5 anos em mulheres entre 25 e 65 anos preferivelmente junto a testes Papanicolau, ou a cada 3 anos quando somente efetuado o teste Papanicolau, visto que a metade daquelas diagnosticadas com CCU nunca fizeram triagens durante sua vida (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

O diagnóstico primário do CCU é realizado após a coleta dos dados históricos das pacientes, da examinação pélvica e da realização de testes citológicos e(ou) moleculares durante triagens clínicas (WHO, 2014). Enquanto o diagnóstico definitivo normalmente é alcançado após os testes de triagem demonstrarem anormalidades no colo uterino, sendo então realizadas biópsias associadas ou não a exames de imagem como tomografias e ressonâncias magnéticas (BOURGIOTI; CHATOUPIS; MOULOPOULOS, 2016; MELLO; SUNDSTROM, 2022).

Estudos mostram que, a maioria das mulheres com CCU são diagnosticadas com carcinoma de células escamosas (CCS- 92.5%) e em estágios avançados da doença (FIGO II-IV – 96.4%), enquanto a minoria apresenta-se com adenocarcinomas (7.5%) e em estágios iniciais (FIGO I – 3.6%), conforme observado em centros de tratamento na Índia (BHANDARI et al., 2016). Similarmente, no Brasil, em um estudo envolvendo 631 mulheres, 72.7% foram diagnosticadas com CCS, 12.7% com adenocarcinoma e outros

14.6% obtiveram outro diagnóstico. Além disso, 516 (81.8%) mulheres estavam em estágios localmente avançados da doença ou metastáticos (FIGO IIB-IV), mesmo 537 (85.1%) delas tendo realizado ao menos um teste Papanicolau no decorrer da vida e destas, 337 (62.75%) realizado a cada 1-5 anos (RODRIGUES et al., 2022).

Desta forma, como a maioria das mulheres diagnosticadas com CCU apresentam-se em estágios avançados da doença é evidente a dificuldade no diagnóstico precoce e tratamento deste câncer, o que pôde ser observado pela morte de 56.58% das mulheres afetadas no ano de 2020, considerando o mundo todo. Sendo entre mulheres responsável por uma mortalidade em escala global superior ao câncer de mama (30%), colorretal (48%) e linfoma não Hodgkin (47%) (GLOBOCAN, 2022). Assim, no mundo, uma média de 231.000 casos de CCU são descritos anualmente, tendo 80% deles acometendo países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (SANKARANARAYANAN; BUDUKH; RAJKUMAR, 2001).

Frente ao grande desafio de centros de tratamento, de profissionais da saúde e pacientes diante do CCU é que a Organização Mundial da Saúde (OMS) traçou uma estratégia a fim de erradicar a doença dentro de alguns anos. Esta estratégia é nomeada 90-70-90 e consiste na vacinação de 90% das garotas de até 15 anos com vacinas contra HPV's, na realização de triagens clínicas em 70% das mulheres entre 35-45 anos e no tratamento de 90% daquelas diagnosticadas em estágio pré-câncer ou carcinoma invasivo (WHO, 2020). Porém, ainda há limitações quanto aos métodos de prognóstico, como a classificação histológica do grau tumoral, visto que não houve diferenças relevantes na recorrência tumoral e na sobrevivência entre pacientes com tumores bem (G1) e moderadamente (G2) diferenciados (BRAMBS et al., 2019).

No que condiz aos tratamentos disponíveis e mais utilizados para o CCU, há ainda inúmeros obstáculos quanto ao tempo de sobrevivência das pacientes. Tal fato pôde ser visto em um estudo envolvendo 202 mulheres respondedoras à terapias, sendo 149 à radioterapia externa e destas, 52 à quimioradioterapia, as quais apresentaram uma probabilidade de sobrevivência em 5 anos de somente 26% (KHAMIS et al., 2021). Em outro estudo com 144 mulheres com CCU recorrente, 73 delas apresentaram recorrência local e 71 metástases a distância. A probabilidade de sobrevivência em um período de 2 anos para 109 delas tratadas novamente foi de apenas 18.5% e considerando somente os grupos com recorrência local ou metástase à distância foram de 22.2% e 14.6% respectivamente (POOLKERD et al., 2006).

Similarmente, em outro grupo de mulheres com metástase em linfonodos periaórticos houve apenas 25% de chance de sobrevivência em um período de 3 anos (BERMAN et al., 1984), enquanto em outro conjunto de mulheres com recorrência tumoral o tempo médio livre da progressão da doença e de sobrevivência foram apenas de 7 e 24 meses

respectivamente (CHAO et al., 2021). Portanto, torna-se evidente que o CCU é um câncer com baixa expectativa de vida, independentemente da sua manifestação e dos tratamentos realizados (BERMAN et al., 1984; CHAO et al., 2021; KHAMIS et al., 2021; POOLKERD et al., 2006), especialmente por ser normalmente diagnosticado já em estágios avançados da doença (BHANDARI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2022). Desta forma, é imprescindível uma busca por novos métodos de diagnóstico, prognóstico e tratamento mais eficazes e que ofereçam melhor qualidade de vida para as mulheres que enfrentam esta doença. Para isso, o conhecimento das vias celulares responsáveis pela origem, progressão e agressividade deste câncer são essenciais e, dentre elas, destaca-se a importância da inibição da apoptose, fortemente envolvida com o CCU (JIANG; YUE, 2014; SHIMADA et al., 2020; THOMAS; PIM; BANKS, 1999).

2.2 Biomarcadores da apoptose no Câncer

A apoptose é um processo de morte celular programada associada a condições fisiológicas ou patológicas e que se distingue de outros processos de morte celular como a necrose por um conjunto de características morfológicas (**Tabela 1**) e consequentemente bioquímicas (ELMORE, 2007). A ocorrência da apoptose é dependente de um conjunto de genes associados à morte celular e de genes envolvidos com o englobamento destas células, o que torna a participação de células fagocíticas indispensável para o seu acontecimento (CHUNG et al., 2000; ELMORE, 2007).

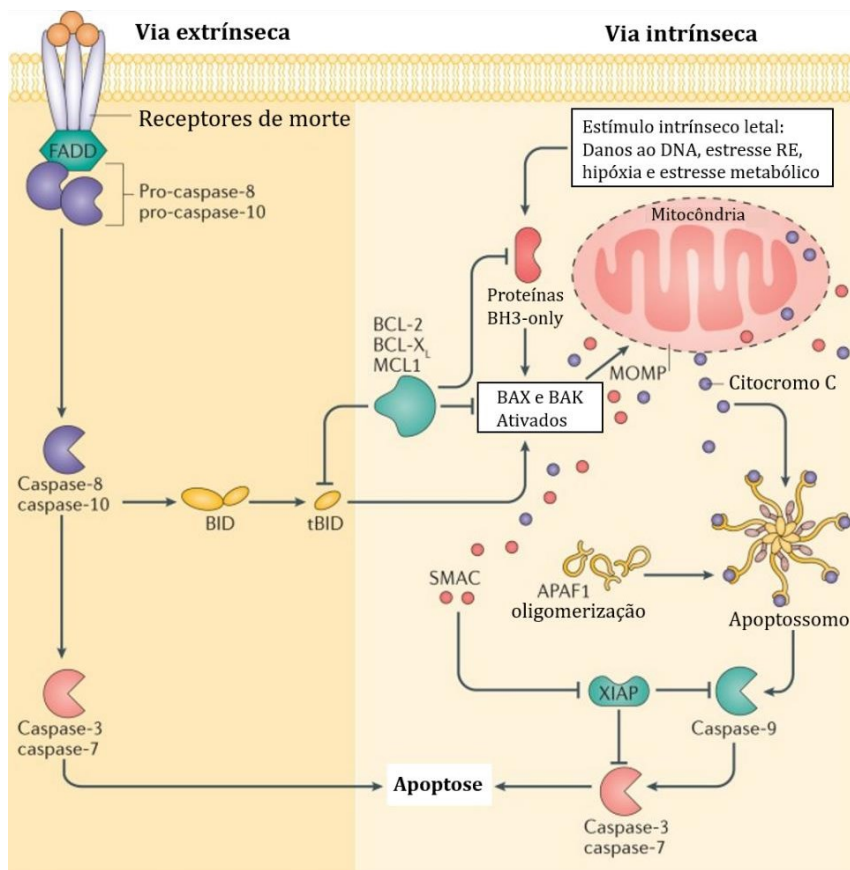
A intensidade dos sinais apoptóticos, sejam das próprias células destinadas à morte ou de outras células como as fagocíticas definem, conjuntamente, se a apoptose ocorrerá ou será revertida à sobrevivência celular (ELMORE, 2007). Desta forma, é evidente a complexidade dos eventos responsáveis pela apoptose e, neste contexto, ela pode ser classificada quanto aos mecanismos responsáveis pela sua ativação em: intrínseca ou extrínseca (**Figura 1**) (ICHIM; TAIT, 2016)

Tabela 1 – Apoptose x Necrose

Apoptose	Necrose
Células únicas ou pequenos grupos de células	Frequentemente em células contíguas
Encurtamento celular e convolução	Crescimento celular
Picnose e cariórrexe	Cariólise, picnose e cariórrexe
Membrana celular intacta	Ruptura da membrana celular
Citoplasma retido em corpos apoptóticos	Liberação citoplasmática
Sem inflamação	Inflamação normalmente presente

Fonte: Traduzido de (ELMORE, 2007)

Figura 1 – Via extrínseca x Intrínseca da Apoptose



Fonte: Traduzido e adaptado de (ICHIM; TAIT, 2016)

Legenda: A Via extrínseca da apoptose (à esquerda) é caracterizada pela sinalização de receptores de morte celular pertencentes à superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNFRSF), mediante a sua interação com ligantes específicos (ex: FAS-R(TNFRSF6) e FAS-L). Enquanto à Via intrínseca (à direita) é relacionada ao microambiente mitocondrial e inicia-se no meio intracelular, sendo caracterizada pela

sinalização de proteínas da família BCL-2, bem como pela formação do apoptossomo. A interligação entre as vias extrínseca e intrínseca da apoptose tem como marca a ativação de caspases 8 pela via extrínseca que podem permitir a formação de tBID e o seu direcionamento à via intrínseca.

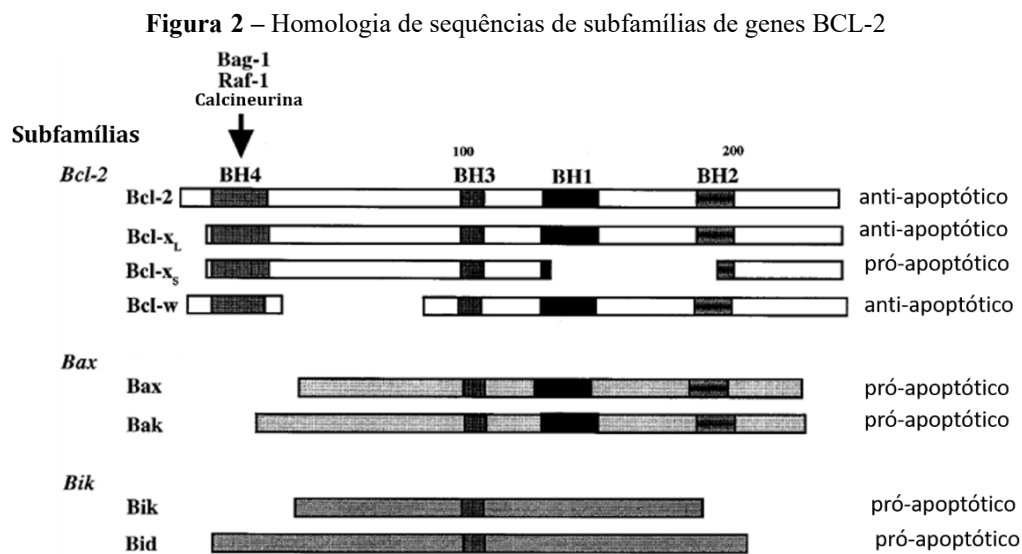
A via intrínseca da apoptose é propiciada pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, por fatores pró-apoptóticos como BAK e BAX, membros da família BCL-2, de modo a liberar sinalizadores de morte celular como citocromo C, AIF (apoptosis-inducing factor), endonucleases G, Omi/HtrA2 e Smac/DIABLO do espaço intermembrana mitocondrial (LOANE; STOICA; FADEN, 2015). Em seguida, quando no citosol, citocromos C determinam a montagem do apoptossomo junto a dATPs e APAF1 e ativam caspases-9. Smac e HtrA2 ativam caspases degradando ou sequestrando inibidores de caspases (IAPs), enquanto AIF e endonucleases G determinam a degradação do DNA independentemente de caspases (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2014). Entretanto, mesmo que inúmeros fatores como o estresse osmótico, agentes quimioterápicos e radiação possam estimular a via intrínseca da apoptose, sabe-se que os membros da família BCL-2 são os principais desencadeadores deste processo celular (LIAO, 2022).

A família BCL-2 é constituída tanto de fatores pró-apoptóticos quanto de anti-apoptóticos e há três características determinantes destas funções: 1- Os domínios BH(1-4) constituintes de cada membro da família que classificam-os em subfamílias conforme homologias de sequências (**Figura 2**); 2- As interações intermoleculares na formação de homo ou heterodímeros destas proteínas e 3- Funções que dependem de outras proteínas e(ou) condições celulares (TSUJIMOTO, 1998). Diante disso, os membros da família BCL-2 contendo somente o domínio BH3 (BIM, PUMA, tBID, BAD e NOXA) são considerados iniciadores da via intrínseca da apoptose. Deste modo, há duas formas de ativação da via intrínseca: a indireta, mediante a inibição de fatores anti- apoptóticos (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 e A1); e a direta, pela ativação de efetores pró-apoptóticos como BAX e BAK, ambas por membros contendo somente BH3 (CZABOTAR et al., 2014).

Adicionalmente, a família BCL-2 é conhecida como “*B cell lymphoma-2*”, sendo a regulação dos seus membros uma *hallmark* do linfoma de linfócitos B. Logo, a via intrínseca da apoptose também é regulada no câncer e apresenta similaridades entre os seus membros ao comparar células tumorais e normais como proteínas da família BCL-2. Diante disso, em 2016, um inibidor seletivo do fator anti- apoptótico BCL-2 foi aprovado pelo FDA (*Food and drug administration*) para o tratamento da leucemia linfocítica crônica (LLC) sob o nome de venetoclax (ABT-199). Sendo desde 2018, realizadas diferentes combinações terapêuticas com venetoclax para o tratamento de LLC

e linfoma de células B, além de uma intensa busca no desenvolvimento de novos fármacos inibidores de fatores anti-apoptóticos (**Figura 3**) (ADAMS et al., 2019).

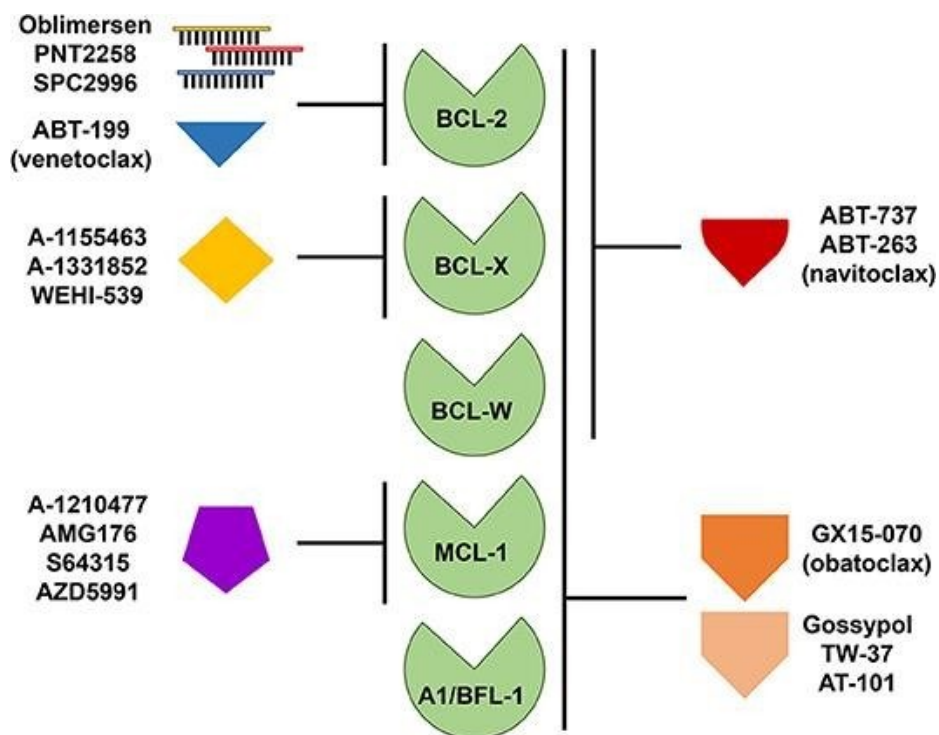
No que concerne à via extrínseca da apoptose, tem-se que a sua principal diferença em relação à via intrínseca consiste na sua ativação mediante ligantes da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), como TRAIL, e os seus receptores, neste caso como DR4 e DR5. Enquanto à via intrínseca é voltada ao microambiente mitocondrial e tem origem intracelular (**Figura 4**) (ZHONG et al., 2021).



Fonte: Traduzido e adaptado de (TSUJIMOTO, 1998)

Legenda: Homologias de seqüências entre os diferentes membros BCL-2, sendo caracterizados os domínios BH(1-4). Membros anti-apoptóticos são caracterizados pelo domínio BH4, mas não independem de seus outros componentes para exercer suas funções inibitórias, como pode ser demonstrado pelas variantes de splicing de BCL-X, com funções anti e pró-apoptóticas de acordo com a presença (BCL-XL) ou ausência (BCL-XS) de domínios BH(1-2) respectivamente. Efeitores pró-apoptóticos não apresentam domínio BH4 (Bax e Bak), mas necessitam de BH3 para suas funções, enquanto membros contendo somente BH3 são considerados iniciadores da apoptose.

Figura 3 – Agentes inibidores de proteínas da família BCL-2



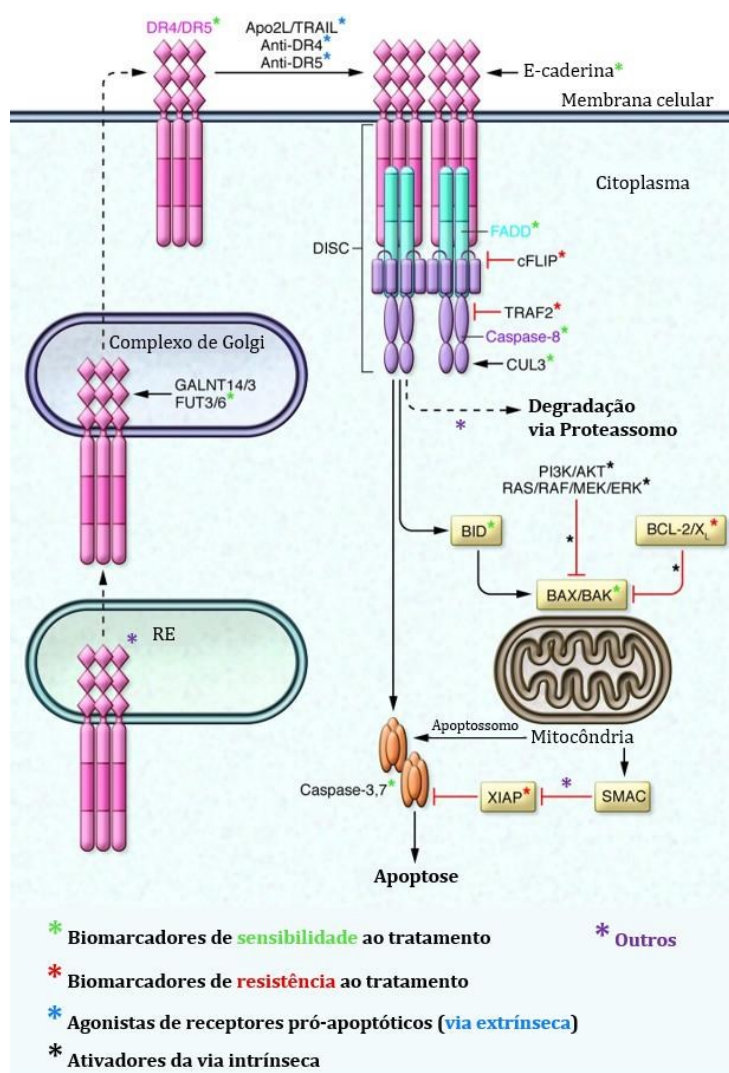
Fonte: (ADAMS et al., 2019)

Legenda: O desenvolvimento de inibidores de membros anti-apoptóticos da família BCL-2 representa uma alternativa terapêutica para diferentes cânceres com desregulações na via intrínseca da apoptose, com o destaque para a LLC, a qual tem aprovação para tratamento com o venetoclax. Somente o venetoclax se encontra aprovado para uso, estando os outros fármacos em fases de teste.

envolvidas com a apoptose, algumas têm demonstrado maior expressão em certos tipos celulares, com ênfase para os receptores TRAIL (BRAGA et al., 2012).

No entanto, diversos estudos têm apontado que a localização celular destes receptores, a presença de proteínas acessórias e o tecido tumoral considerado altera suas vias de sinalização. Neste contexto, os receptores TRAIL nucleares são responsáveis pela inibição da maturação de miRNAs let-7 desencadeando um aumento na expressão de seus alvos e na proliferação de células cancerígenas. Enquanto no citoplasma podem ocasionar a ativação de vias pró-inflamatórias e metastáticas provocando resistência a tratamentos quimioterápicos. Porém, a sua localização citoplasmática e nuclear não são necessariamente pró-oncogênicas, visto que pacientes com câncer pulmonar de células não pequenas aumentaram sua sobrevivência sob estas condições (BERTSCH et al., 2014).

Figura 5 – Estratégias de tratamento e biomarcadores da apoptose no câncer



Fonte: Traduzido e adaptado de (ASHKENAZI, 2015)

Legenda: Estratégias de tratamento para o câncer tendo como alvo as vias apoptóticas podem ser representadas pela potencialização de ligantes TRAIL por meio da sua multimerização com Apo2L (azul), pela síntese de anticorpos anti-receptores de morte celular (DR4 ou 5) ou pela inibição de fatores anti-

apoptóticos da família BCL-2. Biomarcadores da apoptose no câncer podem determinar condições para a resistência ou sensibilidade a tratamentos, caso bloqueiem ou ativem as vias apoptóticas respectivamente.

Contudo, apesar de vários estudos e triagens clínicas consideravelmente se concentrarem mais em vias canônicas da apoptose como estas mencionadas, outros fatores também tem sido explorados quanto à sua regulação no câncer. Dentre eles, RASSF1 é considerado um supressor tumoral dentre os membros da família RASSF, sendo a sua expressão inibida pela hipermetilação de sua sequência promotora em células tumorais (HESSON; COOPER; LATIF, 2007) .

Além disso, tem sido demonstrada uma interação de RASSF1 e RASSF6 com o membro MOAP-1 (PNMA4, MAP-1), da família de antígenos paraneoplásicos (PNMA), como sendo responsáveis pela indução da apoptose mediante o recrutamento de efetores BAX (PANG et al., 2018^a). Neste contexto, de acordo com TAN, K. O e colaboradores (2005), MOAP-1 (modulator of apoptosis-1) é localizado na membrana mitocondrial externa celular devido à sua sequência peptídeo sinal aminoterminal. Além disso, em condições de estímulos apoptóticos desencadeou a apoptose de células tumorais mamárias MCF-7 de maneira dependente de Bax mas não de Bak.

Recentemente, vetores tricistrônicos de MOAP-1-BAX-RASSF1A demonstraram resultados de quimiosensibilização à cisplatina e etoposídeo em linhagens de câncer de mama MCF-7 e em triplo negativas BMET05, mediante a ativação apoptótica dependente de Bax. Além disso, estes vetores reduziram o crescimento tumoral em experimentos *in vivo* e, os mesmos vetores mas contendo a deleção do domínio semelhante a BH3 de MOAP-1 provocaram a quimioresistência destas linhagens, por possível sequestro de RASSF1A (LEE et al., 2020).

Interessantemente, outros estudos demonstraram que MOAP-1 é uma proteína de curta meia vida (~25min), a qual é estabilizada por estímulos pró-apoptóticos, como pela sinalização de TRAIL. Além disso, a regulação desta estabilidade foi correlacionada com o sistema ubiquitina- proteassomo, visto que os níveis transcricionais e traducionais de MOAP-1 não se alteraram sob diferentes condições e foi demonstrado um padrão de poliubiquitinação desta proteína (FU; SUKUMARAN; YU, 2007). Sinalizações apoptóticas pela ativação da via extrínseca cooperam para as funções de MOAP-1, como já mencionado sobre a estabilidade e aumento dos níveis desta proteína mediante TRAIL mas, também, por TNF-alfa (LAW; YU; BAKSH, 2012).

Todavia, também foi mostrada uma resistência à apoptose desencadeada por receptores Fas em camundongos MOAP-1^{-/-} (*knockout*) em comparação com MOAP-1^{+/+}, de maneira associada à redução dos níveis de tBID nas mitocôndrias. Neste mesmo trabalho, o acúmulo de tBID nas mitocôndrias foi atribuído à interações entre MOAP-1 e MTCH2,

o que não foi observado em camundongos *knockout* (TAN et al., 2016).

Neste sentido, recentemente, interações entre PNMA4 e alfa- mangostina, um composto proveniente da planta *Garcinia mangostana* foram correlacionadas à ativação da apoptose mediante o recrutamento de Bax e a inibição de BCL-XL, em linhagens MCF-7 (SIMON et al., 2022). Portanto, PNMA4 pode representar um potencial alvo terapêutico no câncer, com destaque para os diferentes estudos mencionados frente ao câncer de mama, visto sua intensa participação nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

Outros membros da família PNMA, como PNMA1 foram inicialmente caracterizados como responsáveis pela doença autoimune paraneoplásica, sendo considerados neuro oncogenes. No entanto, a presença de um domínio semelhante a BH3 em PNMA1 também demonstrou o seu envolvimento na apoptose mediada por membros da família BCL-2, inicialmente em doenças neurodegenerativas (CHEN; D’MELLO, 2010). Entretanto, outros estudos apontaram que a superexpressão de PNMA4 e PNMA1 promoveram a quimiosensibilização de linhagens MCF-7, mostrando a semelhança entre estas proteínas em seus papéis pró- apoptóticos no câncer (SU; WANG; MENG, 2022). Considerando outros membros da família PNMA, análises clínicas de pacientes com encefalites diencefálicas, tronco cerebrais e(ou) límbicas demonstraram que 89.5% dos pacientes estudados com este diagnóstico e com marcação positiva para anticorpos anti-Ma2 (anti-PNMA2) também foram diagnosticados com câncer, sendo 53% deles com tumores primários testiculares (DALMAU, 2004).

Corroborando com estas observações quanto ao envolvimento de PNMA2 na progressão do câncer, estudos com linhagens MCF-7 demonstraram que esta proteína é responsável por antagonizar ações pró-apoptóticas mediadas por PNMA4 ou PNMA1. Tal papel foi sugerido devido a imunoprecipitação de PNMA2 com estas proteínas, bem como pela redução de células anexina V positivas, uma marca apoptótica, provocada pela presença de PNMA2 em comparação à sua ausência. Além disso, células expressando somente PNMA2 também demonstraram um aumento na sua viabilidade, pois reduziram a sua condensação nuclear, outra marca da apoptose (LEE; PANG; TAN, 2016). Por fim, em modelos *in vivo* de câncer pulmonar de células não pequenas foi demonstrado que a superexpressão de PNMA5 foi responsável por eventos de metástase e diferenciação celular óssea mediante a sinalização de proteínas BMP2 (HUANG et al., 2021).

Portanto, diante desta variedade funcional molecular observada ao considerar diferentes cânceres e vias celulares como as apoptóticas é que torna-se necessário a caracterização dos fatores envolvidos com a progressão e supressão tumoral no CCU. Deste modo, métodos robustos para a avaliação de eventos celulares e moleculares devem ser utilizados, visto que este câncer é normalmente diagnosticado já em estágios avançados como mencionado anteriormente, o que o caracteriza como sendo de rápida progressão e difícil

tratamento. Neste sentido, os eventos pró e anti-apoptóticos envolvidos nesta malignidade são de suma importância, visto que a inibição dos processos de morte celular é uma marca do câncer bastante correlacionada com a resistência a tratamentos quimio e radioterápicos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.3 Biomarcadores da Apoptose e resistência quimiorradioterápica no Câncer de colo uterino

O diagnóstico padrão, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento para o CCU se fundamentam em testes Papanicolau, no entanto, entre inúmeros sistemas de saúde ainda há uma demonstração de baixa sensibilidade desta citologia (34-94%). Em outras palavras há um número significativo de resultados falsos negativos frente ao teste, mesmo este apresentando alta especificidade (poucos casos falso positivos). Diante disso, diversos resultados tornam-se inconclusivos quanto à caracterização de LSIL e HSIL e classificam estas lesões do colo uterino como atípicas de estado incerto ou de alto grau respectivamente (do inglês, ASCUS e ASC-H) (WENTZENSEN; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2007).

Assim, na tentativa de desenvolver novos métodos de diagnóstico e prognóstico, alternativas como imunocitologias para a detecção de p16^{INK4A} têm garantido maior sensibilidade e similar especificidade no diagnóstico do CCU em comparação ao Papanicolau (BAL et al., 2012; HERBERT THOMS, 1943; NAJIB et al., 2020; NANDA et al., 2000; TSOUMPOU et al., 2009). No caso destes testes, há uma correlação entre o aumento da expressão de p16^{INK4A} com a progressão de estágios pré- cancer para carcinomas invasivos, sendo um potencial biomarcador para o CCU (HU et al., 2005; TSOUMPOU et al., 2009).

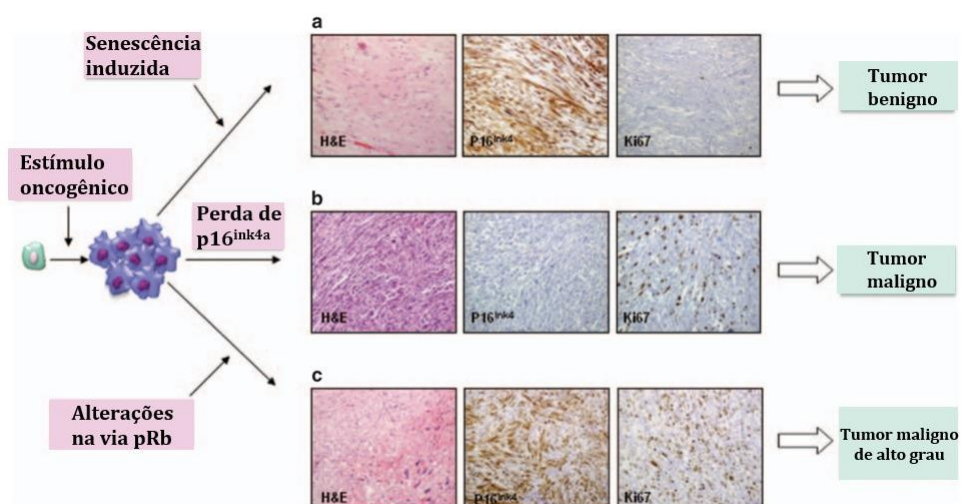
Porém, este aumento na expressão de p16^{INK4A} foi correlacionado à infecções por HPVs, devido às oncoproteínas E7 interromperem a ligação entre proteínas RB e fatores de transcrição E2F. Deste modo, E2F livre estimula a expressão de p16^{INK4A}, que em condições de estresse genômico em células normais, provocaria a apoptose mediante a ativação de p53. Mas, em células HPV+, as oncoproteínas E6 degradam p53 e a superexpressão de p16^{INK4A} não desencadeia efeitos celulares, de modo com que este fator, sob estas condições, não tenha funcionalidade e não demonstra um potencial alvo terapêutico para o tratamento do CCU (KHLEIF et al., 1996; SANO et al., 1998). Diferentemente, em outro estudo envolvendo pacientes com adenocarcinoma do colo uterino foram observadas correlações entre um aumento na expressão de p16^{INK4A} e a redução no número de casos de metástase em linfonodos pélvicos, da invasão do espaço linfovascular e da progressão da doença de FIGO IIB para estágios superiores. Além disso,

uma melhoria na sobrevida global e livre de progressão da doença foi observada em mulheres $p16^{INK4A+}$ em relação a $p16^{INK4A-}$ (ISHIKAWA et al., 2021).

Portanto, um grande desafio é compreender o verdadeiro papel de $p16^{INK4A}$ em diferentes cânceres, mas recentemente 3 possibilidades de atuação apontam este gene como supressor tumoral (**Figura 6**). A primeira delas é que em tumores benignos $p16^{INK4A}$ é responsável pela senescência celular induzida por oncogenes reduzindo a capacidade proliferativa de células cancerígenas, demonstrada por forte regulação negativa do marcador de proliferação ki67. O segundo mecanismo é que em tumores malignos há uma hipermetilação das sequências promotoras de $p16^{INK4A}$ ou um sequestro citoplasmático de suas proteínas, com sua consequente inibição a nível transcricional ou pós-traducional. Por fim, em tumores relacionados a HPVs ou outros fatores oncogênicos desreguladores da via de proteínas Rb há uma superexpressão deste gene devido a um mecanismo de feedback negativo mediado por fatores de transcrição E2F. No entanto, oncoproteínas a exemplo de E6 e E7 bloqueiam as ações mediadas por fatores como p53 e Rb, consequentemente inativando as funções de $p16^{INK4A}$ mesmo sob alta expressão (ROMAGOSA et al., 2011).

Assim, $p16^{INK4A}$ similarmente a outros inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKIs), como p14ARF, p21 e PIC1 são frequentemente supressores tumorais que desencadeiam a interrupção do ciclo celular e a regulação da apoptose em células cancerígenas (ABBAS; DUTTA, 2009; CHOW; ANG, 1995; EYMIN et al., 2003; GAO, 2015).

Figura 6 - $p16^{INK4A}$ em tumores benignos (a), malignos (b) ou relacionados a HPVs (c)



Fonte: Traduzido e adaptado de (ROMAGOSA et al., 2011)

Legenda: (a) Em tumores benignos, $p16^{INK4A}$ encontra-se superexpresso e é responsável pela senescência celular induzida por oncogenes, de modo a reduzir os níveis do marcador de proliferação ki67. (b) Em tumores malignos, a expressão de $p16^{INK4A}$ é inibida por diferentes mecanismos, o que aumenta os níveis de ki67 e, consequentemente, a proliferação celular. (c) Em tumores malignos de alto grau, se há alterações na via de proteínas Rb, como por meio das oncoproteínas E7 de HPVs, há um aumento na

expressão de p16^{INK4A} por *feedback* negativo, mas ele se torna afuncional devido ao bloqueio de seus alvos, como p53 e Rb.

Contudo, todos estes fatores são reguladores canônicos do ciclo celular e demonstram-se alterados por consequência das *hallmarks* associadas ao câncer, não sendo específicos ao CCU (AGRAWAL et al., 2006; BRETT LANGLEY et al., 2007; WEBER et al., 2002). Mas, mesmo sendo comuns entre diferentes tipos de células tumorais, eles estão também relacionados à quimio e radio sensibilidade no CCU (FU et al., 2018; HUANG et al., 2022; SCHWARZ et al., 2012).

Neste sentido, inúmeros mecanismos são vinculados à quimio e(ou) radio resistência para este câncer, sendo a resistência à cisplatina (RCP) um dos principais. A inibição da apoptose induzida pela cisplatina é provocada por inúmeros fatores como a redução da expressão de caspases, de efetores pró-apoptóticos da família BCL-2 e de MAPKs. Além disso, a perda funcional de p53, a superexpressão de fatores anti-apoptóticos da família BCL-2 ou a regulação positiva de proteínas do sistema imune como NF-kB e TNFAIP8, também são processos vinculados à esta inibição da apoptose e RCP no CCU (ZHU et al., 2016).

Neste contexto, biomarcadores de diferentes naturezas são explorados quanto ao seu papel na quimioradioresistência no CCU. Dentre eles, os RNAs não codificantes (ncRNAs) como os long-noncoding (lncRNAs) tem se tornado alvos frequentes em estudos com câncer. Assim, em linhagens SiHa e HeLa, células de carcinoma do colo uterino resistentes à radiação foi demonstrado um padrão de radioresistência relacionados a um aumento na expressão do lncRNA UCA1. Além disso, também foi observada uma ativação da via glicolítica nestas linhagens mediante a regulação positiva da hexoquinase 2 (HK2) por UCA1 (FAN et al., 2018).

Contrariamente, o lncRNA intergênico LINC00657 se encontrou pouco expresso em linhagens celulares de CCU mediante análises de RT-PCR. Mas, no mesmo estudo, ao transfectar estas células com lentivírus expressando este lncRNA foi demonstrada uma redução na proliferação e invasão celular. Além disso, LINC00657 foi apontado como um potencial indutor de células natural killer (NK) mediante o sequestro do microRNA miR-20a-5p e a ativação de seus alvos RUNX3/DR5, sendo um potencial supressor tumoral do CCU, mesmo não associado a experimentos de quimioradioresistência (QIN et al., 2021).

Similar a UCA1, o lncRNA SNHG6 garantiu a radioresistência de linhagens SiHa e HeLa, mas sob condições de silenciamento promoveu a radiosensibilidade e apoptose destas células. Interessantemente, análogo ao LINC00657 este lncRNA se comportou como RNA competitivo endógeno (ceRNA) de miRNAs, sendo um ceRNA do miR-485- 3p que

têm como alvo o gene *STYX* e, este mecanismo estimulou o crescimento tumoral (LIU.J; LIU.X; LI.R, 2020). Não diferentemente, em outros cânceres *SNHG6* é um potencial oncogene, sendo ligado à quimioresistência e inibição apoptótica, bem como atuando como ceRNA de miRNAs, o que o torna um possível biomarcador para o diagnóstico e prognóstico tumoral (WANG et al., 2020).

A importância dos lncRNAs também está presente nos mecanismos de RCP, pois experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a sensibilidade à cisplatina devido ao aumento na expressão de *GAS5* no CCU, um lncRNA com mecanismo de ceRNA diante do miR-21 e que garante a sensibilidade a esta quimioterapia pela regulação de miR-21 e *PDCD4* (FANG et al., 2020).

Portanto, torna-se evidente a importância tanto de lncRNAs quanto de miRNAs e seus mRNAs alvos na quimioradioterapia, sendo a maioria dos lncRNAs oncogenes e os miRNAs supressores tumorais quanto ao CCU (**Figura 7**). Tal fato pode ser evidenciado pelos mecanismos de “esponja” dos lncRNAs, os quais atuam como ceRNAs de miRNAs favorecendo a ativação dos seus alvos, que por sua vez estimulam a progressão do CCU (CÁCERES-DURÁN; RIBEIRO-DOS-SANTOS; VIDAL, 2020).

No entanto, uma das principais vias relacionadas ao desenvolvimento do carcinoma do colo uterino é a inibição da apoptose e, neste caso, alguns lncRNAs podem se comportar como supressores tumorais. A superexpressão de *MEG3* por exemplo foi responsável por reduzir os níveis de proteínas *BCL-2* anti-apoptóticas e aumentar o fator pró-apoptótico *Bax* e *p21* (WANG X et al., 2017). Este mecanismo é possivelmente mediado pela captura do miR-21-5p por este lncRNA, o que caracteriza-o como supressor tumoral no CCU e o miR-21 como oncogene, similar a *GAS5* mencionado anteriormente (FANG et al., 2020; ZHANG et al., 2016).

Similarmente, *GAS5* também atua como supressor tumoral e indutor da apoptose neste câncer por outras ações, como a quimiosensibilidade ao paclitaxel, pela repressão de miR-196a e miR-205, a qual desencadeia a superexpressão de *FOXO1* e *PTEN* respectivamente (YANG et al., 2017). Claramente, os papéis oncogênicos e supressores tumorais dos lncRNAs, miRNAs e até mesmo de outros RNAs como circRNAs variam de acordo com as condições celulares (TORNESELLO et al., 2020).

O miR-195 por exemplo foi sugerido como indutor da quimiosensibilidade e apoptose da linhagem de células *CaSki* de CCU, enquanto o seu repressor lncRNA *PVT1* foi associado à quimioresistência (SHEN; CHENG; WANG, 2017). Contrariamente, *GAS5* foi vinculado à radiosensibilidade junto à proteínas *IER3*, enquanto um dos seus vários alvos, o miR-106b, à radioresistência (ZHANG et al., 2022). Até o momento, inúmeros ncRNAs foram descritos quanto aos seus efeitos na regulação da apoptose e resistência quimioradioterápica no CCU, sendo os seus mRNAs alvos e suas proteínas

correspondentes consequentemente afetados.

Contudo, alguns estudos também demonstraram a associação direta entre proteínas e a quimioresistência, como a superexpressão do receptor LGR5 garantindo a RCP sob diferentes concentrações de cisplatina (CAO et al., 2017). No entanto, diferentes estudos demonstraram papéis tanto oncogênicos quanto supressores tumorais mediados por LGR5 em câncer colorretal, o que torna a especificidade desta proteína como marcador molecular questionável, visto sua variação funcional em diferentes tipos de células (MORGAN; MORTENSSON; WILLIAMS, 2018).

Adicionalmente, a proteína GADD45a garantiu a radiosensibilidade de células HeLa resistentes por meio da inibição de óxido nítrico sintases endoteliais (eNOS) e induzíveis (iNOS) e a diminuição citoplasmática de APE1 (LI et al., 2018). Em concordância, em adenocarcinoma de células pulmonares LIMD1 concomitantemente à GADD45a promoveram a quimiosensibilidade à cisplatina (ZENG et al., 2020).

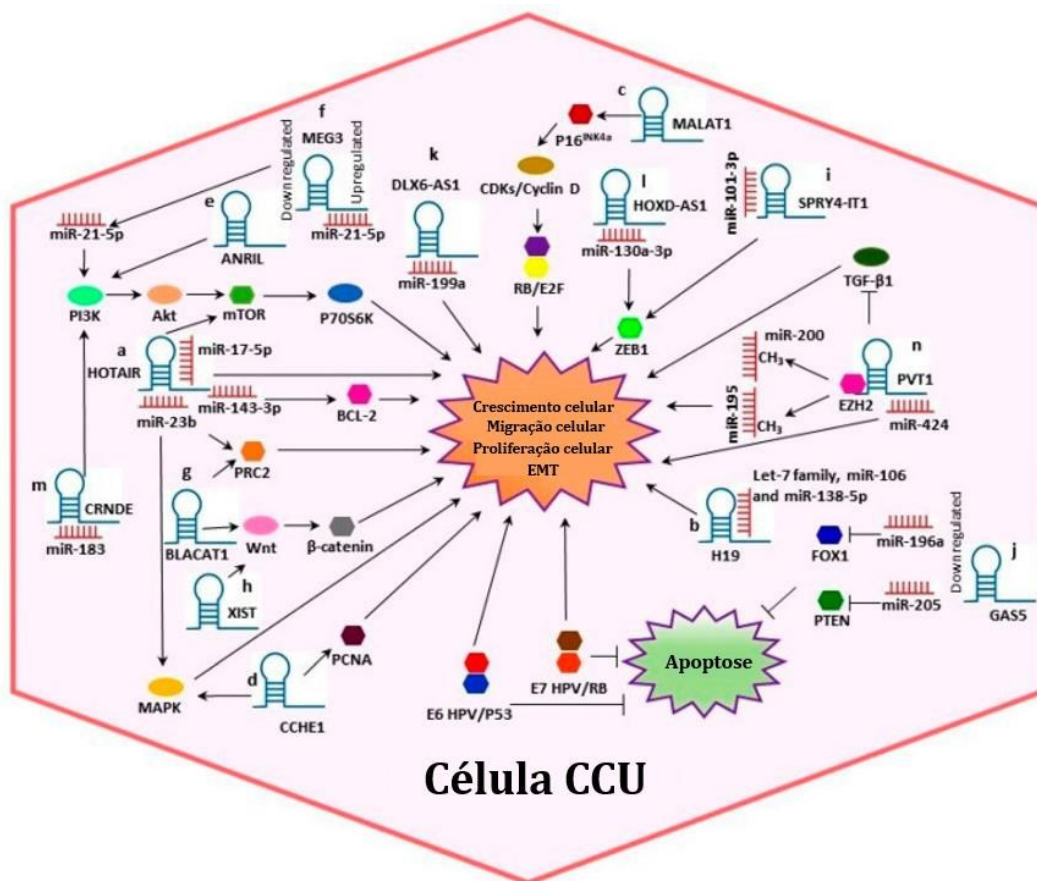
Desta forma, com o avanço tecnológico um número cada vez maior de biomarcadores atribuídos à quimio ou radioresistência, bem como à apoptose no CCU podem ser descobertos simultaneamente. Assim, métodos como microarranjos permitiram a detecção de 20 genes *upregulated* e 14 *downregulated* em CCU, por meio de uma única análise. Dentre estes genes foi confirmada a superexpressão de MMP3, UBE2C e p16 em amostras de câncer em comparação a normais por imunohistoquímica, o que demonstra a eficácia dos resultados obtidos pelos microarranjos (RAJKUMAR et al., 2011). Analogamente, em um estudo com células tronco tumorais do colo uterino foram encontrados 1050 genes diferencialmente expressos comparando 21 pacientes respondedoras (R) com 10 não respondedoras (NR) à quimioradioterapia, sendo estas análises realizadas mediante sequenciamentos de RNA (RNA-Seq) de nova geração (NGS) (ZUCCHERATO et al., 2021).

Todavia, ainda há poucos trabalhos relacionados à análises de expressão diferencial por meio de RNA-Seq e, metodologias como esta poderiam correlacionar DEGs com a apoptose e a quimioradioresistência no CCU. Dentre eles, RASSF2 é um potencial alvo, visto que a sua hipermetilação é muito mais frequente em CCS do que em CINs, de modo a causar uma redução da sua expressão vinculada à uma curta sobrevida de pacientes com CCU (GUERRERO-SETAS et al., 2013). Além disso, o papel supressor tumoral de genes da família RASSF têm sido cada vez mais evidentes em CCU, como demonstrado em um estudo comparando 126 amostras tumorais com 64 normais. Neste trabalho foi correlacionada a superexpressão do miR-224 com reduzidos níveis da proteína RASSF8 e com o avanço de estágios FIGO, a ocorrência de metástases nodais, bem como com o aumento de proliferações, invasões e migrações celulares (HUANG et al., 2016).

Por fim e não menos importante, genes da família PNMA também

compreendem a potenciais alvos biomarcadores para o CCU, pois recentemente foi constatada pela primeira vez uma associação entre anticorpos anti-Ma2 (anti-PNMA2), encefalites e o diagnóstico clínico de CCU recorrente (NEY; MESSERSMITH; BEHBAKHT, 2014). Finalmente, vale ressaltar que em inúmeros cânceres foram identificadas interações entre os membros da família RASSF e PNMA, como já mencionado (CHEN; D’MELLO, 2010; DALMAU, 2004; FU; SUKUMARAN; YU, 2007; HUANG et al., 2021; LAW; YU; BAKSH, 2012; LEE et al., 2020; LEE; PANG; TAN, 2016; PANG et al., 2018a; SIMON et al., 2022; SU; WANG; MENG, 2022; TAN et al., 2016, 2005) e, estas foram ligadas à regulações da apoptose (**Figura 8**) e resistências quimio ou radioterápicas.

Figura 7 – Ação de lncRNAs e miRNAs no CCU

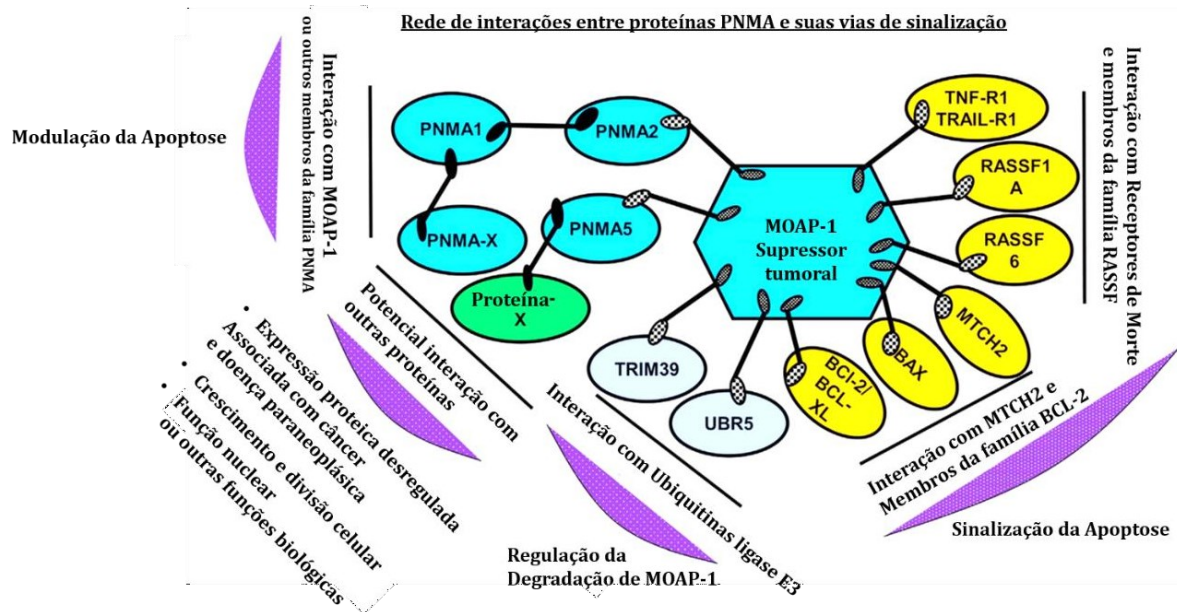


Fonte: Traduzido de (CÁCERES-DURÁN; RIBEIRO-DOS-SANTOS; VIDAL, 2020)

Legenda: A maioria dos lncRNAs atuam como oncogenes e ceRNAs no CCU, sendo responsáveis pela captura de miRNAs e a consequente ativação dos seus mRNAs alvos, o que por sua vez facilita a tradução destes mRNAs em suas proteínas correspondentes e a progressão deste câncer.

Contrariamente, os miRNAs se comportam como supressores tumorais, porém, de acordo com as condições celulares as funções de ambos ncRNAs mencionados variam, tendo lncRNAs responsáveis por mecanismos como a quimioradiosensibilidade e a indução da apoptose, a exemplo de GAS5 e MEG3 respectivamente.

Figura 8 – Interações entre proteínas RASSF e PNMA e a regulação da apoptose



Fonte: Traduzido e adaptado de (PANG et al., 2018)

Legenda: A interação entre membros das famílias PNMA e RASSF desencadeiam a ativação ou a inibição da apoptose no câncer.

MOAP-1 também conhecido como PNMA4 é o membro mais estudado da família PNMA e ao interagir com receptores de morte celular como TNF-R1 e TRAIL-R1, bem como com RASSF1/6 promove a ativação da apoptose.

Porém, a ligação de MOAP-1 a outros membros como PNMA2 provocaram a inibição deste mecanismo de morte celular. Os mecanismos efetores apoptóticos de MOAP-1 ocorrem mediante a ativação de BAX, um dos principais fatores pro-apoptóticos da família BCL-2, mas interações de MOAP-1 com outras proteínas são responsáveis pela regulação da apoptose em diferentes cânceres e inclusive o CCU.

3 ARTIGO

High throughput sequencing reveals the Upregulation of *PNMA3* and *RASSF2* associated with chemoradiotherapy resistance in cervical cancer patients

Angelo Borges de Melo Neto^{*a,1}, Fábio Ribeiro Queiroz^{*b,1}, Natália Gregório Custódio^{c,2}, Izabela Ferreira Gontijo de Amorim^{b,2}, Laurence Rodrigues do Amaral^{a,2}, Pedro Luiz Lima Bertarini^{a,2}, Telma M. R. F. Franco^{b,2}, Andrea Teixeira-Carvalho^{d,2}, Olindo A. Martins-Filho^{d,2}, Kenneth J. Gollob^{e,2}, Paulo Guilherme O. Salles^{b,2}, Wander de Jesus Jeremias^{f,2}, Matheus de Souza Gomes^{a,2}, Letícia da Conceição Braga^{**b,2}

a Laboratory of Bioinformatics and Molecular Analysis, Federal University of Uberlândia, Patos de Minas, MG, Brazil

b Laboratory of Translational Research, Research and Teaching Center, Institute Mario Penna, Belo Horizonte, MG, Brazil

c Laboratory of Cellular and Molecular Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

d René Rachou Institute - Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil

e Brazilian Israeli Beneficent Society Albert Einstein, Albert Einstein Education and Research Israeli Institute.

f Laboratory of Experimental Pharmacology, Pharmacy School, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

Contact information for corresponding author:

****Letícia da Conceição Braga**

leticia.braga@mariopenna.org.br

Núcleo de Ensino e Pesquisa, Instituto Mário Penna

Rua Gentios, 1420. Belo Horizonte – MG, Brazil. 30380-490

Phone: +55 31 32999528

*These authors contributed equally to this study

ABSTRACT

Objective

This study aims to identify the Differentially Expressed Genes (DEGs) and the immunological cells as potential biomarkers of Cervical Cancer (CC) response to chemoradiotherapy

Methods

A total of 31 patients participated in the study and were classified according to histopathological diagnosis and as responders (R) or non-responders (NR) to chemoradiotherapy response. First, the survival analysis time of these patients was evaluated. Then, morphometric analysis was

used to establish the pattern of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) in both groups. Cervical cancer non-stem cells (CCNSCs) were selected in the fluorescence activated cell classification (FACS). Lastly, RNA sequencing, DEG analysis and selection of biomarkers associated to the chemoradiotherapy response were performed.

Results

Altogether, 2519 DEGs were found comparing R to NR patients, having $\log_2FC > 1$ or < -1 and $\text{padj value} < 0.05$. Of these, 117 DEGs were associated with apoptosis and only 8 were relevant and selected as potential biomarkers, being 6 DEGs upregulated in group I of R patients and downregulated in groups II and III. Meanwhile, *PNMA3* and *RASSF2* genes were upregulated in the group III of NR patients and downregulated in R women of the other groups. Finally, the R patients showed a high number of TILs in intra-tumoral region (iTILs), while the NR group had a raised number of stromal TILs (sTILs).

Conclusions

The *PNMA3* and *RASSF2* genes proved to be potential biomarkers related to chemoradiotherapy resistance in CC and can be target in the prognosis and treatment of this malignancy.

Keywords: Cervical Cancer, *PNMA3*, *RASSF2*, TILs and TATE

Research Highlights

- *PNMA3* and *RASSF2* are probable anti-apoptotic molecules related to chemoradiotherapy resistance in CC
- iTILs are probably linked to a better chemoradiotherapy response in CC
- sTILs are probably contributors to the chemoradiotherapy resistance

INTRODUCTION

Cervical Cancer (CC) is considered the fourth most common female malignancy and the fourth cause of cancer death among women worldwide with an estimated 604,127 cases and approximately 341,831 deaths in 2020. It is a disease of high impact on women's health and of major concern, with a forecast of 847 thousand new cases in 2040 [1]. The distribution of CC differs across the world, highlighting the large disparities in incidence and mortality that exist between developed and developing countries [2], with morbidity and mortality rates in high-income countries showing a clear decline, mainly due to the presence of an infrastructure to provide adequate follow-up and treatment [3]. The most common histological subtypes of CC are squamous cell carcinoma and adenocarcinoma,

accounting for approximately 80% and 20% of invasive cervical cancer, respectively [4]. Early diagnosis increases the chances of treatment success and directly impacts patient survival rates. When detected at an early stage, the 5-year survival rate for patients with invasive CC is 92%. At the stage where CC has already spread to surrounding tissues or organs and/or regional lymph nodes, the 5-year survival rate is 58%. Finally, in cases of distant metastases, the 5-year survival rate is 17% [5].

Improving survival remains the main objective of treatment, varying according to the stage of cancer, presence of metastases, or recurrence [6]. Thus, one of the obstacles is the success of chemoradiotherapy due in part to the cisplatin resistance (CPR), which can be either intrinsic or acquired. Besides that, studies demonstrated that the molecular mechanisms related to the development of CPR are complex and may be linked to very specific characteristics, such as increased DNA damage repair, activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT), and inactivation of apoptosis [7].

In this context, a group of genes are assigned to EMT and metastases occurrences distinguishing two tumor cell types: cancer non-stem cells (CNSCs) and cancer stem cells (CSCs) (REFE). Different molecular markers enable segregate CNSCs and CSCs, such as CD44⁺/CD24^{low} related to cervical cancer stem-like cells (CCSCs), apoptosis and radioresistance, but few is known about them, mainly as for CNSCs (REFE).

Regarding to apoptosis escape is a hallmark of cancer associated to chemotherapy resistance, but studies that allow a better understanding of the molecular mechanisms responsible for this process are still needed for the improve treatment outcomes in CC (REFE).

Therefore, this study aimed to identify Differentially Expressed Genes (DEGs) in non-stem cervical cancer cells (NCCSCs) in order to point to potential biomarkers involved in apoptotic pathways and response to chemoradiotherapy. Thus, would be possible perform a prognosis and a decision on the type of treatment more individualized and accurate, contributing for the improvement of those affected by CC. For this, the purpose was, based on tumor biopsies taken at the time of diagnosis, to monitor patients with CC and observe whether they are responders (R) or non-responders (NR) to chemoradiotherapy.

MATERIAL AND METHODS

Patients Recruitment and Samples Selection

Samples of 31 patients with CC were collected in Mario Penna Institute (Belo Horizonte, Brazil) from August 2017 until May 2019. The study was approved by the local Institutional Review Board (Number 1.583.784). To be included in this study, the patients should meet inclusion criteria such as no previous history of cancer or any immune diseases, histopathological diagnosis of adenocarcinoma or squamous cell carcinoma, a

cancer diagnosis in stage II, or III of FIGO classification, and have the informed consent form signed. After the diagnosis and biopsy, the patients underwent chemoradiotherapy and all clinical data were collected and analyzed. The screening of patients was based on two main criteria: response (R) and non-response (NR) to treatment. Based on oncological gynecological parameters, patients were considered R when there was no detection of cervical neoplastic lesions up to 8 months after chemo-radiation. Likewise, patients were considered NR when there was the persistence of cervical neoplastic lesions, including partial response, tumor progression, or stable disease, up to 8 months after treatment. To confirm the response status of the patient's treatment, clinical exams (vaginal, pelvic, abdominal), pathological analyzes, and imaging exams were considered. To characterize the cohort of this study survival outcomes and the hazard ratio for disease progression or death were assessed via Kaplan-Meier methods and compared using Log-rank tests, using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, USA).

MORPHOMETRIC ANALYSIS

The cervical biopsies specimens initially fixed in 10% buffered formalin, were processed into paraffin blocks and stored at room temperature. From the 31 patients' histological sections analyzed, eight did not achieve the inclusion criteria for adequate evaluation of the tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and Tumor-associated tissue eosinophilia (TATE). Thus, a total of 23 patients were included in this histological evaluation (Supplementary Figure 1). The histopathology reports of the cervical biopsies were issued by the pathologist responsible for the histopathology sector at Mario Penna Hospital. To ensure that the entire area of tumor evaluation has been covered, histological sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) were viewed with a 40× objective with a trinocular microscope Nikon Eclipse (Nikon®) and 20 images scanned with a Nikon micro-Camera DS-Ri2 (Tokyo, Japan). For image analysis, the freeware ImageJ v1.33 and the counter plug-in downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) were used. Lymphocytes and plasma cells located in the intra-tumoral region and stromal-tumoral region were manually counted in each of the 20 images obtained from each patient. Each image taken was 4908x3264 pixels (365.18 µm x 242.86 µm). Considering the intra-tumoral (iTIL) and stromal region (sTIL), separately, the number of iTIL cells and sTIL cells per patient was obtained through the sum of each area considering the twenty images. In addition, the sum of the iTIL and sTIL was performed per patient, characterizing the tTIL. These analyses were achieved by a researcher blinded to the groups examined. Eosinophils were identified in the histological sections stained with H&E. Cells that showed bright-red granules within its cytoplasm and a nucleus with one or two lobes were considered. Eosinophils were counted in 20 high-power fields (HPF),

like to that described above for the counting TILs. Data were analyzed with the aid of GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, United States). Initially, the parametric or non-parametric nature of the data was evaluated. According to the Kolmogorov-Smirnov test, experimental data were not normally distributed. Then, the Mann-Whitney test was used to compare tumor-infiltrating lymphocytes (iTIL, sTIL, and tTILs) between both patient groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) and sequencing libraries preparation

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to isolate Cervical cancer stem-like cells (CCSCs) and cervical cancer non-stem-like cells (CCNSCs) from a complex mixture of tumor cells based on their light scatter and fluorescent staining profile. Selected cells were processed with the SMART-Seq v4 Ultra-low Input RNA Sequencing Kit (Takara Bio USA, CA) according to the manufacturer's instructions for the cDNA synthesis. To RNA sequencing library preparation, the Nextera[®] XT Library Prep Kit (Illumina[™]) with Nextera[®] XT Index Kit V2 Set A (Illumina[™]) was used according to the manufacturer's instructions. These processes were described previously by our group [9].

Transcriptome analysis

The quality control of the sequences was analyzed using FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Sequence reads were quality and adapter trimmed (low-quality reads - Phred score ≤ 25) using Cutadapt (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>). After being trimmed, the sequences were analyzed again with FastQC to confirm the quality of the remaining sequences (Supplementary Table 1). The sequence reads remained were mapped and aligned to the human genome (*Homo sapiens* GRCh38) using STAR software (https://physiology.med.cornell.edu/faculty/skrabaneck/lab/angsd/lecture_notes/STARmanual.pdf). Given a reference human genome - GRCh38 and GTF file, the alignment parameters “outFilterMultimapNmax 1” and “quantMode GeneCounts” were included to generate reads uniquely mapped and to count the number of reads mapped to each specific gene.

Differential expression genes analysis

Tables including the counts of reads uniquely mapped to a specific locus for each patient obtained with STAR were read in R statistical software (GitHub-alexdobin/STAR: RNA-seq aligner). The read counts were filtered with HTSFilter Bioconductor package (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/HTSFilter.html>) and then normalized with DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2>). The Differentially Expressed Genes (DEGs) analysis was performed using DESeq2. Then, all DEGs were plotted in heatmaps using the Pheatmap package from R

(<https://www.rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12/topics/pheatmap>).

Only DEGs with $\log_2FC > 1$ or < -1 and $padj$ value < 0.05 were considered.

Selection of the potential biomarkers

Clusterprofiler R package
(<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler>) was used to obtain GO biological process (BP) terms and to get clusters interactions between them considering the genes that passed to HTSFilter as a background list and the DEGs as a target list. Only GO enrichment terms with $padj$ value < 0.05 were considered relevant. Then, terms related to apoptotic processes were selected for statistical analysis, as well as DEGs responsible directly or indirectly to apoptosis according to literature. For this, the mean for each DEG was obtained separately for each group of the R and NR patients, and then, it was estimated the ratio among the major and minor values between them. Only DEGs with this ratio among the normalized means ≥ 3.0 were considered statistically significant.

Considering the same DEGs related to apoptosis as attributes, decision trees analysis was performed using the WEKA software (Waikato Environment for Knowledge Analysis, version 3.6.11, University of Waikato, New Zealand). In order to classify, 31 records, being 21 representing R patients (67,74%) and 10 NR (32,26%), were measured using the full dataset (FULL) in the development and training of classifier algorithms. Leave-one-out cross validation (LOOCV) was applied to estimate the classification accuracy and to test the generalizability of the model.

DEGs found in Statistical and Decision tree analyses were prospected as being potential biomarkers of the chemoradiotherapy resistance in CC. Thus, each one of these DEGs were evaluated by comparing R to NR patients and their clinical data. To evaluate the impact of these potential biomarkers on overall survival (OS), the expression pattern and the survival event of each patient were correlated using the univariate Cox model. For this, we use R packages survival (<https://cran.r-project.org/web/packages/survival/>) and coxphf (<https://cran.r-project.org/web/packages/coxphf/>). An additional Kaplan-Meier plot was performed using SPSS software version 20 (IBM, USA). The Forest plot was

generated using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA). Only results with a p-value < 0.05 and $HR \neq 1$ were considered statistically relevant.

RESULTS

Histopathological description

In all of 31 patients with CC, only one of them was diagnosed with Adenocarcinoma, while all the others had Squamous cell carcinoma. As the response to chemoradiotherapy, 21 patients were considered as responders (R) and 10 as non-responders (NR). Histological grade II occurred in 61% of women, while 39% exhibited grade III. One patient had stage IIA of the FIGO classification (3%), while the others were diagnosed as stage IIB (42%) and IIIB (55%). In addition, most of them had bilateral parametrial involvement (68%), nine of them (29%) had single-sided involvement and one (3%) had free parametrial involvement (Table 1).

In the context of OS of this cohort, patients in the R group had 95% of assurance, between 96 and 33% less likely to die than NR patients, with a Hazard ratio (HR) of 0.16 (Figure 1A).

Tumor-infiltrating Lymphocyte and Tumor-associated tissue eosinophilia (TATE)

Tumor-infiltrating lymphocytes were found in both the sTIL and tumor nest (iTIL) of all 23 patients evaluated. Besides, sTILs and tTILs were more intense in NR patients, no significant differences were observed in the median numbers of TILs between the R and NR patients, regardless of whether the assessment is related to the iTIL, sTIL or when the sum of sTIL and iTIL were evaluated (Figure 1B-F). No significant differences were observed in the median numbers of TATE between the R and NR patients. (Figure 1 G-J).

DEGs in Non-Stem Cancer Cells (NSCC) populations

All results related to raw and trimmed read counts of RNA-Seq were registered (Supplementary Table 1). In differential expression gene analysis, a total of 2519 DEGs were found comparing R to NR patients (Figure 2A). Thus, among all DEGs, there were 1598 (~63.44%) protein-coding genes, 413 (~16.39%) of lncRNAs, 371 (~14.73%) pseudogenes, and 137 (~5.44%) other RNAs (Figure 2B). Most of the protein-coding genes were upregulated while lncRNAs, pseudogenes and other RNAs were downregulated.

GO and networks analysis

In enrich GO analysis for 56875 filtered genes as a background list and 2519 DEGs as a target list, 570 GO terms with p.adjusted value < 0.05 were found (Supplementary Table

2) and 25 of those were related to apoptosis having 110 DEGs linked to them (Figure 2C, Supplementary Table 3).

Selection of the potential biomarkers

To refine the number of robust biomarkers with potential clinical utility, we considered the 110 DEGs related to 25 GO apoptotic terms found and 7 DEGs belonging to families related to apoptosis according to the literature [10,11], for statistical evaluation. Only 6 DEGs had a ratio among normalized means $\geq 3,0$ (Figure 3A). Of these, the *PNMA3*, *RASSF2*, and *YWHAG* had means of 4.676, 5.763, and 3.312 times greater in R than in NR respectively, while otherwise the *GSTP1*, *HSPB1*, and *CLU* had means 5.225, 5.289, and 3.259 times greater in R than in NR.

Besides that, among 117 DEGs responsible for apoptotic processes, only *ATF4* and *IFT57* were found relevant in decision trees analysis. These genes were strongly able to define R from NR patients. Using these two genes the algorithm hit 30/31 possibilities (96.77%) using the full dataset (Full Training). When, the dataset was evaluated with the LOOCV validation method, the algorithm was able to correctly classify 22/31 hits (70.97% accuracy - Figure 3B). A new decision tree was built considering the 6 DEGs previously found in statistical analysis and the 2 additional DEGs obtained in a first decision tree analysis. As a result, the LOOCV improved the method accuracy to 80.64% (25/31). Finally, the HR values for these 8 DEGs demonstrate a positive effect to *ATF4* on patient survival when it's upregulated. On the other hand, *CLU*, *IFT57*, *RASSF2*, and *PNMA3* when upregulated increase the risk of patient death. *HSPB1*, *GSTP1*, and *YWHAG* shown a little effect about overall survival of patients (Figure 3C and Supplementary Figure 2). Additionally, we focused on a set of genes with the highest potential for classifying R vs. NR patients using a combination of statistical and decision tree analyses. The 8-gene signature selected, *PNMA3*, *RASSF2*, *CLU*, *IFT57*, *YWHAG*, *HSPB1*, *GSTP1* and *ATF4*, clearly separated the R and NR patients in a cluster analysis (Figure 4). The *PNMA3* and *RASSF2* genes were found highly upregulated in 5 and 4 NR patients, respectively, while they were downregulated in almost all R patients, except in 2 patients when considered the *PNMA3*. Besides that, the other 6 DEGs were primarily upregulated in R group and downregulated in NR (Figure 4).

Concomitantly, an interaction between 5 of these DEGs (*CLU*, *YWHAG*, *HSPB1*, *GSTP1*, and *ATF4*) and the 10 GO terms related to apoptosis with the lower padj values were shown to have log2FoldChange values $> 2,0$ comparing R to NR patients (Figure 5). Also, the *CLU*, *YWHAG*, *HSPB1*, *GSTP1*, and *ATF4* genes were related to 6, 4, 5, 2, and 1 of

these 10 GO terms, respectively (Figure 5, Supplementary Table 3). The *CLU* and *HSPB1* were associated with the negative regulation of the intrinsic apoptotic pathway and the *GSTP1* gene was linked to the negative regulation of apoptosis, but not exclusively to the intrinsic or extrinsic pathway. Finally, the *YWHAG* was associated to the positive regulation of mitochondrial permeability involved in apoptosis and, the *ATF4* to the intrinsic apoptotic signaling. Besides that, as observed in Figure 4, indicated by group I (R patients), the DEGs EGs *CLU*, *IFT57*, *YWHAG*, *HSPB1*, *GSTP1*, and *ATF4* showed upregulated, while in a group II (R patients) and III (NR patients) were downregulated. Meanwhile, in NR patients represented by the group III, just *PNMA3* and *RASSF2* were upregulated.

Discussion

The annual number of new cases and deaths of CC between 2018 and 2030 probably to increase in 22.80% and 28.62%, respectively according to World Health Organization (WHO). Besides the mortality rate rises more than the incidence rate. Thus, a strategy named 90-70-90 involving the vaccination against HPV, screening and treatment of women around of the world with the suspect and confirmed CC, aim to eradication this malignancy in 2120 [12]. For this purpose, among the better strategies for the success in CC eradication are the several approaches of the RNA sequencing, being the DEGs analysis one of the most used to potential biomarkers discovery for the new diagnosis and treatment of many cancers, including CC [13,14]. A total of 2519 DEGs were found between the R and NR patients, characterized by coding, pseudogenes, long and small non-coding transcripts (Figure 2B). Interestingly, most of the coding DEGs showed upregulated in our cohort when comparing R to NR patients.

Gene Ontology analysis revealed enrichment of biological processes GO terms, where pathways of cellular proliferation, EMT, and apoptosis were found (Supplementary Table 2). This is consistent with previous studies that suggest regulatory gene networks are related to cancer development, patient's prognosis, therapeutic response, and other clinical implications [15]. The DEGs involved with apoptosis were chosen for biomarkers selection in our study, because its induction is a critical event in the chemotherapy efficiency in cancer, as observed in ovarian cancer cells treated with AT-101/cisplatin and also in CC cells exposed to cisplatin or treated with platinum compounds together with irradiation [16,17]. Between these DEGs, the *PNMA* family genes encode proteins that interact with pro-survival factors like the BLC-2 members, as well as with the pro-apoptotic factors that included *RASSF* and *BAX* families [18]. Thus, some of these genes

are pro-apoptotic such as *PNMA5* in interactions with *PNMA4 (MOAPI)*, which increased chemosensitivity in CC and breast cancer cell lines such as Hela and MCF-7, respectively [19]. While, others members may be anti-apoptotic factors such as *PNMA2*, which induced chemoresistance in MCF-7 cells antagonizing the actions of *PNMA1-MOAPI* [20].

In our data, the normalized mean of expression for *PNMA3* and *RASSF2* were 4.7 and 5.8 times greater in NR than in R patients, respectively (Figure 3A), as well as were upregulated in most NR patients (Figure 4). This DEGs profile might suggest a chemoradiotherapy resistance in CC, due to a potential antagonism of *RASSF2* by *PNMA3* similar to demonstrated for *PNMA2* in MCF-7 cells [20]. Thus, the simultaneous upregulation of *PNMA3* and *RASSF2* in PCU63 and PCU121 both NR CC patients (Figure 4), could be related to the bad prognosis of these patients, such as tumor recurrence and distal metastasis in the lungs (Supplementary Table 4). Although, these interactions are possible, they still need to be better evaluated in patients with CC [18-20], because there were other NR patients, which had upregulation only of *PNMA3* or *RASSF2*. We can speculate if it could be responsible for chemoradiotherapy resistance in NR patients, as PCU104, PCU097, and PCU103, due to interactions between *PNMA3* and pro-survival molecules, like the BCL-2 proteins [21]. Finally, a relevant overexpression of *PNMA3* was observed in only one R patient (PCU106), which was diagnosed with Adenocarcinoma, corroborating with data showing that this gene role in other adenocarcinoma development, prolactinomas [22].

In our data, the normalized means of the *CLU*, *GSTP1*, and *HSPB1* genes were ≥ 3.0 and the log2FoldChange values were ≥ 4.5 when compared R to NR patients (Figure 4A, Supplementary Table 4). However, all of these genes were involved with the negative regulation of apoptosis accordingly to our results of GO analysis (Figure 5 and Supplementary Table 3) and literature [23–25]. Even though, genes as *CLU* have mechanisms both pro-apoptotic and anti-apoptotic depending on cellular conditions [26]. Thus, a clear upregulation of these DEGs in a cluster of R patients but not in other women (Figure 4) is potentially related to the dual role of *CLU* and also probably of *GSTP1* and *HSPB1*, linked to a balance between pro-apoptotic and pro-survival molecules and to cancer heterogeneity. Furthermore, is the first time that these gene are observed together in the CC, needing more studies to confirm your roles according to cellular conditions and considering the clinical data of patients. Additionally, the *ATF4* and *IFT57* genes were included in our analyses due they showed significant FULL Training (96.77%, 30/31) and

LOOCV (70.96%, 22/31) values in decision tree analysis which highlight their importance to segregating R and NR CC patients. The ATF4 was related to GO:0097193: “intrinsic apoptotic signaling pathway” and GO:0043525: “positive regulation of neuron apoptotic process” terms, as well as was upregulated in 6 R and downregulated in 3 NR patients (Figure 4). In KB-3-1 CC lineages treated with soloxolone methyl (SM), this gene was linked to apoptosis activation via CHOP (DDIT3), to responses to endoplasmatic reticulum (ER) stress and transcription of many genes [27]. This result could point out the chemoradiotherapy sensitivity observed in R CC patients.

Lastly, the *IFT57* was related to GO:0043281: “regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process” term in our GO analysis and was upregulated in R patients with log2FoldChange of 3.07. In non-small cell lung cancer (NSCLC), the low expression of *IFT57* mRNA was correlated to the short time of OS and their interactions with the *KIF3A* promote proliferation of NCI-H520 cell lines and reduce apoptosis [28]. Thus, these results corroborate with the *IFT57* gene overexpressed could related to chemoradiotherapy susceptibility in CC.

This heterogeneity role of apoptosis genes could be influenced by Tumor associated-microenvironment (TME). TME is a determining factor that drives malignant tumors progression. Therefore, critical components of the TME, such as tumor-infiltrating lymphocyte (TILs), tumor-associated macrophages as well as tumor-associated tissue eosinophilia (TATE), can be used as biomarkers of tumor evolution. The presence of an inflammatory infiltrate at the tumor site reflects a dynamic interaction between patient immune system and TME and could explain differences in patient therapy response. In order to assess this, the TILs were evaluated in two different regions of CC and no statistical difference in the total TILs amount between R and NR groups was observed. However, a slightly higher number of iTILs in R patients was found when compared to NR patients, while for the NR patients, a higher infiltrate was found in the stromal region. Then, we suggest that before the treatment began, the R patients appear to display an immunologically active inflammatory TME as compared to the NR patients, according to a previous study by our group. In which, we determined the cellular composition and immune status of the CC lesions by IHC. A higher number of CD8+ and PD-L2+ TILs, as well as the higher intensity of PD-L1 immunoreactive area were detected, and associated with PD-L2+ TILs expression [29]. In several types of malignant tumors, such

as melanoma and breast cancer, TILs evaluation has been used as a prognostic and predictive tool [30]. However, clinical-pathological studies in cancer have indicated that the presence of TILs is not equally manifested among different tumor subtypes. Besides that, to gain insights into possible immunosuppressive or activated TME in the R and NR CC groups, TATE count was performed. Akuthota, P. *et al.* (2010) [31] demonstrated the eosinophil function as professional antigen presenting cells (APCs) – express MHC II and costimulatory proteins (CD80, CD86, and CD40) for antigen presentation and are able to home to draining lymph node. Furthermore, eosinophils have the ability to stimulate both previously primed and naïve T cells. Recently, their role in neoplasms has been investigated [32]. Although the exact function of TATE on cancer treatment is not fully elucidated, poor prognosis in Hodgkin’s lymphoma has been identified, contrary to what is observed in head and neck, bladder [33] colon and prostate cancers [34]. Despite no statistical difference between the R and NR patients was found, a higher tendency for TATE was identified in the patients who responded to the treatment.

In conclusion, many discovery approaches for CC screening biomarkers are currently underway but the establishment of new biomarkers still lacks more in-depth molecular studies. The strength of this study was brought new insight into eight distinguishing genes as putative biomarkers of clinical utility. Our results showed 2 DEGs (*PNMA3* and *RASSF2*) clearly upregulated in NR patients in contrast with either a trend of downregulation for all of them (*PNMA3*, *RASSF2*, *CLU*, *IFT57*, *YWHAG*, *HSPB1*, *GSTP1*, and *ATF4*) or upregulation of 6 DEGs in R patients, except *PNMA3* and *RASSF2* genes. Furthermore, a raised number of iTILs and TATE in the R group before chemoradiotherapy could become the TME more immunologically active and responsible for therapy susceptibility in CC. Further studies are needed to validated these data in a large cohort of CC patients to better understand the dynamics of TILs, TATE, and these DEGs role in CC to develop a more accurate signature to treatment response.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare.

AUTHOR CONTRIBUTION

*¹ Formal analyses: Bioinformatics analyses. Investigation: histopathological analyses. Other contributions were equally performed.

*² Investigation: Clinical analyses. Other contributions were equally performed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Pronon (Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica) for all funding provided to the study (Pronon – Grant number: NUP:25000.159953/2014-18 and NUP:25000.079266/2015-09).

REFERENCES

1. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. 2022.
2. LaVigne AW, Triedman SA, Randall TC, Trimble EL, Viswanathan AN. Cervical cancer in low and middle income countries: Addressing barriers to radiotherapy delivery. *GynecologicOncologyReports*.2017;22:16–20.
<https://doi.org/10.1016/j.gore.2017.08.004>
3. Beddoe AM. Elimination of cervical cancer: challenges for developing countries. *ecancermedicalscience*. 2019;13.
<https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.975>
4. Bispo S, Farias TDJ, de Araujo-Souza PS, Cintra R, Santos HG dos, Jorge NAN, et al. Dysregulation of Transcription Factor Networks Unveils Different Pathways in Human Papillomavirus 16-Positive Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. *Frontiers in Oncology*. 2021;11.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626187>
5. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2021*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2021. 2021.
6. He B, Chen W, Liu L, Hou Z, Zhu H, Cheng H, et al. Prediction Models for Prognosis of Cervical Cancer: Systematic Review and Critical Appraisal. *Frontiers in Public Health*. 2021;9.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.654454>
7. Zhu X, Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;1885.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S106412>
8. Hougardy BM, Maduro JH, van der Zee AG, Willemsse PH, de Jong S, de Vries EG. Clinical potential of inhibitors of survival pathways and activators of apoptotic pathways in treatment of cervical cancer: changing the apoptotic balance. *The Lancet Oncology*. 2005;6:589–98.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70281-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70281-3)
9. Zuccherato LW, Machado CMT, Magalhães WCS, Martins PR, Campos LS, Braga LC, et al. Cervical Cancer Stem-Like Cell Transcriptome Profiles Predict Response to

Chemoradiotherapy. *Frontiers in Oncology*. 2021;11.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.639339>

10. Stevens M, Oltean S. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. *Frontiers in Genetics*. 2019;10.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00804>

11. Law J, Yu VC, Baksh S. Modulator of Apoptosis 1: A Highly Regulated RASSF1A-Interacting BH3-Like Protein. *Molecular Biology International*. 2012;2012:1–10.

<https://doi.org/10.1155/2012/536802>

12. World Health Organization. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. 2020.

13. Hong M, Tao S, Zhang L, Diao L-T, Huang X, Huang S, et al. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13:166.

<https://doi.org/10.1186/s13045-020-01005-x>

14. Wang Y, Mashock M, Tong Z, Mu X, Chen H, Zhou X, et al. Changing Technologies of RNA Sequencing and Their Applications in Clinical Oncology. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00447>

15. Rojas-Puentes L, Cardona AF, Carranza H, Vargas C, Jaramillo LF, Zea D, et al. Epithelial–mesenchymal transition, proliferation, and angiogenesis in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy. *Cancer Medicine*. 2016;5:1989–99.

<https://doi.org/10.1002/cam4.751>

16. Karaca B, Atmaca H, Bozkurt E, Kisim A, Uzunoglu S, Karabulut B, et al. Combination of AT-101/cisplatin overcomes chemoresistance by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. *Molecular Biology Reports*. 2013;40:3925–33.

<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2469-z>

17. Riku Koivusalo EKPRHH and SH. Chemoradiation of Cervical Cancer Cells. *Cancer Res* . 2002;62.

18. Veerasamy T, Eugin Simon S, Tan KO. Emerging strategies for sensitization of therapy resistant tumors toward cancer therapeutics by targeting the Bcl-2 family, TGF- β , Wnt/ β -Catenin, RASSF and miRNA regulated signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2021;137:106016.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106016>

19. Lee YH, Pang SW, Poh CL, Tan KO. Distinct functional domains of PNMA5 mediate protein–protein interaction, nuclear localization, and apoptosis signaling in human cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*.

- 2016;142:1967–77. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2205-5>
20. Lee YH, Pang SW, Tan KO. PNMA2 mediates heterodimeric interactions and antagonizes chemo-sensitizing activities mediated by members of PNMA family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;473:224–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.083>
21. Pang SW, Lahiri C, Poh CL, Tan KO. PNMA family: Protein interaction network and cell signalling pathways implicated in cancer and apoptosis. *Cellular Signalling*. 2018;45:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.01.022>
22. Vikrant Ghatnatti BVSPCVIK. Identification of potential and novel target genes in pituitary prolactinoma by bioinformatics analysis. *bioRxiv*. 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.423732>
23. Watari H, Kinoshita R, Han Y, Wang L, Hosaka M, Taguchi H, et al. Prognostic Significance of Clusterin Expression in Advanced-Stage Cervical Cancer Treated With Curative Intended Radiotherapy. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2012;22:465–70. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31821a03d9>
24. Checa-Rojas A, Delgadillo-Silva LF, Velasco-Herrera M del C, Andrade-Domínguez A, Gil J, Santillán O, et al. GSTM3 and GSTP1: novel players driving tumor progression in cervical cancer. *Oncotarget*. 2018;9:21696–714. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24796>
25. Alvarez-Olmedo DG, Biaggio VS, Koumbadinga GA, Gómez NN, Shi C, Ciocca DR, et al. Recombinant heat shock protein 27 (HSP27/HSPB1) protects against cadmium-induced oxidative stress and toxicity in human cervical cancer cells. *Cell Stress and Chaperones*. 2017;22:357–69. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0768-y>
26. Chaiwatanasirikul K-A, Sala A. The tumour-suppressive function of CLU is explained by its localisation and interaction with HSP60. *Cell Death & Disease*. 2011;2:e219–e219. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.99>
27. Markov A v., Kel AE, Salomatina O v., Salakhutdinov NF, Zenkova MA, Logashenko EB. Deep insights into the response of human cervical carcinoma cells to a new cyano enone-bearing triterpenoid soloxolone methyl: a transcriptome analysis. *Oncotarget*. 2019;10:5267–97. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27085>
28. Yang Y, Liu X, Li R, Zhang M, Wang H, Qu Y. Kinesin family member 3A inhibits the carcinogenesis of non-small cell lung cancer and prolongs survival. *Oncology*

Letters. 2020;20:1–1.

<https://doi.org/10.3892/ol.2020.12034>

29. Martins PR, Machado CMT, Coxir SA, de Oliveira AJ, Moreira TB, Campos LS, et al. Cervical cancer patients that respond to chemoradiation therapy display an intense tumor infiltrating immune profile before treatment. *Experimental and Molecular Pathology*. 2019;111:104314.

<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.104314>

30. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;52:16–25.

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.003>

31. Akuthota P, Wang H, Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 2010;10:14–9. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328334f693>

32. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012;61:1527–34.

<https://doi.org/10.1007/s00262-012-1288-3>

33. Carretero R, Sektioglu IM, Garbi N, Salgado OC, Beckhove P, Hämmerling GJ. Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8+ T cells. *Nature Immunology*. 2015;16:609–17.

<https://doi.org/10.1038/ni.3159>

34. Chouliaras K, Tokumaru Y, Asaoka M, Oshi M, Attwood KM, Yoshida K, et al. Prevalence and clinical relevance of tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) in breast cancer. *Surgery*. 2021;169:1234–9. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2020.07.052>

All Regular Tables and Figures

S1 (Supplementary Figure 1) – 31 histopathological sections were obtained from the 31 patients, one histopathological section per woman with cervical cancer. Of these, 23 histopathological sections were included, while 8 were excluded because had tumor zones with necrosis, fibrosis, crush artefacts and little epithelial tissue, all of these are exclusion criteria for the TILs and TATEs analyses. Considering the 23 histopathological sections included, 11 presented characteristics of Squamous cell carcinoma of moderately differentiated (GII) and 12 of Squamous cell carcinoma of poorly differentiated (GIII).

S2 (Supplementary Table 1) – Read counts before and after trimming with cutadapt were showed as Rawcounts and fastqc cutadapt counts respectively. The rawcounts and trimmed counts were obtained in fastqc analysis. To confirm the counting of trimmed counts obtained in fastqc, the bash command line “grep” was used. The percent of remanescent counts after trimming was > 98%.

Table 1 – Clinical characteristics of the 31 cervical cancer patients. 30 patients were diagnosed with Squamous cell carcinoma and 1 had adenocarcinoma. 19 of these presented histological grade II and 12 showed grade III. Considering the FIGO classification, 17 had IIIB, 13 IIB and only one IIA. The bilateral parametrial involvement was observed in 21 women, while 9 and 1 had unilateral and free parametrial involvement respectively. The vaginal involvement was found in 27 patients, while 2 were classified as not applicable and 2 were absent. 30 patients were treated with cisplatin and 1 with carboplatin. After 8 months of treatment, 19 patients were considered Responders (R), 11 were Non-Responder (NR) and 1 Not applicable. Finally, 18 women don't demonstrated metastasis signals, but 9 of these had metastasis in different locations, while 4 were not applicable.

Figure 1. Clinical pathological features: **A)** Kaplan-Meier survival curves showing higher percentage survival in Responder (R) patients with cervical cancer. Log-rank test (Chi square 12.19, $p < 0.0005$). Hazard ratio 0.16 (95%, CI 0,03855 to 0,6701). **B)** TILs from non-responder (NR) patients. A few iTILs in intra- tumoral region were observed while numerous lymphocytes are present in stromal-tissue adjacent to cancer cell nests. **C)** TILs from R-patients. A higher number of TILs are observed in the intra-tumor region of R-

patients when compared to NRs (although this difference is not statistically significant). A few lymphocytes are present in stromal-tissue adjacent to cancer cell nests. The black dotted line indicates the boundary between the intra-tumoral and stromal regions of the tumor. iTILs and sTILs were observed (o - yellow circles). (Pathological specimens - hematoxylin-eosin, 40x objective and 10 x ocular; scale bar: 50µm). **D-**

F) The graph above shows the TILs count per high-power field (HPF) in 20 HFP. Data are medians, interquartile ranges (25th-75th percentile) and mean (+). Mann-Whitney test of morphometric analysis data of iTILs, sTILs and tTILs, respectively, of NR and R patients. No difference (ns) between both groups was observed considering $p < 0.05$. NR (n= 07), R (n= 16). iTILs and sTILs means intra-tumoral and stromal infiltrating lymphocytes. **G e H)** Pathological specimens of PCU005 and PCU108 patients, respectively (hematoxylin-eosin, 40x objective and 10 x ocular; scale bar: 10µm). **G)** Observe intense stromal TATE (yellow star) adjacent to cancer cells nest (black asterisk). **H)** Observe numerous eosinophils (black star) infiltrated into the tumor nests (black asterisk). **I)** The image shows round shaped eosinophils with their typical large-specific red-bright granules within cytoplasm and with a bi-lobed nuclei (eventually monolobed nuclei) (black arrow). **J)** TATE count per high-power field (HPF) in 20 HFP in responders and non-responders. Bars represent median (25th-75th percentile), and comparisons between both groups were done with Mann-Whitney U test. No difference (ns) between both groups was observed considering $p < 0.05$. Non-responder patients (n= 07), Responder-patients (n= 16).

Figure 2. Differential gene expression and GO enrichment: **A)** Heatmap representing 2519 DEGs comparing 21 R to 10 NR patients, considering $\log\text{FoldChange} > 1$ or < -1 and $\text{padj value} < 0.05$. The legend shows which patients are R (purple) and NR (orange) present in the "Treatment_status" group. In addition, the Parametrial Involvement, Histological Grade, and FIGO Stage related to each patient are represented. Up-regulated DEGs are shown in red color and down-regulated in blue. **B)** Bar Plot showing in the first bar 1598 DEGs as protein-coding, having 1434 upregulated and 164 downregulated. In the other bars are represented 35 lncRNAs upregulated and 378 downregulated; 60 pseudogenes up and 311 downregulated; 32 others RNAs up and 105 downregulated and a total of 1561 DEGs up and 958 downregulated, respectively. The upregulated DEGs are in red color and downregulated in blue according to legend. **C)** Dot plot representing 25 GO Biological Pathway terms related to apoptosis and with $p.\text{adjusted values} < 0.05$ found in enrich GO analysis.

S3 (Supplementary Table 2) – 570 GO terms related to Biological processes (BP) and having p.adjust value < 0.05 were obtained in GO analysis using ClusterProfiler R package. In the columns are represented the ID description of GO terms, the GeneRatio, BgRatio, pvalue, p.adjust value, qvalue, geneID and Count of genes respectively.

S4 (Supplementary Table 3) – 25 GO terms related to apoptosis and with p.adjust value < 0.05 were obtained in GO analysis, having 110 DEGs associated with them removing the duplicated. In the columns are represented the ID description of GO terms, the GeneRatio, BgRatio, pvalue, p.adjust value, qvalue, geneID and Count of genes respectively.

Figure 3. Main DEGs related to apoptosis and their Hazard ratio about overall survival of the patients: **A)** Means for each one of the 117 DEGs related to apoptosis considering all R patients are represented in red spheres, while means for NR patients are shown in blue squares. The ratio among R and NR means for each one of these DEGs is demonstrated in a line chart. The pink dotted line represents the cutoff value of 3,0 for the ratio among means. This is an arbitrary cutoff that was defined for choice only representative genes on the plot. **B)** ATF4 and IFT57 genes had 30/31 hits (96.77%) as FULL Training and 22/31 (70.97%) as LOOCV in the records classification considering 117 DEGs as attributes.

C) HR values for the time to survival analysis compared with the high and the low expression profile of the 8 DEGs found in statistical and decision tree analyses

S5 (Supplementary Figure 2) - Kaplan-Meier plots for the 8 choices genes: **A)** ATF4 shown a protective effect about OS when upregulated with significant difference. **B)** YWHAG shown a protective effect when upregulated, but no significance difference was observed. **C)** HSPB1 shown a protective effect when upregulated, but no significance difference was observed. **D)** GSTP1 shown a protective effect when upregulated, but no significance difference was observed. **E)** CLU shown a high risk when upregulated, but no significance difference was observed. **F)** PNMA3 shown a high risk when upregulated with significant difference. **G)** IFT57 shown a high risk when upregulated, but no significance difference was observed. **H)** RASSF2 shown a high risk when upregulated, but no significance difference was observed.

Figure 4 – Heatmap demonstrating the 8 DEGs found in statistical and decision tree analyses. All of them had $\log_2\text{FoldChange} > 1$ or < -1 and padj value < 0.05 conform DESeq2 analysis. DEGs upregulated were shown in red color, those downregulated in blue color and DEGs with constant expression in white color. Light red and light blue colors demonstrated DEGs with z-score < 1 and > -1 respectively, while intense red and blue colors DEGs with z-score > 1 or < -1 . The groups of patients were indicated by roman numerals I, II and III.

Figure 5 – Cnet plot showing DEGs related to 10 GO apoptotic terms with lower p-adjusted values. 5 DEGs highlighted in yellow are between the 8 DEGs analyzed. The intense red dots are representing DEGs highly upregulated, and the light reds dots are showing those with low upregulation. The lines stained in different colors are showing the apoptotic pathways linked to each DEG.

S6 (Supplementary Table 4) – The 8 DEGs found as relevant in statistical and decision tree analyses showed according to the $\log_2\text{foldchange} < -1$ for the PNMA3 and RASSF2 genes, and > 1 to the others 6 DEGs, comparing R to NR patients, in columns 1 and 2. The patients with high upregulation of these DEGs were demonstrated in column 3, having z-score values > 1 conform column 4. The clinical pathological parameters of these patients were showed in columns 5 to 9.

Table 1 – Clinical characteristics of the 31 cervical cancer patients in the study

Characteristics	N	%
DIAGNOSIS		
Adenocarcinoma	1	3,23
Squamous cell carcinoma	30	96,77
HISTOLOGICAL GRADE		
II	19	61,29
III	12	38,71
FIGO CLASSIFICATION		
IIA	1	3,23
IIB	13	41,93
IIIB	17	54,84
PARAMETRIAL INVOLVEMENT		
Unilateral	9	29,03
Bilateral	21	67,74
Free	1	3,23
VAGINAL INVOLVEMENT		
Present	27	87,10
Absent	2	6,45
Not applicable	2	6,45
ANTICANCER AGENT		
Cisplatin	30	96,77
Carboplatin	1	3,23
STATUS AFTER 8 MONTHS OF TREATMENT		
Responder	21	67,74
Non-Responder	10	32,26
METASTASIS		
After 8 months of treatment		
Present	9	29,03
Absent	18	58,07
Not applicable	4	12,90

Figure 1

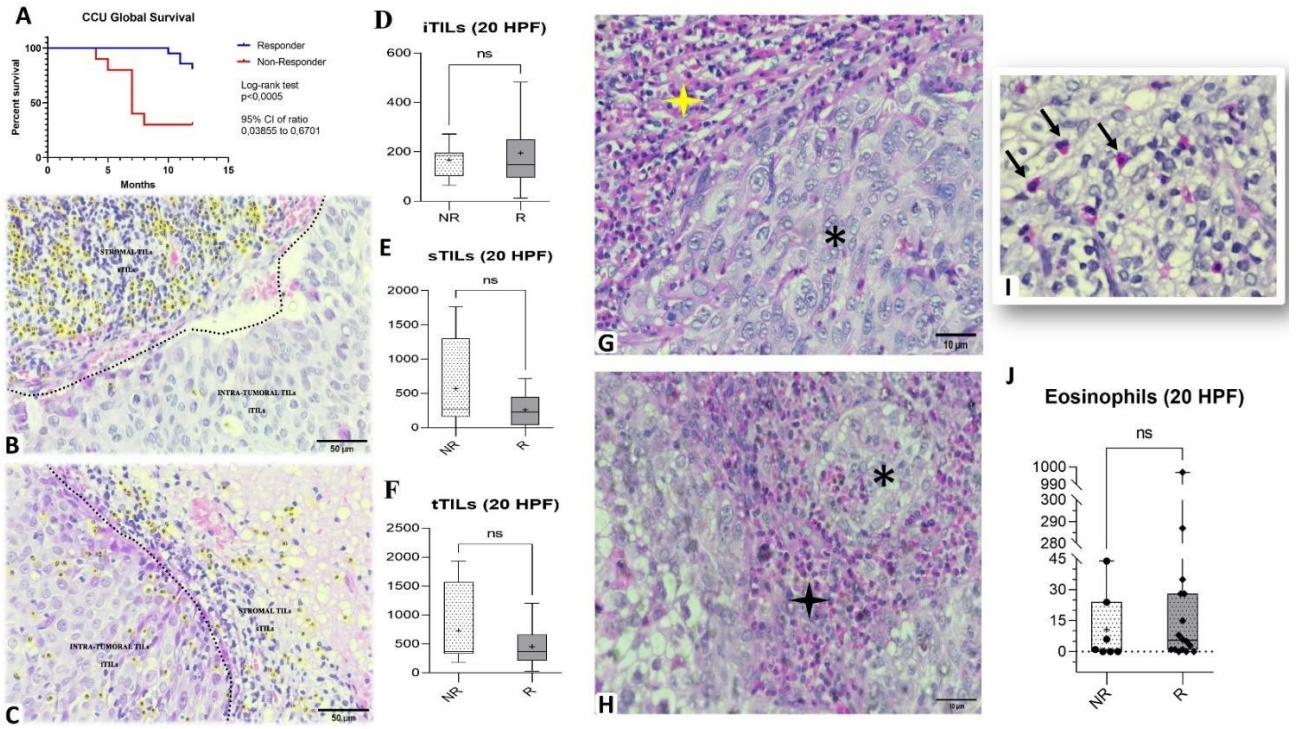


Figure 2

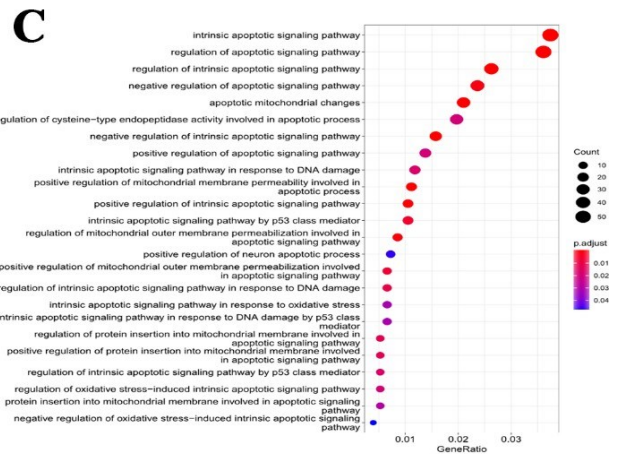
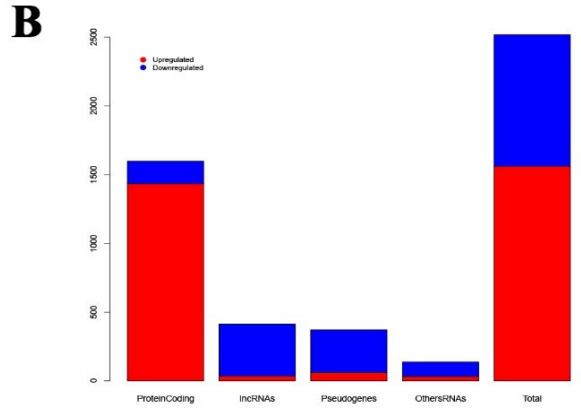
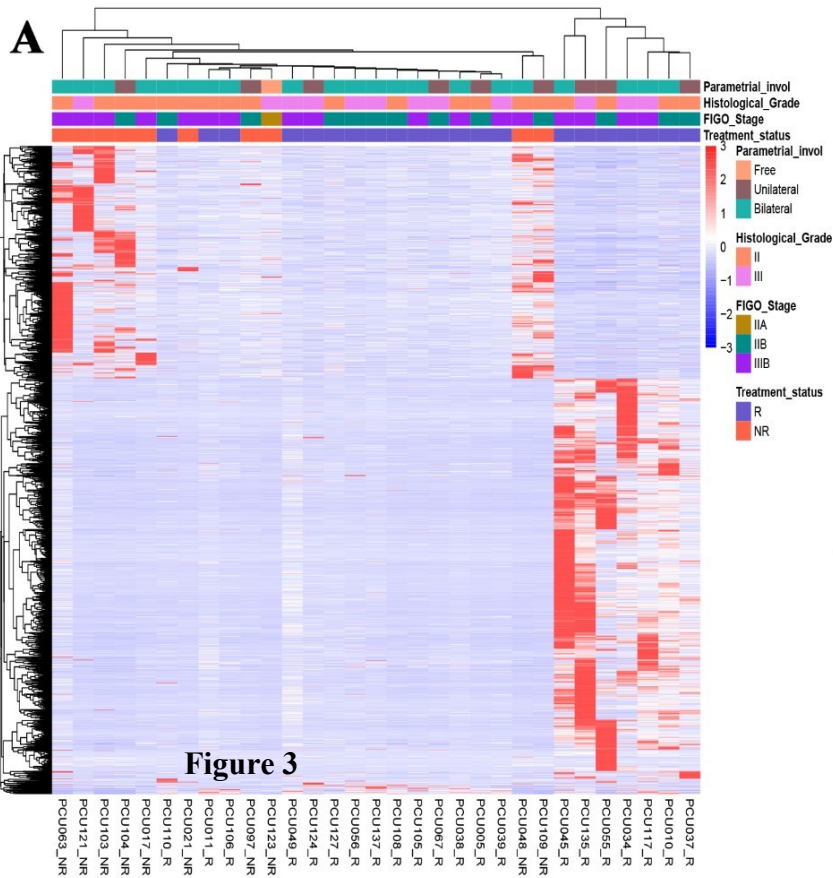


Figure 3

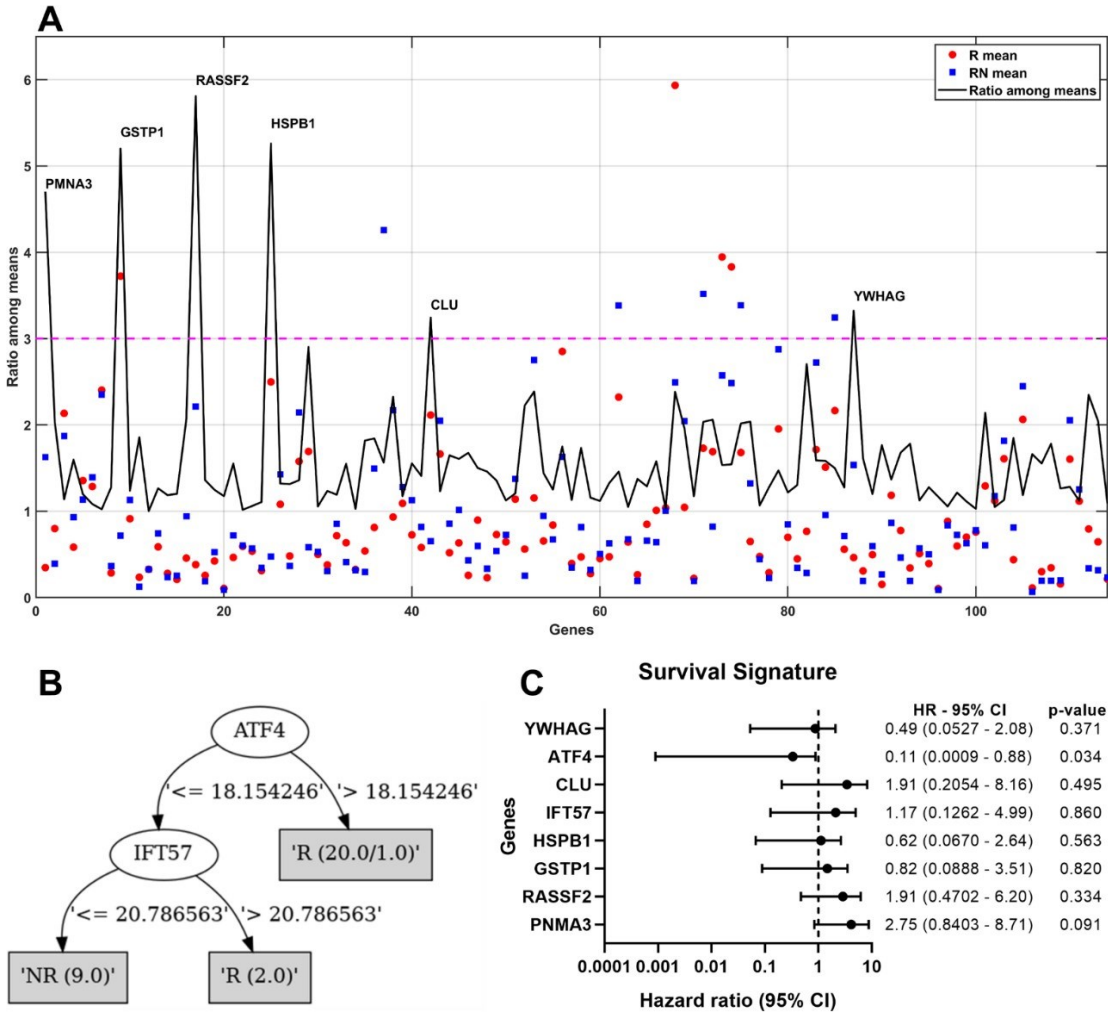


Figure 4

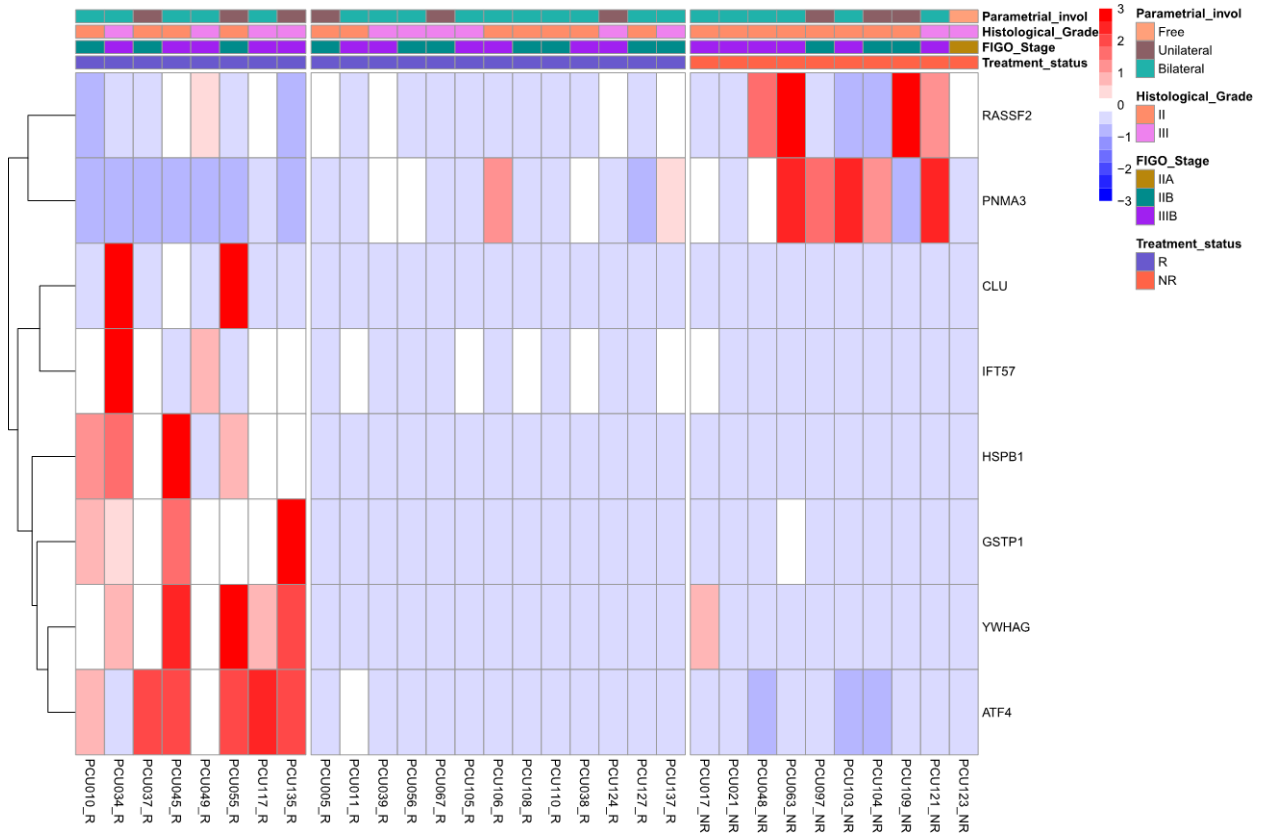
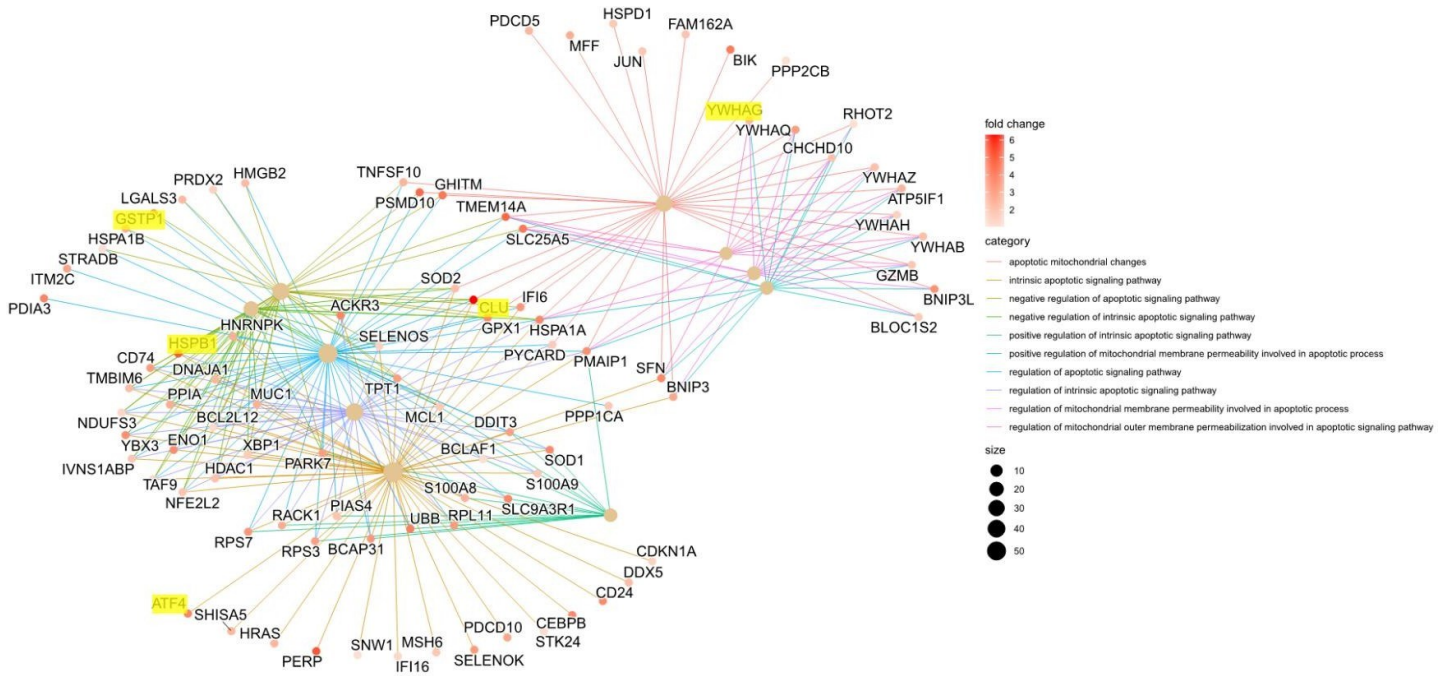


Figure 5



Supplementary Table 1 – Raw and Trimmed RNA sequences

Sample	Raw Reads	Trimmed
Rawcounts_PCU005_R	30.528.639	30.390.818
Rawcounts_PCU010_R	39.194.499	38.853.913
Rawcounts_PCU011_R	27.260.951	27.132.985
Rawcounts_PCU017_NR	31.504.000	31.207.847
Rawcounts_PCU021_NR	41.769.360	41.561.964
Rawcounts_PCU034_R	34.510.469	34.263.977
Rawcounts_PCU037_R	35.347.905	35.001.583
Rawcounts_PCU038_R	26.450.229	26.354.430
Rawcounts_PCU039_R	41.162.519	41.030.119
Rawcounts_PCU045_R	28.362.500	28.135.398
Rawcounts_PCU048_NR	49.081.668	48.384.016
Rawcounts_PCU049_R	35.473.423	35.232.826
Rawcounts_PCU055_R	33.839.908	33.578.970
Rawcounts_PCU056_R	41.287.769	40.896.864
Rawcounts_PCU063_NR	42.591.730	42.253.484
Rawcounts_PCU067_R	32.543.752	32.363.528
Rawcounts_PCU097_NR	25.362.527	25.232.204
Rawcounts_PCU103_NR	41.425.162	41.148.148
Rawcounts_PCU104_NR	30.606.326	30.340.437
Rawcounts_PCU105_R	31.218.451	31.000.624
Rawcounts_PCU106_R	38.118.530	37.927.062
Rawcounts_PCU108_R	42.550.711	42.440.101
Rawcounts_PCU109_NR	74.014.404	73.194.752
Rawcounts_PCU110_R	30.489.540	30.183.527
Rawcounts_PCU117_R	18.639.169	18.313.927
Rawcounts_PCU121_NR	50.727.132	50.458.781
Rawcounts_PCU123_NR	29.882.110	29.693.805
Rawcounts_PCU124_R	34.927.397	34.687.981
Rawcounts_PCU127_R	34.860.468	34.694.319
Rawcounts_PCU135_R	23.988.079	23.703.681
Rawcounts_PCU137_R	38.959.442	38.843.037

Supplementary Table 2 – top 10 GO terms from 570 with padj < 0.05

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
GO:0045047	protein targeting to ER	81/1524	116/18138	3,28E-46	1,82E-42	1,50E-42	RPS2/RPS21/RPL35/RPL38/RPLP0/RPL36/RPS15/RPL18/RP S8/RPL8/RPS19/TRAMI/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP 1/RN7SL1/SPCS1/RP7/RPS11/RPS25/RPL27/RPS12/RPL3/R PL11/SRP14/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS/RPL 19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL10 A/RPS14/RPS28/HSPA5/RPL9/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS 26/RPL41/SPCS2/RPL31/RPL34/RPL18A/RPL35A/SEC61B/R PS18/RPL5/RPS29/RPL23/RPL39/UBA52/RPL12/SPCS3/RPL 37A/SEC61G/RPL7/RPSA/RPL2/ZFAND2B/RPS23/SEC62/ SRP9/RPL28/RPS15A/RPS20/RPL24/SRPRB/RPL6/RPL21	81
GO:0006613	cotranslational protein targeting to membrane	77/1524	106/18138	2,06E-45	5,71E-42	4,69E-42	RPS2/RPS21/RPL35/RPL38/RPLP0/RPL36/RPS15/RPL18/RP S8/RPL8/RPS19/TRAMI/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP 1/RN7SL1/RP7/RPS11/RPS25/RPL27/RPS12/RPL3/RPL11/S RP14/RPL23A/ARL6IP1/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS5/R PL19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL 10A/RPS14/RPS28/RPL9/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS26/RP L41/RPL31/RPL34/RPL18A/RPL35A/SEC61B/RPS18/RPL5/ RPS29/RPL23/RPL39/UBA52/RPL12/RPL37A/RPL7/RPSA/R PL2/ZFAND2B/RPS23/SEC62/SRP9/RPL28/RPS15A/RPS20 /RPL24/RPL6/RPL21/SRR2	77
GO:0072599	establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	81/1524	120/18138	2,36E-45	4,36E-41	3,58E-41	RPS2/RPS21/RPL35/RPL38/RPLP0/RPL36/RPS15/RPL18/RP S8/RPL8/RPS19/TRAMI/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP 1/RN7SL1/SPCS1/RP7/RPS11/RPS25/RPL27/RPS12/RPL3/R PL11/SRP14/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS/RPL 19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL10 A/RPS14/RPS28/HSPA5/RPL9/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS 26/RPL41/SPCS2/RPL31/RPL34/RPL18A/RPL35A/SEC61B/R PS18/RPL5/RPS29/RPL23/RPL39/UBA52/RPL12/SPCS3/RPL 37A/SEC61G/RPL7/RPSA/RPL2/ZFAND2B/RPS23/SEC62/ SRP9/RPL28/RPS15A/RPS20/RPL24/SRPRB/RPL6/RPL21	81
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	74/1524	101/18138	1,37E-43	1,90E-40	1,56E-40	RPS2/RPS21/RPL35/RPL38/RPLP0/RPL36/RPS15/RPL18/RP S8/RPL8/RPS19/TRAMI/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP 1/RN7SL1/RP7/RPS11/RPS25/RPL27/RPS12/RPL3/RPL11/S RP14/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS5/RPL19/RPL 32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL10A/RPS1 4/RPS28/RPL9/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS26/RPL41/RPL3 1/RPL34/RPL18A/RPL35A/SEC61B/RPS18/RPL5/RPS29/RP L23/RPL39/UBA52/RPL12/RPL37A/RPL7/RPSA/RPL2/ZFA ND2B/RPS23/SRP9/RPL28/RPS15A/RPS20/RPL24/RPL6/RP L21	74
GO:0006402	mRNA catabolic process	140/1524	368/18138	4,70E-43	5,22E-40	4,29E-40	HSPB1/PSME1/PSMB5/PSMD10/RPS2/RPS21/LSM4/ZFP36 L1/UBB/RPL35/RPL38/PSMB3/PSMB6/HSPA8/RPLP0/HSP A1A/RPL36/RPS15/RPL18/VMI/PSMA7/RPS8/YBX1/RPL5/ YBX3/RPS19/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP1/PSMA4/ RPS7/PSMA3/RPS11/PABPC1/RPS25/RPL27/UBC/RPS12/RP L3/PSMD7/RPL11/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS 5/RPL19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/ RPL10A/RPS14/APEX1/RPS28/RPL9/PPP2CA/RPL13/ RPL13A/PSMC5/RPS27A/RPS26/PSMB1/HNRNPD/RPL41/R PL31/PSMD11/PSMD6/RPL34/PRPF18/PSMB10/RPL18A/RP L35A/DCP1A/RPS18/MAPKAPK2/HSPA1B/RPL5/RPS29/NP M1/RPL23/RPL39/UBA52/HNRNPA0/DHX9/RPL12/MAGG O/HNRNPC/PSMA1/PKPI/ZFP36L2/LSM2/RPL37A/RPL7/D DX5/LSM5/RPSA/RPL2/P/FASTK/RPS23/YWHAB/SET/BTG 2/YWHAZ/PSMD13/RPL28/PSMD14/HNRNPM/PSMC3/RPS 15A/RPS20/PSMB4/PSMB9/RBM8A/PUM1/RPL24/EIF4A3/P OLR2G/PSME2/EIF4G1/RPL6/ZC3H12A/PSMB8/KHSRNP C/BP2/RPL21/PPP2R1A/UPF3A/HNRNPU/YTHDF2/PSMC6/R NH1/PSMD5	140
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process nonsense-mediated decay	78/1524	119/18138	1,01E-40	9,35E-38	7,67E-38	RPS2/RPS21/RPL35/RPL38/RPLP0/RPL36/RPS15/RPL18/RP S8/RPL8/RPS19/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP1/RP7/ RPS11/PABPC1/RPS25/RPL27/RPS12/RPL3/RPL11/RPL23A/ RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS5/RPL19/RPL32/RPL4/RPL 29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL10A/RPS14/RPS28/RPL 9/PPP2CA/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS26/RPL41/RPL31/RP L34/RPL18A/RPL35A/DCP1A/RPS18/RPL5/RPS29/RPL23/R PL39/UBA52/RPL12/MAGOH/RPL37A/RPL7/RPSA/RPL2/ RPS18/RPS15A/RPS20/RBM8A/PUM1/RPL24/EIF4A3/EIF4 G1/RPL6/NCBP2/RPL21/PPP2R1A/UPF3A	78
GO:0070972	protein localization to endoplasmic reticulum	86/1524	148/18138	6,89E-40	5,46E-37	4,49E-37	RPS2/RPS21/GABARAPL2/RPL35/RPL38/RPLP0/RPL36/RP S15/RPL8/RPS18/RPS19/TRAMI/RPS24/RPL7A/RPS4 X/RPS13/RPLP1/RN7SL1/SPCS1/RP7/RPS11/RPS25/RPL27/RPS 25/RPL27/RPS12/RPL3/RPL11/SRP14/RPL23A/RPS6/RPL15/ RPS16/RPS27/RPS5/RPL19/RPL32/KDEL/R1/RPL4/RPL29/R PS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL10A/RPS14/RPS28/HSPA5/ RPL9/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS26/RPL41/RPL31/RPL11/ RPL34/RPL18A/RPL35A/SEC61B/RPS18/RPL5/RPS29/RPL2 3/RPL39/UBA52/RPL12/SPCS3/GPAAL/RPL37A/SEC61G/R PL7/RPSA/RPL2/ZFAND2B/RPS23/INSIG1/SEC62/SRP9/R PL28/RPS15A/RPS20/RPL24/SRPRB/RPL6/RPL21	86
GO:0006401	RNA catabolic process	141/1524	407/18138	1,27E-37	8,83E-35	7,25E-35	SLIRP/HSPB1/PSME1/PSMB5/PSMD10/RPS2/RPS21/LSM4/ ZFP36L1/UBB/RPL35/RPL38/PSMB3/PSMB6/HSPA8/RPLP0 /HSPA1A/RPL36/RPS15/RPL18/VMI/PSMA7/RPS8/YBX1/R PL5/YBX3/RPS19/RPS24/RPL7A/RPS4X/RPS13/RPLP1/PSM A4/RPS7/PSMA3/RPS11/PABPC1/RPS25/RPL27/UBC/RPS12 /RPL3/PSMD7/RPL11/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/R PS5/RPL19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/ RPL10A/RPS14/APEX1/RPS28/RPL9/PPP2CA/RPL13/RPL13 A/PSMC5/RPS27A/RPS26/PSMB1/HNRNPD/RPL41/RPL31/PSM D11/PSMD6/RPL34/PRPF18/PSMB10/RPL18A/RPL35A/DCP1A/R PS18/MAPKAPK2/HSPA1B/RPL5/RPS29/NPM1/RPL23/RPL39/ UBA52/HNRNPA0/DHX9/RPL12/MAGOH/HNRNPC/PSMA1/PKPI/ ZFP36L2/LSM2/RPL37A/RPL7/DDX5/LSM5/RPSA/RPL2/P/FASTK/ RPS23/YWHAB/SET/BTG2/YWHAZ/PSMD13/RPL28/PSMD14/HNRNPM/ PSMC3/RPS15A/RPS20/PSMB4/PSMB9/RBM8A/PUM1/RPL24/EIF4 A3/POLR2G/PSME2/EIF4G1/RPL6/ZC3H12A/PSMB8/KHSRNP C/BP2/RPL21/PPP2R1A/UPF3A/HNRNPU/YTHDF2/PSM C6/RNH1/PSMD5	141
GO:0006413	translational initiation	94/1524	188/18138	5,53E-37	3,41E-34	2,80E-34	HSPB1/RPS2/RPS21/RPL35/RPL38/ATF4/RPLP0/RPL36/RPS 15/RPL18/RPS8/RPL8/EIF6/RPS19/RPS24/RPL7A/RPS4X/RP S13/RPL1/RPS/RPS11/EIF2S2/P/ABPC1/RPS25/RPL27/RPS 12/RPL3/RPL11/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/RPS5/R PL19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL10/RPL 10A/RPS14/RPS28/RPL9/RPL13/RPL13A/RPS27A/RPS26/RP L41/RPL31/RPL34/RPL18A/RPL35A/SEC61B/RPS18/RPL5/ RPS29/NPM1/RPL23/RPL39/UBA52/RPL12/CD C123/RPL37A/RPL7/RPSA/RPL2/RPS23/EIF3A/DENR/EIF 5B/EIF3K/RPL28/TMED2/RPS15A/RPS20/PPP1CA/RPL24P /NCBP2/RPL21/YTHDF2/TMED2	94
GO:0019080	viral gene expression	92/1524	197/18138	1,15E-32	6,40E-30	5,26E-30	IFTM3/RPS2/RPS21/POLR21/POLR22/RPL35/RPL38/RPLP0 /RPL36/RPS15/RPL18/POLR22/RPS8/RPL8/RPS19/RPS24/RP L7A/RPS4X/RPS13/RPLP1/SPCS1/RP7/RPS11/RPS25/RPL2 7/RPS12/RPL3/RPL11/RPL23A/RPS6/RPL15/RPS16/RPS27/R PS5/RPL19/RPL32/RPL4/RPL29/RPS3/RPL37/RPL27A/RPL1 0/RPL10A/RPS14/RPS28/RPL9/POLR2K/RPL13/RPL13A/RP S27A/RPS26/RPL41/RPL31/RPL34/RPL18A/RPL35A/RPS18/ RPL5/RPS29/RPL23/RPL39/UBA52/DHX9/RPL12/SPCS3/RP L37A/RPL7/RPSA/RPL2/RPS23/EIF3A/HDJ2/RPL18A/RPL35A/ NR/RPL28/PSMC3/TRIM8/RPS15A/RPS20/JUN/SEC13/NUC K51/RPL24/POLR2F/POLR2G/USF2/RPL6/RPL21/UBP1/PC BP2/SNW1/TRIM11	92

Supplementary Table 3 - 25 GO terms related to apoptosis and with padj < 0.05

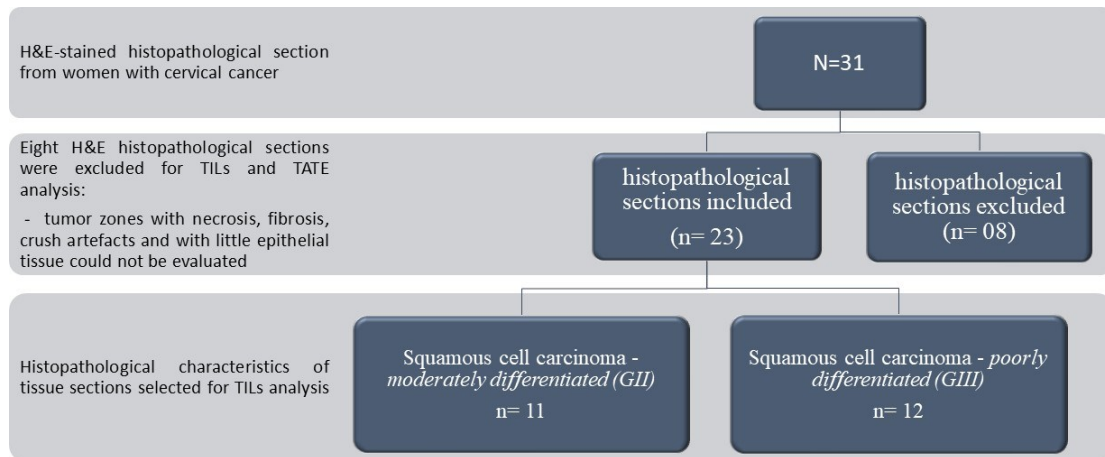
ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID
GO:2001242	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	40/1524	158/18138	1,53E-10	9.55E-09	7.84E-09	CLU/HSPB1/UBB/ACKR3/HSPA1A/SLC9A3R1/GPX1/SOD1/ENO1/YBX3/PMAIP1/RPS7/BCAP31/RPL11/CD74/PARK7/TPT1/DDIT3/RPS3/PPIA/RACK1/HNRNPK/MUC1/S100A8/DNAJA1/TMBIM6/SOD2/HDAC1/NFE2L2/PIAS4/IVNS1ABP/S100A9/MCL1/PYCARD/XBP1/SELENOS/TA9/NDUF53/BCL2L12/BCLAF1
GO:0097193	intrinsic apoptotic signaling pathway	57/1524	280/18138	2,63E-10	1.62E-08	1.33E-08	CLU/PERP/HSPB1/UBB/ATF4/ACKR3/HSPA1A/SLC9A3R1/GPX1/CEBPB/SOD1/SFN/CD24/ENO1/YBX3/PMAIP1/RPS7/IF16/BCAP31/SELENOK/RPL11/CD74/PARK7/TPT1/DDIT3/RPS3/PDCD10/BNIP3/PPIA/RACK1/HNRNPK/MUC1/S100A8/SHS5/HRAS/DNAJA1/DDX5/TMBIM6/SOD2/HDAC1/NFE2L2/PIAS4/MSH6/IVNS1ABP/S100A9/MCL1/PYCARD/XBP1/CDKN1A/SELENOS/TA9/NDUF53/IFI16/BCL2L12/STK24/BCLAF1/SNW1
GO:0008637	apoptotic mitochondrial changes	32/1524	115/18138	8,00E-10	4.67E-08	3.83E-08	CLU/TMEM14A/PSMD10/GHITM/SLC25A5/BIK/HSPA1A/GPX1/SFN/PMAIP1/BNIP3/IFI16/YWHAQ/BNIP3/MEF1/TNFSF10/PDCD5/ATP5F1/YWHAQ/SOD2/YWHAZ/YWHAZ/FAM162A/CHCHD10/GZMB/JUN/HSPD1/BLOC1S2/PYCARD/YWHAH/PPP2CB/RHOT2
GO:2001243	negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	24/1524	93/18138	4,75E-07	1.46E-05	1.19E-05	CLU/HSPB1/ACKR3/HSPA1A/GPX1/ENO1/YBX3/CD74/PARK7/TPT1/PPIA/MUC1/DNAJA1/TMBIM6/SOD2/HDAC1/NFE2L2/IVNS1ABP/MCL1/XBP1/SELENOS/TA9/NDUF53/BCL2L12
GO:2001233	regulation of apoptotic signaling pathway	55/1524	346/18138	3,11E-06	8.55E-05	7.02E-05	CLU/HSPB1/TMEM14A/GSTP1/PSMD10/GHITM/SLC25A5/UBB/PDIA3/ACKR3/HSPA1A/SLC9A3R1/GPX1/SOD1/ENO1/YBX3/PMAIP1/RPS7/IFI16/BCAP31/RPL11/CD74/PARK7/TPT1/DDIT3/RPS3/TM2C/PPIA/RACK1/HNRNPK/HSPA1B/MUC1/S100A8/TNFSF10/DNAJA1/LGALS3/HMGB2/TMBIM6/SOD2/HDAC1/NFE2L2/PIAS4/IVNS1ABP/PPP1CA/S100A9/MCL1/PYCARD/XBP1/PRDX2/SELENOS/TA9/NDUF53/BCL2L12/STRADB/BCLAF1
GO:1902110	positive regulation of mitochondrial membrane permeability involved in apoptotic process	17/1524	59/18138	4,34E-06	0.0001	9.57E-05	TMEM14A/SLC25A5/HSPA1A/SFN/PMAIP1/BNIP3/YWHAQ/BNIP3/ATP5F1/YWHAQ/YWHAZ/YWHAZ/CHCHD10/GZMB/BLOC1S2/YWHAH/RHOT2
GO:1902108	regulation of mitochondrial membrane permeability involved in apoptotic process	17/1524	64/18138	1,44E-05	0.0003	0.0002	TMEM14A/SLC25A5/HSPA1A/SFN/PMAIP1/BNIP3/YWHAQ/BNIP3/ATP5F1/YWHAQ/YWHAZ/YWHAZ/CHCHD10/GZMB/BLOC1S2/YWHAH/RHOT2
GO:2001244	positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	16/1524	60/18138	2,42E-05	0.0005	0.0004	UBB/SLC9A3R1/SOD1/PMAIP1/RPS7/BCAP31/RPL11/PARK7/DDIT3/RPS3/RACK1/S100A8/PIAS4/S100A9/MCL1/BCLAF1
GO:1901028	regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway	13/1524	45/18138	5,59E-05	0.0011	0.0009	TMEM14A/SLC25A5/HSPA1A/SFN/PMAIP1/YWHAQ/ATP5F1/YWHAQ/YWHAZ/YWHAZ/CHCHD10/GZMB/YWHAH
GO:2001234	negative regulation of apoptotic signaling pathway	36/1524	223/18138	0,0001	0.0020	0.0016	CLU/HSPB1/TMEM14A/GSTP1/PSMD10/GHITM/SLC25A5/ACKR3/HSPA1A/GPX1/ENO1/YBX3/IFI16/CD74/PARK7/TPT1/PPIA/HSPA1B/MUC1/TNFSF10/DNAJA1/LGALS3/HMGB2/TMBIM6/SOD2/HDAC1/NFE2L2/IVNS1ABP/MCL1/XBP1/PRDX2/SELENOS/TA9/NDUF53/BCL2L12/STRADB
GO:0072332	intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator	16/1524	74/18138	0,0003	0.0057	0.0047	PERP/UBB/PMAIP1/RPS7/RPL11/CD74/HNRNPK/MUC1/SHS5/DDX5/PYCARD/CDKN1A/TA9/IFI16/BCL2L12/SNW1
GO:1901030	positive regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway	10/1524	35/18138	0,0004	0.0068	0.0056	SENF/PMAIP1/YWHAQ/ATP5F1/YWHAQ/YWHAZ/YWHAZ/CHCHD10/GZMB/YWHAH
GO:1902229	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	10/1524	37/18138	0,0007	0.0101	0.0083	CLU/ACKR3/CD74/TPT1/RPS3/HNRNPK/MUC1/PIAS4/TA9/BCL2L12
GO:1900739	regulation of protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway	8/1524	26/18138	0,0009	0.0130	0.0106	SENF/PMAIP1/YWHAQ/YWHAQ/YWHAZ/YWHAZ/YWHAZ/GZMB/YWHAH
GO:1900740	positive regulation of protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway	8/1524	26/18138	0,0009	0.0130	0.0106	SENF/PMAIP1/YWHAQ/YWHAQ/YWHAZ/YWHAZ/YWHAZ/GZMB/YWHAH
GO:1902253	regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator	8/1524	27/18138	0,0012	0.0164	0.0135	UBB/RPS7/RPL11/CD74/HNRNPK/MUC1/TA9/BCL2L12

GO:0008630	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	18/1524	99/18138	0,0013	0.0175	0.0144	CLU/ACKR3/SFN/CD74/TPT1/RPS3/HNRNPK/MUC1/SHISA5/PIAS4/MSH6/MCL1/PYCARD/CDKN1A/TAF9/IFIH6/BCL2L12/SNW1
GO:1902175	regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	8/1524	28/18138	0,0016	0.0200	0.0164	HSPB1/GPX1/SOD1/PARK7/PPIA/SOD2/NFE2L2/MCL1
GO:2001235	positive regulation of apoptotic signaling pathway	21/1524	125/18138	0,0016	0.0201	0.0165	UBB/PPIA3/SLC9A3R1/SOD1/PMAIP1/RPS7/BCAP31/RPL11/PARK7/DDIT3/RPS3/TME2C/RACK1/S100A8/TNFSF10/PIAS4/PPP1CA/S100A9/MCL1/PYCARD/BCLAF1
GO:0043281	regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	30/1524	203/18138	0,0017	0.0203	0.0167	BEX3/HSPF1/GPX1/DAP/SFN/PRDX5/PMAIP1/IFIH6/BCAP31/LAMTOR5/ARLGP1/PARK7/IFT57/RPS3/MTCH1/RACK1/S100A8/TNFSF10/PDCD5/MYC/CARD16/HMGB1/FAM162A/S100A9/HSPD1/PYCARD/GSN/SOX7/DHCR24/BCL2L12
GO:0001844	protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway	8/1524	30/18138	0,0026	0.0295	0.0242	SFN/PMAIP1/YWHAQ/YWHAG/YWHAB/YWHAZ/GZMB/YWHAH
GO:0008631	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	10/1524	44/18138	0,0029	0.0323	0.0265	HSPB1/GPX1/SOD1/PARK7/PDCD10/PPIA/SOD2/NFE2L2/MCL1/STK24
GO:0042771	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	10/1524	44/18138	0,0029	0.0323	0.0265	CD74/HNRNPK/MUC1/SHISA5/PYCARD/CDKN1A/TAF9/IFIH6/BCL2L12/SNW1
GO:0043525	positive regulation of neuron apoptotic process	11/1524	54/18138	0,0046	0.0465	0.0382	PRNP/ATF4/GRN/DDIT3/NQO1/CDC34/PIN1/CDK5/JUN/MCL1/NQO2
GO:1902176	negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	6/1524	20/18138	0,0048	0.0476	0.0391	HSPB1/GPX1/PARK7/PPIA/SOD2/NFE2L2

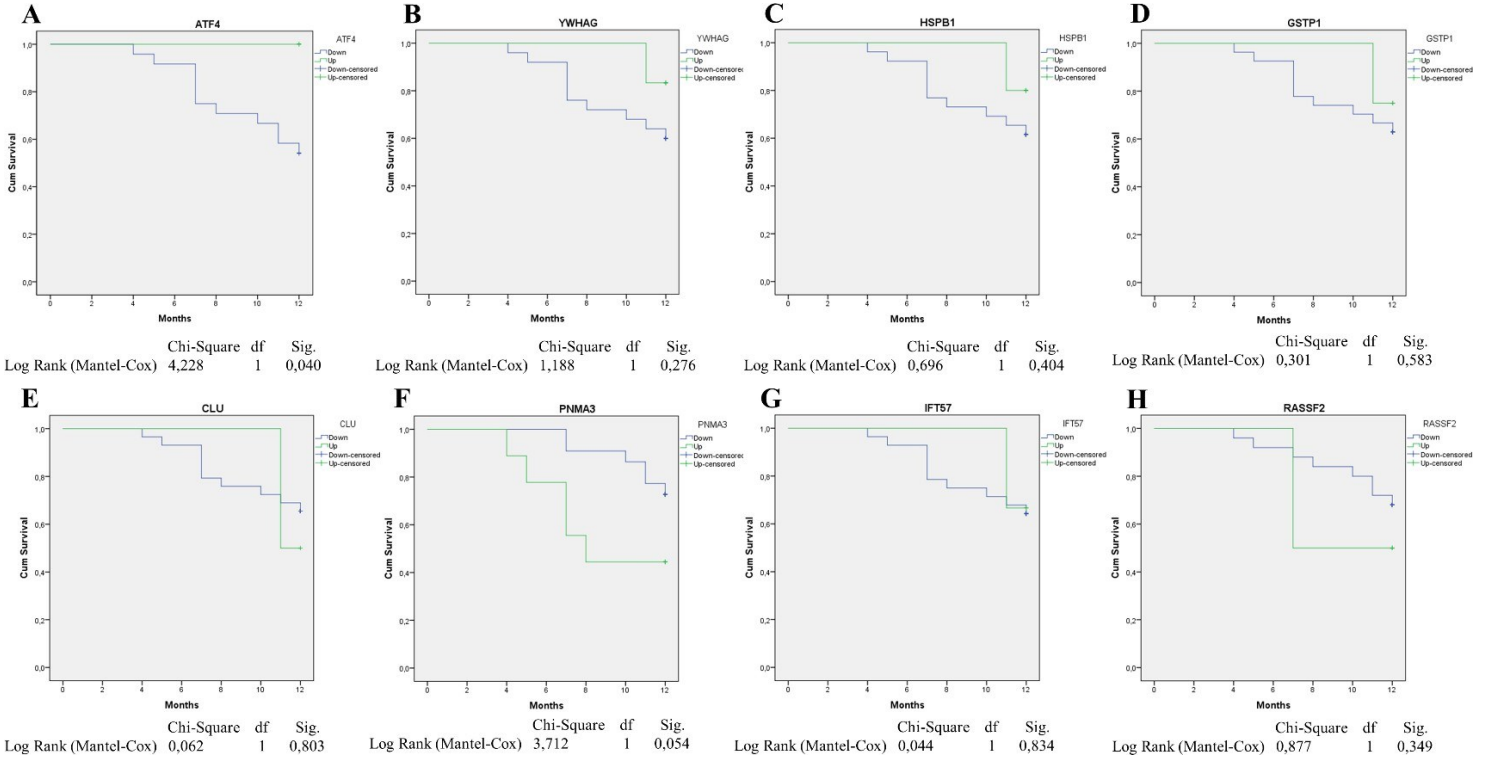
Supplementary Table 4 – Statistical and clinical parameters related to biomarkers selected

Genes	Log2FC(R/NR)	Patients	Z-score	Diagnosis	Figo_stage	Histological grade	Parametrial involvement	Metastasis
PNMA3	-1.259995	PCU097_NR	1,7064369	SCC	IIB	II	Unilateral	Invasive RPT
		PCU106_R	1,3536157	ADC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU103_NR	2,2380731	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU104_NR	1,1647350	SCC	IIB	II	Unilateral	Cervical
		PCU063_NR	2,3034447	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU121_NR	2,3567552	SCC	IIIB	III	Bilateral	Lungs
RASSF2	-1.420556	PCU048_NR	1,7560884	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU109_NR	2,8301607	SCC	IIB	II	Unilateral	Bones
		PCU063_NR	3,5762360	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU121_NR	1,1171580	SCC	IIIB	III	Bilateral	Lungs
CLU	6.266661	PCU055_R	4,1381398	SCC	IIB	II	Unilateral	NA
		PCU034_R	3,3085649	SCC	IIIB	III	Bilateral	NA
HSPB1	5.039561	PCU010_R	1,2298960	SCC	IIB	II	Bilateral	NA
		PCU034_R	1,5158945	SCC	IIIB	III	Bilateral	NA
		PCU045_R	4,7712006	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
GSTP1	4.615056	PCU045_R	1,4856862	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU135_R	4,9379048	SCC	IIIB	III	Unilateral	NA
YWHAG	2.351722	PCU045_R	2,4641817	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU055_R	3,7256002	SCC	IIB	II	Unilateral	NA
		PCU135_R	1,8410852	SCC	IIIB	III	Unilateral	NA
ATF4	3.923649	PCU037_R	1,9586152	SCC	IIB	II	Unilateral	NA
		PCU045_R	2,1338111	SCC	IIIB	II	Bilateral	NA
		PCU055_R	2,1227192	SCC	IIB	II	Unilateral	NA
		PCU117_R	2,3090521	SCC	IIIB	III	Bilateral	NA
		PCU135_R	2,1661949	SCC	IIIB	III	Unilateral	NA
IFT57	3.075610	PCU034_R	5,3117874	SCC	IIIB	III	Bilateral	NA
RPT: Retroperitoneal tumor	SCC: Squamous cervical cancer	ADC: Adenocarcinoma						

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



4 CONCLUSÃO

Neste recente trabalho foi demonstrado pela primeira vez uma forte associação dos genes PNMA3 e RASSF2 com a quimioradioresistência no câncer, mais especificamente no CCU. Estes potenciais biomarcadores se encontraram superexpressos em 50% das pacientes NR à quimiorradioterapia considerando PNMA3 e em 40% para RASSF2. Enquanto, em pacientes R ao tratamento eles estavam sob baixa expressão para 90% e 95% delas em relação a PNMA3 e RASSF2, respectivamente. Além disso, inúmeros trabalhos têm demonstrado a associação de genes destas famílias com a apoptose e o câncer, mas nenhum deles envolvendo PNMA3. Portanto, mais estudos têm que ser realizados para demonstrar a regulação da apoptose por PNMA3 no câncer, o que inclui o CCU. Por fim, de acordo com nossos resultados nós sugerimos uma complexa interação entre PNMA3 e RASSF2, visto que em pacientes NR ou eles estavam superexpressos simultaneamente, ou sob perfis de expressão opostos. Paralelamente, considerando o padrão de TILs e TATES em mulheres R e NR à quimioradioresistência, um maior número destas células imune no microambiente intratumoral foram atribuídas como contribuidoras na resposta ao tratamento, contrariamente àquelas de localização estromal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 14 jun. 2009. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>
- ADAMS, C. M. et al. Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 8 jan. 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00636>
- AGRAWAL, A. et al. Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: An overview in breast cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 81, n. 2, p. 115–122, out. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.07.001>
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2022. **Atlanta: American Cancer Society**, 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/2022-cancer-facts-and-figures.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2021.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 2, p. 487–489, 2 fev. 2015. <https://doi.org/10.1172/JCI80420>

BAL, M. et al. Detection of abnormal cervical cytology in Papanicolaou smears. **Journal of Cytology**, v. 29, n. 1, p. 45, 2012. <https://doi.org/10.4103/0970-9371.93222>

BERMAN, M. L. et al. Survival and patterns of recurrence in cervical cancer metastatic to periaortic lymph nodes. **Gynecologic Oncology**, v. 19, n. 1, p. 8–16, set. 1984. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(84\)90151-3](https://doi.org/10.1016/0090-8258(84)90151-3)

BERTSCH, U. et al. Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 8, p. e1390–e1390, 28 ago. 2014. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.351>

BHANDARI, V. et al. Unusual Metastasis from Carcinoma Cervix. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 66, n. 5, p. 358–362, 9 out. 2016. <https://doi.org/10.1007/s13224-015-0692-y>

BOURGIOTI, C.; CHATOUPIS, K.; MOULOPOULOS, L. A. Current imaging strategies for the evaluation of uterine cervical cancer. **World Journal of Radiology**, v. 8, n. 4, p. 342, 2016. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.342>

BRAGA, L. DA C. et al. TRAIL-R3-related apoptosis: Epigenetic and expression analyses in women with ovarian neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 126, n. 2, p. 268–273, ago. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.04.038>

BRAMBS, C. et al. The Prognostic Impact of Grading in FIGO IB and IIB Squamous Cell Cervical Carcinomas. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 79, n. 02, p. 198–204, 18 fev. 2019. <https://doi.org/10.1055/a-0828-7681>

BRETT LANGLEY. *et al.* The canonical cyclin dependent kinase inhibitor p21 waf1/cip1 mediates the protective effect of histone deacetylase inhibitors on DNA damage-induced but not oxidative neuronal death. **Annals of Neurology**.2007.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, jan. 2003. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>

CÁCERES-DURÁN, M. Á.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.; VIDAL, A. F. Roles and Mechanisms of the Long Noncoding RNAs in Cervical Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9742, 21 dez. 2020.

<https://doi.org/10.3390/ijms21249742>

CAO, H.-Z. et al. LGR5 promotes cancer stem cell traits and chemoresistance in cervical cancer. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 9, p. e3039–e3039, 7 set. 2017.

<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.393>

CHAO, X. et al. Selection of Treatment Regimens for Recurrent Cervical Cancer.

Frontiers in Oncology, v. 11, 2 fev. 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.618485>

CHEN, H.-L.; D’MELLO, S. R. Induction of neuronal cell death by paraneoplastic Ma1 antigen. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 16, p. 3508–3519, dez. 2010.

<https://doi.org/10.1002/jnr.22506>

CHOW, V.; ANG, W. THE GENE ENCODING THE P53-REGULATED INHIBITOR OF CDKS (PIC1) IS NOT EXPRESSED IN THE MOLT-4 LEUKEMIA-CELL LINE WITH P53 TRUNCATED AT THE CARBOXYL-TERMINUS, AND HARBORS A NUCLEOTIDE SUBSTITUTION AT CODON-31 IN SEVERAL OTHER CANCER CELL-LINES. **International Journal of Oncology**, 1 abr. 1995. <https://doi.org/10.3892/ijo.6.4.871>

CHUNG, S. et al. A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 12, p. 931–937, 16 dez. 2000. <https://doi.org/10.1038/35046585>

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p.

49–63, 20 jan. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>

DALMAU, J. Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. **Brain**, v. 127, n. 8, p. 1831–1844, 16 jun. 2004. <https://doi.org/10.1093/brain/awh203>

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 25 jun. 2007. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

EYMIN, B. et al. p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. **Oncogene**, v. 22, n. 12, p. 1822–1835, 27 mar. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206303>

FAN, L. et al. Long non-coding RNA urothelial cancer associated-1 regulates radioresistance via the hexokinase-2/glycolytic pathway in cervical cancer.

International Journal of Molecular Medicine, 13 jul. 2018. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3778>

FANG, X. et al. Low GAS5 expression may predict poor survival and cisplatin resistance in cervical cancer. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 7, p. 531, 13 jul. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2735-2>

FARIDI, R. et al. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 269, 3 dez. 2011. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-269>

FOWLER, J. R.; MAANI, E. V.; JACK, B. W. **Cervical Cancer**. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431093/>. Acesso em: 23 jun. 2021.

FU, H.-C. et al. Low P16INK4A Expression Associated with High Expression of Cancer Stem Cell Markers Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer after Radiotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2541, 27 ago. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19092541>

FU, N. Y.; SUKUMARAN, S. K.; YU, V.C. Inhibition of ubiquitin-mediated degradation of MOAP-1 by apoptotic stimuli promotes Bax function in mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 24, p. 10051–10056, 12 jun. 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700007104>

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Pathophysiology of Cancer Cell Death. In: **Abeloff's Clinical Oncology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 69-77.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2865-7.00005-9>

GAO, Y. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 21, p. 86–95, 2015. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.893608>

GATES, A. et al. Screening for the prevention and early detection of cervical cancer: protocol for systematic reviews to inform Canadian recommendations. **Systematic Reviews**, v. 10, n. 1, p. 2, 2 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01538-9>

GLOBOCAN. **Cancer Today**. 2022. Disponível em:
https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
Acesso em: 23 jun. 2021.

GUERRERO-SETAS, D. et al. RASSF2 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical cancer. **Modern Pathology**, v. 26, n. 8, p. 1111–1122, 29 ago. 2013. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.32>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HERBERT THOMS. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. **Yale J Biol Med**, v. 15, n. 6, p. 924, jul. 1943.

HESSON, L. B.; COOPER, W. N.; LATIF, F. The Role of RASSF1A Methylation in Cancer. **Disease Markers**, v. 23, n. 1–2, p. 73–87, 2007.
<https://doi.org/10.1155/2007/291538>

HU, L. et al. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. **Modern Pathology**, v. 18, n. 2, p. 267–273, 15 fev. 2005. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800290>

HUANG, F. et al. PNMA5 Promotes Bone Metastasis of Non-small-Cell Lung Cancer as a Target of BMP2 Signaling. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 31 maio 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.678931>

HUANG, X. et al. Farnesoid X receptor functions in cervical cancer via the p14ARF-mouse double minute 2-p53 pathway. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 5, p. 3617–3625, 28 maio 2022. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07201-x>

HUANG, Y. et al. Over-Expressed miR-224 Promotes the Progression of Cervical Cancer via Targeting RASSF8. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162378, 14 set. 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162378>

ICHIM, G.; TAIT, S. W. G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 8, p. 539–548, 1 ago. 2016.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>

ISHIKAWA, M. et al. P16INK4A expression might be associated with a favorable prognosis for cervical adenocarcinoma via dysregulation of the RB pathway. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18236, 14 dez. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97703-8>

JIANG, J. et al. TIPE1 Promotes Cervical Cancer Cell Chemoresistance to Cisplatin in a Wild-Type p53-Dependent Manner. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 15 jan. 2021.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.593615>

JIANG, P.; YUE, Y. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 1, p. 3–7, jan. 2014.
<https://doi.org/10.3892/etm.2013.1374>

KASHYAP, N. et al. Risk Factors of Cervical Cancer: A Case-Control Study. **Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing**, v. 6, n. 3, p. 308–314, jul. 2019.
https://doi.org/10.4103/apjon.apjon_73_18

KHAMIS, S. I. et al. Survival in Cervical Cancer and Its Predictors at Ocean Road Cancer Institute From January to December 2012. **JCO Global Oncology**, n. 7, p. 734–739, dez. 2021. <https://doi.org/10.1200/GO.20.00616>

KHLEIF, S. N. et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 9, p. 4350–4354, 30 abr. 1996.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4350>

LAW, J.; YU, V. C.; BAKSH, S. Modulator of Apoptosis 1: A Highly Regulated RASSF1A-Interacting BH3-Like Protein. **Molecular Biology International**, v. 2012, p. 1–10, 14 jun. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/536802>

LEE, Y. H. et al. Tricistronic expression of MOAP-1, Bax and RASSF1A in cancer cells enhances chemo-sensitization that requires BH3L domain of MOAP-1. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 146, n. 7, p. 1751–1764, 6 jul. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03231-9>

LEE, Y. H.; PANG, S. W.; TAN, K. O. PNMA2 mediates heterodimeric interactions and antagonizes chemo-sensitizing activities mediated by members of PNMA family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 1, p. 224–229, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.083>

LI, Q. et al. GADD45 α sensitizes cervical cancer cells to radiotherapy via increasing cytoplasmic APE1 level. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 5, p. 524, 9 maio 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0452-x>

LIAO, D. Mechanisms of Cell Death and Opportunities for Therapeutic Development. [s.l.] **Elsevier**, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128142080/mechanisms-of-cell-death-and-opportunities-for-therapeutic-development>. Acesso em: 23 jun. 2021.

LIU, J.; LIU, X.; LI, R. LncRNA SNHG6 enhances the radioresistance and promotes the growth of cervical cancer cells by sponging miR-485-3p. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 424, 31 dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01448-9>

LOANE, D. J.; STOICA, B. A.; FADEN, A. I. Neuroprotection for traumatic brain injury. In: [s.l.: s.n.]. p. 343–366. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52892-6.00022-2>

MELLO, V.; SUNDSTROM, R. K. **Cervical Intraepithelial Neoplasia**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544371/>. Acesso em: 23 jun. 2021

MORGAN, R.; MORTENSSON, E.; WILLIAMS, A. Targeting LGR5 in Colorectal Cancer: therapeutic gold or too plastic? **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 11, p. 1410–1418, 30 maio 2018. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0118-6>

NAJIB, F. SADAT et al. Diagnostic Accuracy of Cervical Pap Smear and Colposcopy in Detecting Premalignant and Malignant Lesions of Cervix. **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 453–458, 23 set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13193-020-01118-2>

NANDA, K. et al. Accuracy of the Papanicolaou Test in Screening for and Follow-up of Cervical Cytologic Abnormalities. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 10, p. 810, 16 maio 2000. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-10-200005160-00009>

NEY, D. E.; MESSERSMITH, W.; BEHBAKHT, K. Anti-Ma2 Paraneoplastic Encephalitis in Association with Recurrent Cervical Cancer. **Journal of Clinical Neurology**, v. 10, n. 3, p. 262, 2014. <https://doi.org/10.3988/jcn.2014.10.3.262>

PANG, S. W. et al. PNMA family: Protein interaction network and cell signalling pathways implicated in cancer and apoptosis. **Cellular Signalling**, v. 45, p. 54–62, maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.01.022>

POOLKERD, S. et al. Survival rate of recurrent cervical cancer patients. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet**, v. 89, n. 3, p. 275–82, mar. 2006.

QIN, X. et al. Long noncoding RNA LINC00657 inhibits cervical cancer development by sponging miR-20a-5p and targeting RUNX3. **Cancer Letters**, v. 498, p. 130–141, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.044>

RAJKUMAR, T. et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 80, 22 dez. 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-80>

ROCHE, J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. **MDPI Cancers**, v. 10, n. 2, p. 1-4, fev.2018. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>

RODRIGUES, A. N. et al. Characteristics of patients diagnosed with cervical cancer in Brazil: preliminary results of the prospective cohort EVITA study (EVA001/LACOG 0215). **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 32, n. 2, p. 141–146, fev. 2022. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-002972>

ROMAGOSA, C. et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2087–2097, 5 maio 2011. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.614>

ROY, S.; NICHOLSON, D. W. Cross-talk in cell death signaling. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 8, p. F21-5, 16 out. 2000. <https://doi.org/10.1084/jem.192.8.F21>

SANKARANARAYANAN, R.; BUDUKH, A. M.; RAJKUMAR, R. Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 10, p. 954–62, 2001.

SANO, T. et al. Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 6, p. 1741–1748, dez. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65689-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65689-1)

SCHWARZ, J. K. et al. Prognostic Significance of p16 Expression in Advanced Cervical Cancer Treated With Definitive Radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics**, v. 84, n. 1, p. 153–157, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.11.032>

SHEN, C.-J.; CHENG, Y.-M.; WANG, C.-L. LncRNA PVT1 epigenetically silences miR-195 and modulates EMT and chemoresistance in cervical cancer cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, n. 7, p. 637–644, 9 ago. 2017. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1307379>

SHIMADA, M. et al. The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14195, 26 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71134-3>

SIMON, S. E. et al. Alpha-Mangostin Activates MOAP-1 Tumor Suppressor and Mitochondrial Signaling in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–12, 17 jan. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7548191>

SU, Y.; WANG, W.; MENG, X. Revealing the Roles of MOAP1 in Diseases: A Review. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 889, 4 mar. 2022. <https://doi.org/10.3390/cells11050889>

TAN, C. T. et al. MOAP-1 Mediates Fas-Induced Apoptosis in Liver by Facilitating tBid Recruitment to Mitochondria. **Cell Reports**, v. 16, n. 1, p. 174–185, jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.068>

TAN, K. O. et al. MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 41, p. 14623–14628, 11 out. 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503524102>

THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7690–7700, 13 dez. 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202953>

TORNESELLO, M. L. et al. The Role of microRNAs, Long Non-coding RNAs, and Circular RNAs in Cervical Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 20 fev. 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00150>

TSOUMPOU, I. et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 3, p. 210–220, maio 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.10.005>

TSUJIMOTO, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? **Genes to Cells**, v. 3, n. 11, p. 697–707, nov. 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x>

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, set. 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)

WANG, H. et al. Long noncoding RNA SNHG6 mainly functions as a competing endogenous RNA in human tumors. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 219, 6 dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01303-x>

WANG, X. et al. LncRNA MEG3 has anti-activity effects of cervical cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 636–643, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.056>

WEBER, H. O. et al. Human p14ARF-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. **Oncogene**, v. 21, n. 20, p. 3207–3212, 9 maio 2002. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205429>

WENTZENSEN, N.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Biomarkers in Cervical Cancer Screening. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 315–330, 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/678793>

WHO. **Cervical Cancer Elimination Initiative**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/cervical-cancer-elimination-initiative>. Acesso em: 23 jun. 2021.

WHO. **Comprehensive Cervical Cancer Control**. 2. ed. 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/144785/9789241548953_eng.pdf Acesso em: 23 jun. 2021.

YANG, W. et al. LncRNA GAS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, p. 101042831771131, 3 jul. 2017. <https://doi.org/10.1177/1010428317711315>

YIM, E.-K.; PARK, J.-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research and Treatment**, v. 37, n. 6, p. 319, 2005. <https://doi.org/10.4143/crt.2005.37.6.319>

ZENG, X. et al. LIMD1 Increases the Sensitivity of Lung Adenocarcinoma Cells to Cisplatin via the GADD45 α /p38 MAPK Signaling Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 10 jul. 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00969>

ZHANG, H. et al. The Role of LncRNAs in the Regulation of Radiotherapy Sensitivity in Cervical Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 26 maio 2022.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.896840>

ZHANG, J. et al. Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21. **Cancer Biology & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 104–113, 2 jan. 2016.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1108496>

ZHANG, S. et al. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 32, n. 6, p. 720–728, 2020. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>

ZHONG, H. et al. Publisher Correction: ‘TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies’ and ‘Overview of recent advances in liposomal nanoparticle-based cancer immunotherapy.’ **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 5, p. 843–843, 6 maio 2021.
<https://doi.org/10.1038/s41401-020-0444-0>

ZHU, X. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 1885, jun. 2016. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S106412>

ZUCCHERATO, L. W. et al. Cervical Cancer Stem-Like Cell Transcriptome Profiles Predict Response to Chemoradiotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 7 maio 2021.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.639339>

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, fev. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>

ANEXOS

Anexo 1 – Instruções para autores da revista “Gynecologic Oncology”

CHECK LIST FOR AUTHORS

Required Submission Criteria

Order of Submission

The order of your new submission should be as follows:

- 1) Cover Letter
- 2) Conflict of Interest Forms (one per author)
- 3) Manuscript File (should include title page, abstract, full manuscript body text, conflict of interest statement, references, and table/figure legends)
- 4) All Regular Tables (in order of citation within the manuscript text)
- 5) All Regular Figures (in order of citation within the manuscript text)
- 6) All Supplementary Materials (including Surgical Film file)
- 7) Highlights

General

After your article is accepted, you may not add authors to the manuscript without prior approval from the editorial office. To determine authorship of manuscripts submitted to Gynecologic Oncology, please use the following criteria provided by the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available from Secretariat Office, American College of Physicians, Independence Mall West, Sixth Street at Race, Philadelphia, PA 19106-1572).

Suggest at least **two potential reviewers** who are experts in the field and provide reviewer's full name and current functioning email addresses for each.

Provide a **cover letter** that outlines the significance of the findings, the contribution of the individual authors, and any other information pertinent to the review and publication of the manuscript. All financial support should also be stated in the cover letter.

Conflict of Interest Forms for all authors are signed and included with the submission.

Please note that manuscript will not be seen by editors or reviewers until all conflict of interest forms are included with the submission. Forms may be downloaded here: http://cdn.elsevier.com/promis_misc/YGYNO_and_GORE_ICMJE_COI.pdf If you experience an issue when trying to access the form, it could be linked to your browser. Please try right clicking on the above link to the form and selecting 'save target as'. You should then be able to save the form to your computer.

- A **Conflict of Interest statement** is included in the main manuscript file and appears before the reference listing
- An **Author Contribution section** is required within your manuscript source file, above the references. This should include each author's contribution to the manuscript
- **Lines are numbered** consecutively. All line numbers should be provided on the left margin of the page, and each and every line should be numbered. Please number all pages continuously and do not restart the line numbering on each page. You may add line numbers in Microsoft Word by clicking on “File”, select “Page setup”, select the “Layout” tab, click on the “Line Numbering” button, check the “Add Line Numbering” box, and select “Continuous”
- **Word count / table & figure limitations** are observed both on the abstract and on the manuscript text.

Gynecologic Oncology: Detailed Requirements for Submitted Manuscripts

Article Type	Abstract	Abstract Length (words)	Manuscript Length* (words)	Tables and/or Figures (max.)	Supplementary Material	References	Highlights**
Research Paper	Structured	250	4000	6	No Limit	40	Required
Systematic Review and/or Meta-Analysis Article	Structured or Unstructured	300	5500	6	No Limit	70	Required
Society Position Statements or White Papers	Not required	n/a	6000	6	No Limit	50	Required
Editorial	No	n/a	1600	n/	No	10	Required

	abstract			a	Limit		
Clinical Commentary	No abstract	n/a	1600	n/ a	No Limit	10	Required
Tumor Board Presentations	Unstructured Summary	50	500	6	No Limit	6	Required

- If the research has been conducted by a multi-center group, the group should identify a writing committee which is directly responsible for the manuscript.

* Manuscript word counts apply only to the main body of text. They do not include extras such as references and figure legends.

** Highlights to contain 3-5 bullet points, with each bullet point containing no more than 125 characters, including spaces. These should convey the core findings of your submission. Please note that the highlights **MUST NOT** be identical to your manuscript title or full abstract. See <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/highlights> for examples.

- The manuscript is **written in clear and proper English**.
- All files are presented in **the proper order**. Files should be ordered according to the number which appears next to the file description on the “Attach Files” screen.

Title page

Every submission must include a title page as the **first page of the manuscript file** (please note: not the system generated built PDF, but rather the Microsoft Word document or RTF file that you upload to your submission). Please note that the corresponding author listed on your title page must match the corresponding author entered in our systems; should this information conflict, we reserve the right to contact either or both authors for correspondence.

- Includes **full title of** manuscript.
- Includes **all author names** in the style and order to be published.
- All **current author affiliations** are provided.
- The **corresponding author** is denoted.
- The current postal address, telephone number, fax number, and **functioning email address** is provided for the corresponding author.
- If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting

at the time, a "**Present address**" (or "**Permanent address**") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes

Abstract

- **Word count limitations** are observed.
- For Research papers and Surgical films, a **structured abstract** is required. The abstract must be divided into the following sections: Objective, Methods, Results, and Conclusions.
- For Systematic Reviews and/or Meta-Analysis Articles either a structured abstract or unstructured abstract is acceptable.

References

- References are cited in text by **number in order of appearance**.
- All references provided in the reference listing have been **cited within the text** of the manuscript.
- There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result '

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York,

2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Tables and Figures

□ **Table and figure limitations** are observed. Any excess tables or figures are supplied as supplementary materials.

□ Please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for **additional instructions**

□ All figures are provided in EPS, TIFF, JPEG, or PDF **file format** and all tables are provided in DOC or RTF file format.

□ All figures pass system **quality check** on the “QC Check” screen and are provided in high-resolution.

□ All tables and figures are **labeled and files are named** according to the order of appearance in the manuscript.

□ Each table or figure has an **accompanying legend**. Labels on legends should match labels on figures or tables. All table and figure legends should be provided in a list in the order of appearance of citation within the manuscript text. This list should appear at the end of your manuscript file (not in a separate file) after your reference listing. Please ensure that the label on each legend matches the label on the corresponding figure. Legends for supplementary figures should be labeled “S1”, “S2”, etc.

□ Neither tables nor figures are embedded in the manuscript text. Figures should be provided in a **separate file**, while tables may be presented either in a separate file or at the end of your manuscript file.

□ All figures and tables are **readable and appear in full** in the system built PDF. Nothing should be cut off from the edge of the page or be otherwise unreadable.

□ For Surgical Films, all videos must be submitted as a supplementary item and should be no larger than 100MB. All videos should be provided in either MPG, MP4, AVI, GIF,

or MOV file format. All video submissions should also contain a figure still either a frame from the video or animation or a separate image. The figure still should adhere to the file format guideline specified above.

□ If, together with your accepted article, you submit **usable color figures** then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Supplementary Materials

□ All supplementary materials must be provided in **separate files**. Supplementary materials are intended for online publication only and will not be published in print. Like regular figures and tables, supplementary materials are subject to a quality check to ensure that they are publishable. Supplementary figures and tables should be labeled "S1", "S2", etc.

Highlights

□ For all article types except Letters to the Editor **highlights are required**. Highlights to contain 3-5 bullet points, with each bullet point containing no more than 125 characters, including spaces. These should convey the core findings of your submission. Please note that the highlights **MUST NOT** be identical to your manuscript title or full abstract. See <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/highlights> for examples