

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN
(MCM)-7 E SUA CORRELAÇÃO COM O
PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA PATOGÊNESE
DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

LARISSA RODRIGUES PEIXOTO

Orientador: Prof. Enrrico Bloise

Coorientadora: Profa. Annamaria Ravara Vago

LARISSA RODRIGUES PEIXOTO

MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN
(MCM)-7 E SUA CORRELAÇÃO COM O
PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA PATOGÊNESE
DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Enrrico Bloise

Coorientadora: Dra. Annamaria Ravara Vago

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro de 2021

043

Peixoto, Larissa Rodrigues.

Minichromosome Maintenance Protein (MCM)-7 e sua correlação com o papilomavírus humano na patogênese do câncer do colo do útero [manuscrito]
/ Larissa Rodrigues Peixoto. - 2021.

109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Enrrico Bloise. Coorientadora: Profa. Dra. Annamaria Ravara Vago.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Componente 7 do Complexo de Manutenção de Minicromossomo. 2. Neoplasias do Colo do Útero. 3. Papillomaviridae. 4. Imuno-Histoquímica. 5. Técnicas de Genotipagem. 6. Biomarcadores. I. Bloise, Enrrico. II. Vago, Annamaria Ravara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

LARISSA RODRIGUES PEIXOTO

336/2021
entrada
2º/2018
2018717027

Às **quatorze horas** do dia **26 de janeiro de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN (MCM)-7 E SUA CORRELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA PATOGÊNESE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Enrrico Bloise**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Enrrico Bloise	UFMG Departamento de Morfologia	APROVADA
Dra. Annamaria Ravara Vago	UFMG Departamento de Morfologia	APROVADA
Dr. Marcelo Antonio Pascoal Xavier	UFMG Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal	APROVADA
Dra. Helen Lima Del Puerto	UFMG Departamento de Patologia	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 26 de janeiro de 2021.**

Dr. Enrrico Bloise (Orientador).

Dra. Annamaria Ravara Vago (Coorientadora)

Dr. Marcelo Antonio Pascoal Xavier

Drª. Helen Lima Del Puerto

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

***Dedico este trabalho, à minha
família, em especial aos meus pais,
Ana Cláudia e Ricardo, meu irmão
Pedro, e ao meu marido André.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, Ana Cláudia e Ricardo, pelo apoio e incentivo para que eu pudesse seguir em frente e alcançar meus objetivos, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Pedro, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

Ao André, meu marido, por estar ao meu lado mesmo de longe, pela compreensão, por entender os momentos de ausência e me apoiar sempre. Obrigada por tudo!

Ao meu Orientador, Professor Enrrico Bloise, por todo aprendizado, por tornar possível a realização desse trabalho e por contribuir na minha formação acadêmica. Tenho muito orgulho de ter sido sua primeira aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

À minha Co-Orientadora, Professora Annamaria Ravara Vago pelo exemplo profissional e pessoal. Obrigada por me acolher no laboratório desde o meu primeiro ano da graduação, e agora, depois de 7 anos eu só tenho a agradecer por todo seu carinho, dedicação e aprendizado. Obrigada por ter trilhado esse caminho comigo. Serei eternamente grata por tudo.

Aos colaboradores do Laboratório de Patologia Mamária na Faculdade de Medicina da UFMG, coordenado pela professora Cristiana Buzelin Nunes, a colaboração de vocês foi de extrema importante para a realização desse trabalho.

À Professora Cristina Guatimosim Fonseca que, gentilmente, recebeu-me no seu laboratório. Obrigada pela valiosa contribuição e pelo apoio oferecido.

Ao Dr. Alexandre Tafuri e toda a equipe do Laboratório de Anatomia Patológica pela disponibilidade em colaborar na realização deste trabalho.

Agradeço as minhas companheiras de Laboratório de Patogênese Molecular, Lara e Lilian que compartilharam tantos momentos comigo. Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, ensinamentos e carinho. Vocês são incríveis!

A todos os alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Patogênese Molecular do ICB/ UFMG, que participaram desse projeto: Alessandra, Bruna, Isabelly, Liliane e Mariana. A colaboração de vocês foi de extrema importância para esse trabalho. Agradeço também ao aluno de Doutorado Victor pelo apoio e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, e aos colegas e professores das Disciplinas cursadas durante esses anos, aprendi muito com todos vocês.

A todos os meus amigos e familiares obrigada pelo carinho, apoio e por compreenderem as minhas ausências em diferentes momentos. Em especial agradeço a minha avó Consola por todo amor, por estar sempre ao meu lado me dando força e me apoiando, a minha tia Juliana, por ser um grande exemplo e por me incentivar a entrar na vida acadêmica, e aos meus tios Marcos e Paulo Henrique pelo carinho e pela atenção em todos os momentos!

À todas as pacientes que contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O câncer do colo do útero (CCU) afeta, no mundo, mais de 500 mil mulheres ao ano e é considerado uma das maiores causas de morte relacionadas ao câncer na população feminina. Nas duas últimas décadas tem crescido bastante o interesse pelo desenvolvimento de biomarcadores que identifiquem alterações celulares decorrentes da transformação viral, e que possam aumentar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de triagem, diagnóstico e prognóstico do CCU. As proteínas de Manutenção de Minicromossomos (MCMs), incluindo a MCM7 são essenciais para a replicação do DNA e o controle do ciclo celular e, portanto, são utilizadas em diversos estudos como biomarcadores de proliferação e prognóstico em diferentes tipos de carcinomas. Nossa hipótese é a de que a proteína MCM7, apresenta potencial como biomarcador de prognóstico (grau de diferenciação) do CCU, e cuja imunomarcação em tecidos cervicais estaria relacionada à presença do Papilomavírus Humano (HPV) de alto-risco (AR). Avaliou-se nesse estudo em 43 biópsias de CCU e em 15 amostras de cervicite (controle) por meio de Imuno-histoquímica e análise morfométrica, a área de marcação da proteína MCM7. Também foi analisada em amostras de DNA extraídas do tecido cervical a presença do DNA-HPV e do DNA-HPV16 de AR, por meio da reação de *Nested-PCR* e *Hemi-nested PCR*, respectivamente. A presença do DNA-HPV foi observada na maior parte das amostras de tecido cervical, e aproximadamente metade dessas amostras foi positiva para o DNA-HPV16. Em relação à marcação de MCM7 em tecidos cervicais, observou-se marcação nuclear da proteína em células das camadas basais e parabasais do epitélio normal em amostras de Cervicite. Forte marcação nuclear de MCM7 foi verificada principalmente em células tumorais de origem epitelial, de massas tumorais localizadas no tecido conjuntivo. Contudo, áreas difusas de células não-marcadas também foram notadas nesses tumores em células mais atípicas, com maior grau de diferenciação. Sobre o parâmetro celularidade, as amostras de CCU apresentaram maior número de células marcadas para MCM7 quando comparadas ao grupo Cervicite. Verificou-se que os grupos pouco (CCEP) e moderadamente (CCEM) diferenciados, apresentaram correlação entre o número de células marcadas para MCM7 e o número de células contadas em todas as áreas lesionadas. Além disso, observou-se correlação entre o número de células totais marcadas para MCM7 em CCEP e CCEM e a área de lesão. De acordo com o grau de diferenciação, tumores pouco diferenciados apresentam maior nível de proliferação e agressividade do que os CCEM. Em relação à presença do HPV e do HPV16, verificou-se que maior número de amostras de CCEP foi positivo para MCM7 e para o DNA do

HPV16 em comparação ao grupo CCEM. Portanto, o nosso estudo aponta o uso potencial da marcação tecidual de MCM7 como biomarcador de severidade desse câncer causado pelo HPV, auxiliando de forma significativa no diagnóstico e no acompanhamento de mulheres portadoras do CCU.

Palavras-Chave: MCM7, Câncer do Colo do Útero, HPV, Imuno-histoquímica, Genotipagem, Biomarcadores de Prognóstico.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) affects more than 500,000 women by year worldwide, and it is considered one of the most important causes of cancer-related deaths in the female population. In the last two decades, the interest for the development of biomarkers that can identify cellular changes resulting from viral transformation has considerably grown. The employment of these cell markers may improve the sensitivity and the specificity of CC screening, diagnosis and prognosis methods. The Minichromosome maintenance (MCMs) proteins, including MCM7 are essential for DNA replication and cell cycle control and, therefore, they are used in many studies as proliferation and prognostic biomarkers in different types of carcinomas. Our hypothesis is that the protein MCM7 has potency to be evaluated as a prognostic biomarker for the CC, from whose immuno-staining in cervical tissues would be related to the presence of high-risk (HR) Human Papillomavirus (HR-HPVs). Therefore, in this study, 43 cervical cancer tissues and 15 cervicitis (control) samples obtained by biopsy were evaluated concerning the tissue immune labeling for MCM7 by using immunohistochemistry (IHC) and a morphometric-based analysis of the labeled area. In addition, presence of DNA-HPV and DNA-HPV16 was also analyzed using DNA samples extracted from cervical tissues, and by means of *Nested-PCR* and *Hemi-nested PCR* protocols, respectively. Presence of DNA-HPV was observed in most of cervical tissue samples, and approximately half of samples were positive for DNA-HPV16. Regarding the MCM7 expression in cervical tissues, a nuclear protein staining was observed in cells from the basal and parabasal layers of the normal epithelium in cervicitis samples. Strong nuclear labeling of MCM7 was mainly found in tumor cells from epithelial origin in tumor nests located in the connective tissue. However, diffuse areas of unlabeled cells were noted in tumors nests composed by more atypical cells and exhibiting a higher differentiation degree. Regarding the cell density (cellularity) parameter, CC samples showed higher number of MCM7-labeled cell, when compared with tissues from the cervicitis group. It was found that the cancer groups diagnosed as poorly (CCEP) and moderately (CCEM) differentiated showed a correlation between the number of MCM7-positive cells, and the total number of cells counted in the complete injured areas. In addition, a correlation between the total number of cells labeled for MCM7 in CCEP and in CCEM, and the complete cancer area was observed. Concerning the differentiation tumor grading, CCEP is a tumor with higher proliferation rates and aggressive behavior than CCEM cancers. Regarding the presence of HPV and HPV16 DNA, it was found that the number of CCEP samples which presented a higher number of MCM7-positive cells and positivity for HPV16-

DNA, were greater when compared to cancer samples from the CCEM group exhibiting similar aspects. Therefore, our study points to the potential use of MCM7 as a biomarker of the severity of this HPV-associated cancer that may significantly improve the diagnosis, and assist the monitoring of women with CC.

Keys words: MCM7, Cervical Cancer, HPV, Immunohistochemistry, Genotyping, Biomarkers, Prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCUS – *Atypical squamous cells of undetermined significance* (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – *Bovine Serum Albumin*, tradução (Albumina Bovina Sérica)

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

CCEB – Carcinoma de Células Escamosas Bem diferenciado

CCEP – Carcinoma de Células Escamosas Pouco diferenciado

CCEM – Carcinoma de Células Escamosas Moderadamente diferenciado

CCU – Câncer do Colo do Útero

CML – Citologia em meio líquido

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DAB – Diamino-Benzidina 3,3

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*, tradução (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP – *Deoxynucleotide Triphosphates*, tradução (Desoxinucleótido Trifosfato)

E – *Early*, tradução (precoce)

FFPE – *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues*, tradução (Tecido fixado em formalina e incorporado em parafina)

FIGO – *International Federation of Gynecology and Obstetrics*, tradução (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia)

HE – Hematoxilina e Eosina

HPV – *Human Papilloma Virus*, tradução (Papilomavírus humano)

HSIL – *High Grade Squamous Intra-epithelial Lesion*, tradução (Lesão Intraepitelial cervical de alto grau)

HPV- AR – Papilomavírus Humano de Alto Risco

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IHQ – Imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional de Câncer

JEC – Junção escamo-colunar

Kb – Kilobase (1Kb = 1000 pares de base)

L – *Late*, tradução (tardio)

LCR – *Long control region*, tradução (região de controle longa)

LAG – Lesão de Alto Grau

LBG – Lesão de Baixo Grau

LSIL – *Low-grade Squamous Intra-epithelial Lesion*, tradução (Lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau)

μL – Microlitro

mL – Mililitro

μM – Micromolar

mM – Milimolar

μM – Micrômetro

MCM – *Minichromosome Maintenance Protein Complex*, tradução (Complexo de proteínas de Manutenção de Minicromossomas)

mRNA – *messenger Ribonucleic acid*, tradução (Ácido ribonucleico mensageiro)

NIC I – Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1

NIC II – Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2

NIC III – Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3/Carcinoma in situ

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORC – *Origin Recognition Complex*, tradução (Complexo de Reconhecimento da Origem)

ORI – Origem de Replicação

pb – Pares de Base

PBS – *Phosphate Buffered Saline*, tradução (Solução Salina Fosfatada)

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, tradução (Reação em Cadeia da Polimerase)

pRb - Proteína retinoblastoma

PVs - Papilomavírus

PCNA – *Proliferatin Cell Nuclear Antigen*, tradução (Antígeno de Proliferação Celular)

pmol – Picomol

PV – Papilomavírus

RFC – *Replication factor C*, tradução (Fator de Replicação C)

RNA – *Ribonucleic Acid*, tradução (Ácido Ribonucleico)

RPA – *Replication protein A*, tradução (Proteína de Replicação A)

rpm – Rotações por Minuto

SND – Sobrenadante

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF- A – *Vascular endothelial growth factor A*, tradução (fator de crescimento endotelial vascular A)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da anatomia do útero e do colo uterino.	18
Figura 2: Esquema e corte histológico da junção escamo-colunar (JEC) em que se observa a junção dos dois tipos de epitélio escamoso e colunar.	19
Figura 3: Fotomicrografia eletrônica de contraste negativo de partículas do HPV1... ..	21
Figura 4: Árvore filogenética dos Papilomavírus Humano (HPVs).....	22
Figura 5: Representação esquemática do genoma do HPV 16.....	25
Figura 6: Esquema do ciclo de vida do HPV.	28
Figura 7: Imagens de cortes histológicos do tecido cervical corados por HE (Hematoxilina e Eosina).....	29
Figura 8: Imagens capturadas de Carcinomas de células escamosas do colo do útero de diferentes graus corados por Hematoxilina e Eosina.	35
Figura 9: Esquema da dupla fita de DNA no qual é mostrada a forquilha de Replicação que surge a partir de uma ORI eucariota.....	37
Figura 10: Imagem de câncer cervical capturada no programa Image J Fiji.....	51
Figura 11: Imagens dos cortes histológicos das amostras de Cervicite, Carcinoma de células escamosas pouco (CCEP) e moderadamente diferenciados (CCEM) corados com Hematoxilina e Eosina.....	53
Figura 12: Imagem do gel de poliacrilamida a 6% corado pelo nitrato de prata, e apresentando o amplicon de 110 pb do gene de β -globina detido pela utilização de amostras cervicais.	54
Figura 13: Imagem do gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, apresentando o amplicon de 150 pb do gene L1 a partir de amostras cervicais.	55
Figura 14: Imagem do gel de poliacrilamida a 6%, corado com nitrato de prata, apresentando o amplicon de 149 pb do HPV16 em amostras cervicais.....	56
Figura 15: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostra de Cervicite utilizando-se a técnica de Imuno-histoquímica.....	58
Figura 16: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostra de Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado utilizando-se a técnica de Imuno-histoquímica.....	58
Figura 17: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostra de Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado utilizando-se a técnica de Imuno-histoquímica.	59
Figura 18: Comparação da área total do epitélio normal em Cervicites e da lesão invasora em amostras de câncer.	62
Figura 19: Comparação do número total de células epiteliais contadas no epitélio normal e na lesão invasora.	63

Figura 20: Comparação da relação de células epiteliais por mm ² em amostras de Cervicite e do Câncer do Colo do Útero.....	63
Figura 21: Comparação da área total de lesão entre os Carcinomas de Células Escamosas pouco (CCEP) e moderadamente (CCEM) diferenciados..	64
Figura 22: Correlação do número total de células epiteliais alteradas nas áreas de lesão e o grau de diferenciação dos tumores.....	65
Figura 23: Comparação do número de células marcadas para MCM7 entre o grupo de Cervicite e o de Câncer do Colo do Útero (CCU).....	66
Figura 24: Comparação da porcentagem de células marcadas para MCM7 entre o grupo de Cervicite e o grupo de Câncer do Colo do Útero (CCU).....	66
Figura 25: Comparação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinomas de Células Escamosas pouco (CCEP) e moderadamente (CCEM) diferenciados.....	68
Figuras 26 e 27: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco (Fig. 26) e moderadamente (Fig. 27) diferenciados, e o número de células contadas nas áreas de lesão.....	68
Figuras 28 e 29: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco (Fig. 28) e moderadamente (Fig. 29) diferenciados, e a área total da lesão (em mm ²)..	69
Figura 30: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinomas de Células Escamosas pouco diferenciadas e a presença do DNA do HPV.....	70
Figura 31: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinomas de Células Escamosas moderadamente diferenciadas e a presença do DNA do HPV..	70
Figura 32: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 em amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado e a presença do DNA do HPV16.....	71
Figura 33: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 em amostras de Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado e a presença do DNA do HPV16..	71
Figura 34: Número de células de câncer marcadas para MCM7 em amostras de Carcinoma de Células escamosas pouco e moderadamente diferenciados que foram HPV16 positivas..	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Componentes do Mix de PCR para amplificação do gene <i>β-globina</i> (268 pb).	103
Quadro 2 - Componentes do Mix de PCR para amplificação do gene <i>β-globina</i> (110 pb).	103
Quadro 3 - Programa de amplificação do gene <i>β-globina</i> (268 e 110 pb).	104
Quadro 4 - Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 450pb do genoma viral.	105
Quadro 5 - Programa de amplificação do fragmento de 450pb do genoma viral.	105
Quadro 6 - Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 150pb do genoma viral.	106
Quadro 7 - Programa de amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral.	106
Quadro 8 - Iniciadores utilizados para Tipagem do HPV 16.	107
Quadro 9 - Componentes do Mix da PCR para tipagem do HPV 16.	107
Quadro 10 - Programa de amplificação do fragmento de 149pb do genoma viral do HPV 16.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento da FIGO para o Câncer do colo do útero (2018).....	33
Tabela 2 – Classificação do grau de diferenciação das amostras de CCU	45
Tabela 3 – Resultados da detecção da presença do DNA do HPV (150 pb) nas amostras de CCU e Cervicite por Nested PCR.....	55
Tabela 4 – Resultados da detecção da presença do DNA do HPV16 (149 pb) nas amostras de CCU e Cervicite por Hemi-Nested PCR.....	57
Tabela 5 – Contagem de células positivas para MCM7 e presença do DNA-HPV e do HPV16 no grupo de Cervicite.....	60
Tabela 6 – Contagem de células positivas para MCM7 e presença do DNA-HPV e do HPV16 no grupo do Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP).60	
Tabela 7 – Contagem de células positivas para MCM7 e presença do DNA-HPV e do HPV16 no grupo do Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM).....	61

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1. Anatomia do Útero e do Colo do Útero	18
1.2. Epidemiologia do Câncer do Colo do Útero	19
1.3. O Papilomavirus Humano (HPV)	21
1.3.1. <i>Classificação dos HPVs</i>	25
1.3.2. <i>O Ciclo de Vida do HPV</i>	26
1.4. Lesões Precursoras do Câncer de Colo Útero.....	28
1.5. O Câncer do Colo do Útero	31
1.5.1. <i>Estadiamento do Câncer do Colo do Útero</i>	32
1.5.2. <i>Classificação histopatológica do Câncer do Colo do Útero</i>	34
1.6. Desenvolvimento de Biomarcadores	35
1.7. As Proteínas de Manutenção de Minicromossomo	36
1.7.1. <i>Licenciamento e Duplicação do DNA</i>	38
1.7.2. <i>MCM7 como Marcador de Proliferação e de Prognóstico no Câncer do Colo do Útero</i>	39
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral.....	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1. População de Estudo.....	44
4.1.1. <i>Classificação Histopatológica das amostras de Câncer do Colo do Útero</i>	45
4.2. Testes Moleculares.....	45
4.2.1. <i>Extração do DNA das amostras cervicais</i>	45
4.2.2. <i>Amplificação do fragmento do gene β-globina Humano</i>	46
4.2.3. <i>Detecção do DNA do HPV</i>	47
4.2.4. <i>Tipagem do HPV 16</i>	48

4.3.	Imuno-histoquímica	49
4.4.	Avaliação da marcação de MCM7 em amostras de Câncer de Colo do Útero.....	50
4.5.	Análise Estatística	51
5.	RESULTADOS	52
5.1.	Análise Histopatológica	52
5.2.	Verificação da integridade do DNA extraído das amostras cervicais ...	54
5.3.	Detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais.....	54
5.4.	Detecção do DNA do HPV16 nas amostras cervicais	56
5.5.	Análise da Imunomarcção por MCM7 nas amostras cervicais	57
5.6.	Avaliação morfométrica de células marcadas e não-marcadas por MCM7.....	59
5.6.1.	<i>Análise da celularidade nas amostras de tecido cervical normal e alterado.....</i>	<i>62</i>
5.6.2.	<i>Análise da Imunomarcção por MCM7 entre Cervicite, Carcinoma de células escamosas pouco e moderadamente diferenciados.....</i>	<i>65</i>
5.6.3.	<i>Análise da presença do HPV e do HPV 16 nas amostras de Câncer do Colo do Útero.....</i>	<i>69</i>
6.	DISCUSSÃO	73
7.	CONCLUSÕES	80
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9.	SEÇÃO DE ANEXOS.....	102
	Anexo 1 – Folha de rosto para submissão do projeto ao Comitê em Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG.....	102
	Anexo 2 – Condições de preparo e programa de amplificação do gene de β -globina humana (<i>Nested</i> e <i>Hemi-Nested</i> PCR).....	103
	Anexo 3 – Condições da PCR para a detecção da presença do DNA viral ..	105
	Anexo 4 – Condições da PCR para a detecção do DNA do HPV 16	107
	Anexo 5 – Correlação entre o número total de células marcadas para MCM7 em Cervicite e CCU.....	109

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Anatomia do Útero e do Colo do Útero

O útero é um órgão fibromuscular oco, que apresenta paredes espessas formadas por fibras musculares lisas (miométrio), sendo a parte interna revestida por mucosa (endométrio) e a externa pelo peritônio (perimétrio) (DANGELO, J.G; FATTINI, C.C, 2007). Esse órgão está localizado na cavidade pélvica e pode ser dividido em três regiões: o corpo que compreende os dois terços superiores do útero, o istmo que apresenta forma cilíndrica e é a parte mais estreita do órgão e conecta os ovários ao corpo do útero, e o colo, também denominado de cérvix, que está localizado na porção inferior do útero e que se une à vagina (Figura 1) (SMELTZER, S.C; BARE, B.G, 2005).

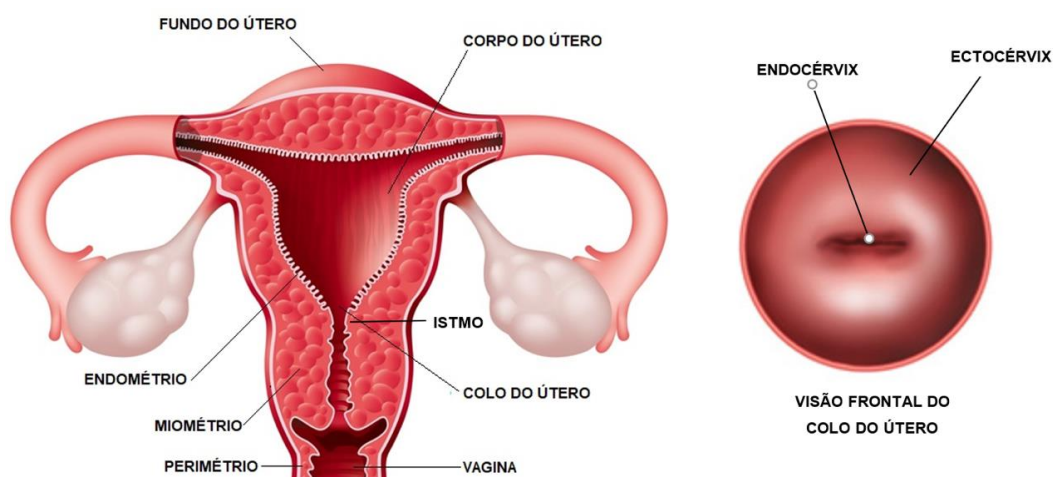


Figura 1: Esquema da anatomia do útero e do colo uterino. Fonte: Adaptado do site Anatomia em foco, 2019 <<https://www.anatomiaemfoco.com.br/>> e do site KASVI, 2020 <<https://kasvi.com.br/hpv-cancer-colo-uterino>>. Acesso em 12 de junho 2020.

O colo do útero é uma estrutura fibromuscular revestida externamente pela ectocérvice que é formada por um epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, e internamente, por um epitélio glandular cilíndrico, denominado endocérvice. Sendo assim, os dois tipos celulares principais responsáveis por revestir o colo do útero são as células escamosas da ectocérvice e as células glandulares da endocérvice. A junção desses dois tecidos epiteliais é conhecida como junção escamo-colunar (JEC), considerada uma região de alto potencial de transformação celular (Figura 2) (BARROS, A., *et al.*, 2012).

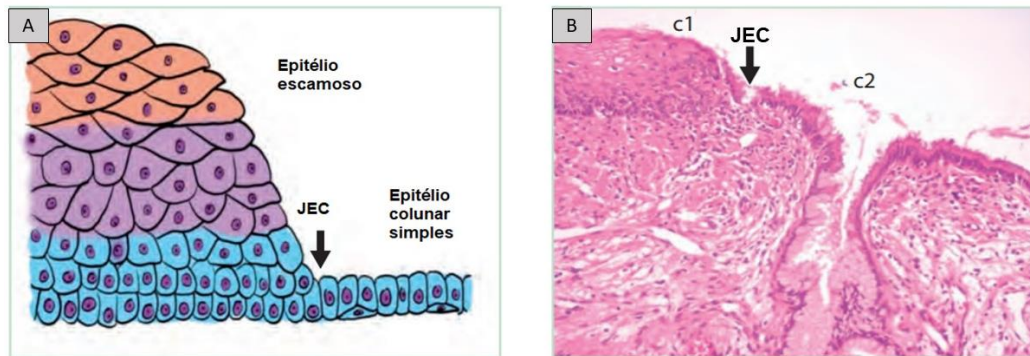


Figura 2: Esquema e corte histológico da junção escamo-colunar (JEC) em que se observa a junção dos dois tipos de epitélio escamoso e colunar. Figura A esquema da JEC formada por epitélio escamoso (células em vermelho) e epitélio colunar simples (células em azul). Na figura B observa-se um corte histológico do tecido cervical evidenciando a JEC (seta), em c1 o epitélio escamoso e em c2 o epitélio colunar simples. Fonte: Adaptado de Caderno referência 1: Citopatologia Ginecológica, BARROS *et al.*, 2012.

1.2. Epidemiologia do Câncer do Colo do Útero

O CCU é uma doença resultante de alterações no ciclo celular que levam a um crescimento desordenado das células que revestem a cérvice uterina. Essa patologia é responsável anualmente pela morte de muitas mulheres em todo o mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o quarto tipo de câncer mais frequente entre elas, afetando principalmente a população feminina mais pobre e vulnerável, tornando-se, portanto, um fardo na saúde pública.

Segundo a OMS, foi estimado o número de 570 mil casos de CCU em 2018 e que em 2040 esse número aumentará para 776.857 mil casos. Além disso, esse tipo de câncer é responsável pela morte de 311.000 mulheres a cada ano, sendo que acima de 85% delas ocorrem em regiões com baixo poder socioeconômico (IARC, 2019; WHO, 2019). Assim, algumas regiões que podem ser destacadas como apresentando uma maior prevalência desse tipo de tumor, seriam a África Subsaariana, o Sul da Ásia, a América Latina, o Caribe e a Melanésia, sendo que apenas na América Latina e no Caribe durante o ano de 2018, observou-se aproximadamente 56.000 novos casos de CCU com mortalidade de 28.000 casos por câncer do colo (IARC, 2018b). No entanto temos uma menor prevalência em países da Ásia Ocidental, Austrália/Nova Zelândia e América do Norte (BRAY *et al.*, 2013; TORRE *et al.*, 2015; GINSBURG *et al.*, 2017).

No Brasil, o CCU é o terceiro tipo de câncer mais frequente na população feminina, ficando atrás apenas do câncer de mama e do colorretal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no país (INCA, 2020a). Estimativas para o triênio 2020-2022 apontaram o surgimento de 16.590 novos casos dessa neoplasia em todo o país, sendo 15,43 casos para cada 100 mil mulheres. Ainda segundo o INCA, o

CCU é o segundo tipo de câncer mais prevalente nas Regiões Norte (21,20/100 mil), Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil). Já na Região Sul (17,48/100 mil) é o quarto tipo mais comum e por último, na Região Sudeste (12,01/100 mil) está na quinta posição de prevalência (INCA, 2020b).

Para o ano de 2020, segundos dados do INCA, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo as estimativas de incidência do câncer de colo serão respectivamente de 1.270, 1.640 e 2.250 novos casos. Em Belo Horizonte, estimou-se a taxa de surgimento de 9,34 novos casos a cada 100 mil mulheres no ano de 2020 (INCA, 2020c).

Diversos estudos epidemiológicos e moleculares desenvolvidos nos últimos 40 anos demonstraram que o Papilomavírus Humano (HPV) está intimamente relacionado com a patologia do câncer cervical (zur HAUSEN, 1977). Segundo a OMS, o HPV é a infecção viral mais comum do trato reprodutivo (WHO, 2019b). O risco da infecção pelo HPV é fortemente relacionado com a existência de elevado número de parceiros sexuais, frequência e início precoce da vida sexual (PINTO & QUEIROZ, 2013). A infecção por esse vírus pode ocorrer em qualquer faixa etária (CUTTS *et al.* 2007), sendo que a probabilidade de infecção por HPV diminui com o envelhecimento das mulheres (MUÑOZ *et al.*, 2004; CASTLE *et al.*, 2005). Alguns trabalhos demonstram um pico bimodal de infecção pelo HPV, com ocorrência do primeiro na idade de 20 anos e de um segundo pico na idade de 45-50 anos. Estes casos são observados especialmente em populações de alto risco para o CCU (MOLANO *et al.*, 2002; CUTTS *et al.*, 2007).

Há fortes evidências de que o HPV além de ser o principal agente etiológico do CCU, também pode ser o causador de diferentes tipos de câncer como o de pênis, vulva, vagina, ânus, cabeça e pescoço. Sendo assim, o HPV é responsável por 4,5% (630.000) de todos os novos casos de câncer em todo o mundo (DEPUYDT, *et al.* 2017; SERRANO *et al.*, 2018). No CCU, o HPV está presente em mais de 99% dos casos (WANG, X. *et al.*, 2018).

Atualmente, sabe-se que a infecção persistente por HPVs de alto-risco (AR) oncogênico é o principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer. Contudo, além do HPV, fatores imunológicos, nutricionais e comportamentais também podem influenciar a progressão das Lesões Intraepiteliais até o carcinoma (BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002). Apesar da existência de metodologias de rastreamento que possibilitam prevenir e diagnosticar o CCU precocemente, o câncer relacionado ao HPV continua sendo uma das principais causas de mortes entre a população feminina em diferentes partes do mundo,

principalmente nos países menos desenvolvidos que não possuem programas de Rastreamento consolidados.

1.3. O Papilomavirus Humano (HPV)

O HPV pertencente ao grupo Papilomavírus (PVs) da família Papillomaviridae é um vírus pequeno (55nm) com DNA de dupla-fita, que apresenta capsídeo, mas que não possui um envelope responsável por envolver o material genético (Figura 3). Os PVs estão divididos em gêneros, espécies, tipos, subtipos e variantes devido à semelhança na sequência de nucleotídeos da região mais conservada do genoma viral, a porção do gene *L1* (de VILLIERS *et al.*, 2004; BERNARD *et al.*, 2005; MORSHED *et al.*, 2014; EGAWA *et al.* 2015).

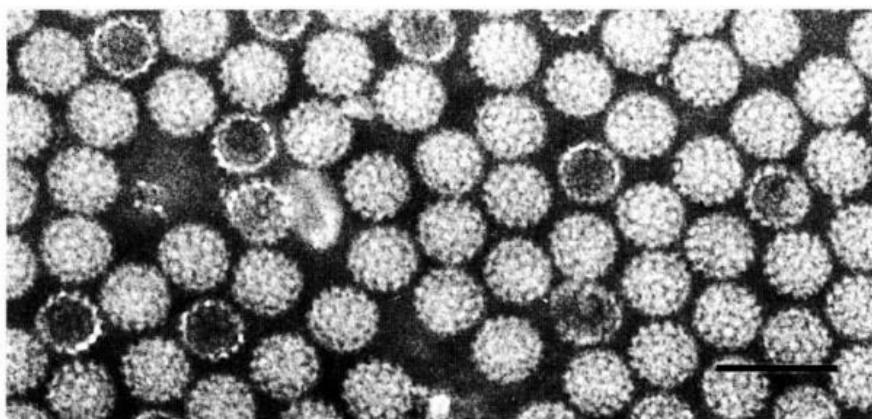


Figura 3: Fotomicrografia eletrônica de contraste negativo de partículas do HPV1. A barra de escala representa 100nm. Fonte: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, MURPHY, et al., 1995.

Os HPVs do gênero *Alfa – papilomavirus* são os vírus de maior importância clínica e epidemiológica, responsáveis por causar verrugas e lesões na pele e na mucosa ano-genital. Entretanto, existem outros quatro gêneros nos quais os HPVs são distribuídos: *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu-papilomavirus*, que possuem tipos de HPVs responsáveis por causar apenas lesões cutâneas (de VILLIERS *et al.*, 2004; EGAWA & DOORBAR, 2017). (Figura 4). Como mencionado, a divisão dos PVs em cinco gêneros é devido às diferenças na sequência de DNA do gene *L1* sendo que alguns tipos possuem sequências de nucleotídeos com diferenças de no mínimo 10% quando comparadas a outros Papilomavirus. O gene *L1* é útil para a classificação e construção de árvores filogenéticas, por ser bem conservado e poder ser alinhado entre todos os PVs conhecidos (BERNARD H.U., *et al.* 2010).

Nos últimos anos, métodos de detecção sensíveis permitiram identificar uma grande quantidade de novos tipos de HPV, principalmente dos gêneros *Beta* e *Gamma*. Embora a filogenia forneça importantes informações sobre a associação

dos HPVs com doenças, tipos de HPV intimamente relacionados podem causar patologias distintas (DOORBAR, J. *et al.*, 2015). Observa-se, por exemplo, que os HPVs 6 e 11 compartilham 85% de identidade de sequências de seus genomas; porém o HPV6 é encontrado mais frequentemente em verrugas anogenitais do que o HPV11, que é a principal causa de papilomas da laringe. Já o HPV13 compartilha 78% de identidade de sequência com os HPVs 6 e 11, não estando, contudo, associado ao surgimento de verrugas ou papilomas (DOORBAR, J. *et al.*, 2015).

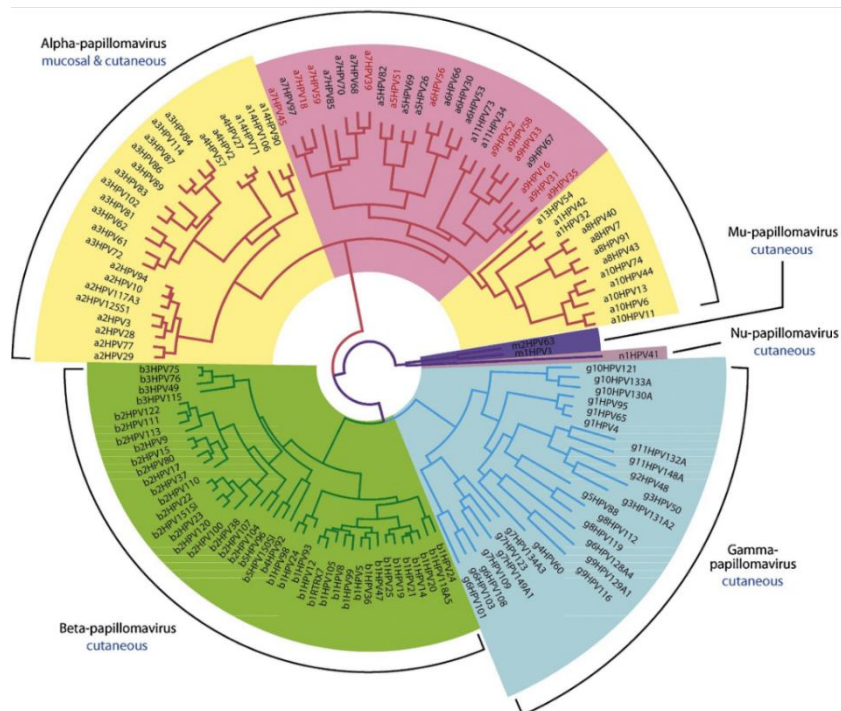


Figura 4: Árvore filogenética dos Papilomavírus Humano (HPVs). Os HPVs são divididos em cinco gêneros: Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Gamma-papillomavirus, Nu-papillomavirus e Mu-papillomavirus. O gênero Alpha-papillomavirus (representado de amarelo e rosa) é o de maior relevância clínica por causar lesões mais recorrentes. Na porção destacada em amarelo estão representados os tipos virais de baixo-risco oncogênico que infectam a pele e mucosas, e em rosa, os HPVs de alto-risco oncogênico relacionados com o desenvolvimento de lesões pré-invasivas e do câncer. Fonte: Adaptado de EGAWA & DOORBAR, 2017.

O genoma desse vírus é dividido em três porções: (i) uma região transcrita precocemente denominada região precoce (do inglês *Early-region*), composta por genes que codificam seis proteínas regulatórias, E1, E2, E4, E5, E5, E6 e E7; (ii) uma região tardia (do inglês *Late-region*) contendo os genes *L1* e *L2*, responsáveis pela produção das proteínas constituintes do capsídeo viral, e uma região reguladora longa (LCR – do inglês *Long Control Region*), que possui função de regular a expressão gênica do HPV, e na qual se encontra a Origem de Replicação Viral (ORI) (Figura 5) (GROVES & COLEMAN, 2015; GRAHAM, 2017).

Na região precoce do genoma do HPV, o gene *E1* codifica a proteína responsável pela replicação do genoma viral, atuando como uma DNA helicase

dependente de ATP. Juntamente com E1, a proteína regulatória E2, também participa dos processos de replicação, transcrição, segregação e encapsulação do genoma. O complexo formado por E1-E2 se liga à ORI viral recrutando fatores de replicação da célula hospedeira que irão possibilitar a duplicação do DNA viral. O gene *E2* possui capacidade de regular a expressão dos genes do HPV, atuando como um repressor da transcrição gênica de *E6* e *E7* e, quando expressa em níveis muito elevados a proteína E2 é capaz de induzir a apoptose (GRAHAM S.V., 2010; RAJ *et al.*, 2004; SCHUCK *et al.*, 2013).

O gene *E4*, tem como função codificar uma proteína associada à maturação viral e à alteração da matriz intracelular (GRIFFIN *et al.* 2012; MORSHED *et al.*, 2014; EGAWA *et al.* 2015) Sendo assim, a E4 age na remodelação da rede de citoqueratina da célula infectada, facilitando a montagem e a maturação do vírus, podendo ser expressa em diferentes camadas do epitélio (OLIVEIRA *et al.* 2003; GOMES, 2012; LOPES, 2014; MORSHED *et al.*, 2014).

Com relação aos genes *E5*, *E6* e *E7*, muitos estudos já demonstraram que estes são essenciais para a formação de carcinomas HPV positivos (ESTEVÃO *et al.* 2019.). A infecção por HPVs de AR é responsável por regular as vias que promovem o desenvolvimento do câncer através desses três genes, *E5*, *E6* e *E7*. Dentre os eventos celulares de promoção do câncer destaca-se: (i) a manutenção da sinalização proliferativa através de *E5* e *E7* permitindo a imortalidade replicativa por meio de *E6*; (ii) a ativação de invasão e metástase via *E6*, além da desregulação na produção da energia celular mediada por *E6* e, (iii) a indução de angiogênese local por meio de *E6* e *E7*, através da desregulação das vias promotoras desse evento (RODEN *et al.* 2018).

A proteína *E5* tem sido considerada atualmente como uma oncoproteína, similar a *E6* e *E7* com papel na proliferação celular, pela sua capacidade de mimetizar a ação de fatores de crescimento. A *E5* é uma proteína transmembrana pequena, que se localiza no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi da célula hospedeira. Além disso, a *E5* também é responsável por modular diversos mecanismos do sistema imune, incluindo a apresentação de antígenos e a ação em vias inflamatórias (DOORBAR *et al.*, 2012; MORSHED *et al.*, 2014; DOORBAR *et al.*, 2015; WANG, X., *et al.*, 2018). Alguns trabalhos têm demonstrado sua importância na modulação e na transformação da célula, ou seja, cooperando com os genes *E6* e *E7* para a progressão da carcinogênese (ESTEVÃO *et al.* 2019.).

As proteínas *E6* e *E7* são responsáveis pela desregulação do ciclo celular através da interação e inativação de proteínas de genes supressores de tumor, favorecendo dessa forma a reprodução do vírus nas células do hospedeiro,

independente do seu grau de diferenciação (PAULINO-JÚNIOR *et al.*, 2011). Além disso, essas oncoproteínas interferem na síntese de DNA, devido à inativação de p53 e da proteína do retinoblastoma (pRb). A E6 interage com a proteína p53 mediante ligação com a proteína E6AP (do inglês *E6-Associated Protein*), que atua como supressor de tumor celular, levando à ubiquitinação e à rápida degradação de p53 nos proteossomos. A inativação de p53 acarreta o comprometimento de sua função, envolvida no controle do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose levando a célula à instabilidade genômica e a desenvolver mutações somáticas. A proteína E6 também é responsável por atuar no crescimento celular sem ancoragem à matriz extracelular, levando ao crescimento desordenado, e na ativação da telomerase o que promove a imortalização celular (PINTO & QUEIROZ, 2013; JIN & XU, 2015; LONGATTO FILHO *et al.*, 2015).

A oncoproteína E7 é conhecida pela sua capacidade de interação com uma grande diversidade de moléculas que estão envolvidas em diferentes vias celulares (ESTEVÃO *et al.* 2019.). A E7 está envolvida na evasão da vigilância imunológica do hospedeiro e, assim como a proteína E6, atua na transformação maligna e no crescimento celular independente de ancoragem à matriz extracelular. A E7 se liga à forma hipofosforilada da pRb, levando à alteração do complexo formado entre a pRb e o fator de transcrição E2F. Quando E2F está livre, ele é responsável pela estimulação da transcrição de genes que são necessários para a entrada na fase S do ciclo celular. Assim, a inativação de pRb por E7, acarreta a liberação da ação de E2F, que quando desregulada leva à consequente desregulação do ciclo celular e ao aumento da replicação do DNA (RAJ, *et al.*, 2004; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011; JIN & XU, 2015).

Portanto, as proteínas E6 e E7 atuam diretamente no processo de carcinogênese viral uma vez que são responsáveis por estimular a proliferação celular ao inativar p53 e a pRb, respectivamente (MORSHED *et al.*, 2014; EGAWA *et al.* 2015; DE SANJOSÉ *et al.* 2018).

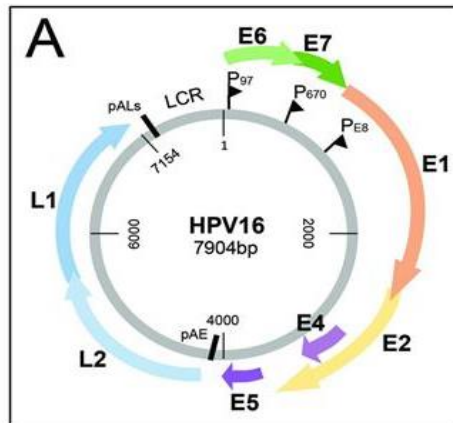


Figura 5: Representação esquemática do genoma do HPV 16. Os demais tipos de HPV apresentam genoma similar com uma região precoce representada na imagem em diferentes cores compostas pelos genes regulatórios *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*; uma região tardia que apresenta os genes *L1* e *L2* representados em azul na imagem, e por último, representado de cinza, a região reguladora longa (LCR – do inglês *Long Control Region*). Fonte: Adaptado de GRAHAM, 2017.

1.3.1. Classificação dos HPVs

Os Papilomavírus apresentam como característica de extrema importância a restrição de hospedeiro específica ao tipo e o tropismo por células epiteliais, de forma que os diferentes tipos de HPV são capazes de infectar apenas células humanas. Além disso, os tipos específicos de papilomavírus apresentam tropismo diferentes, onde causam lesões com patologias clínicas distintas (Doorbar *et al.*, 2015; Egawa *et al.* 2015). Os HPVs infectam tanto as mucosas quanto os tecidos cutâneos e são classificados de acordo com o seu tropismo como cutaneotrópicos e mucosotrópicos (CRISH *et al.*, 2000; ZUMBACH 2000; SILVA *et al.*, 2002).

Estudos anteriores descreveram que atualmente existem cerca de 200 tipos de HPV que podem ser divididos em: (i) HPVs de baixo-risco (BR), que estão associados às verrugas genitais e às Lesões Intraepiteliais de Baixo-Grau (LBG/NIC I) - os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 e 72; e (ii) HPVs de alto-risco (AR), relacionados às lesões de Alto-Grau (LAG/NIC II e NIC III) e ao câncer cervical - os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 e 68 (revisão em VILLIERS *et al.*, 2004; ALEYO CHABEDA, 2017).

Acredita-se que essa força de indução ao câncer pode ser explicada pela forma como as oncoproteínas dos diferentes tipos virais, atuam no posicionamento e na regulação do promotor, bem como nos padrões de “*splicing*” do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) e pela capacidade de tipos virais distintos se integrar ao genoma do hospedeiro. Essas diferenças alteram a expressão dos genes *E6* e *E7* responsáveis por codificar as principais oncoproteínas virais, levando a um aumento

da gravidade da lesão e de suas chances de progressão (DOORBAR *et al.*, 2012; EGAWA & DOORBAR, 2017).

Já é bem estabelecida na literatura a associação dos HPVs de AR com o câncer do colo do útero. Como consequência, o teste de detecção do DNA do HPV na triagem cervical e a utilização de vacinas profiláticas contra os HPVs 16 e 18, - os principais tipos de Papilomavírus responsáveis pelo câncer do colo do útero - foram implementados na prática clínica para auxiliar na prevenção dessa Patologia (ZUR HAUSEN, 2009; DE SANJOSÉ *et al.* 2018). Por outro lado, os tipos de HPVs de BR que abrangem a maioria dos Papilomavírus conhecidos são responsáveis por causar lesões hiper-proliferativas benignas, e raramente são uma causa frequente de carcinoma maligno (EGAWA & DOORBAR, 2017).

Atualmente, sabe-se que a progressão de Lesões Intraepiteliais cervicais ao carcinoma é baseada na infecção persistente por HPVs de AR. A persistência das infecções está associada à carga viral, à deficiência da resposta imunológica, à exposição a fatores mutagênicos, entre outros elementos que podem permitir a evolução de uma lesão de baixo grau (LBG) à lesão de alto grau (LAG) até alcançar o estágio de câncer cervical (DOORBAR *et al.*, 2015; EGAWA *et al.* 2015; EGAWA & DOORBAR, 2017). Assim, os eventos mais importantes na progressão das lesões cervicais podem ser resultado de uma desregulação na expressão das oncoproteínas transformantes E6 e E7, que levam ao aumento da proliferação celular nas camadas inferiores do epitélio, e conseqüentemente, na incapacidade do sistema de reparo em corrigir corretamente os danos sofridos pelo DNA celular (DOEBERITZ, 2002; MATTHEWS *et al.*, 2003; PATEL & CHIPLUNKAR, 2009).

1.3.2. O Ciclo de Vida do HPV

Como ressaltado, os HPVs apresentam tropismo por células epiteliais, e assim dependem da diferenciação desse tipo celular para a sua reprodução. O ciclo de vida do HPV tem início na camada basal do epitélio estratificado escamoso que reveste a ectocérvice uterina, pela infecção do vírus às células basais e parabasais do epitélio cervical, e seguindo em direção ao topo do epitélio (Figura 6).

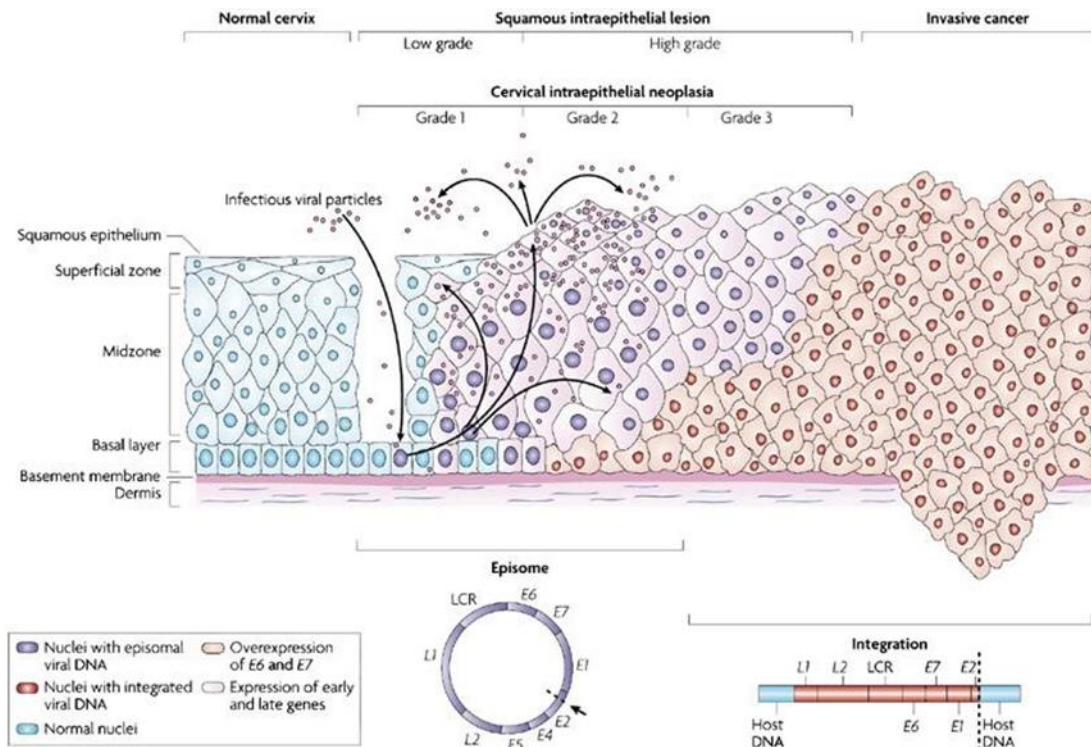
Para que o HPV consiga alcançar as células da camada basal e dar início à infecção, é necessário que ocorra a perda da integridade do epitélio por meio de fissuras ou micro-lesões neste epitélio que podem ser promovidas pelo ato sexual, facilitando assim, a penetração das partículas virais. À medida que se inicia a divisão celular, as células basais que têm a função de repopulação do epitélio agora infectado, produzem novas células que vão posteriormente se diferenciar carregando

no seu interior partículas virais ou cópias do genoma do HPV. Além disso, as células carregando partículas do HPV que permanecerão na camada basal do epitélio irão constituir um reservatório permanente do vírus, determinando assim a cronificação da infecção (ZUR HAUSEN, 2000; TYRING, 2000; DOORBAR, 2005; DURZYNSKA *et al.*, 2017; IARC, 2019a).

A internalização do vírus é um processo lento e complexo que pode durar horas, e no caso de alguns tipos de HPVs como os tipos 16 e 31, essa internalização se dá por endocitose mediada por Clatrina e por Caveolina, respectivamente (BOUSARGHIN *et al.*, 2003). A perda do capsídeo viral dentro da célula do hospedeiro permite que o DNA do vírus seja transportado para o núcleo dessas células, onde irá sofrer a ação de fatores nucleares da célula hospedeira, que interagem com a região LCR do vírus, ativando a replicação e a transcrição virais. No início da infecção o genoma viral será mantido sob a forma de DNA episomal abrangendo aproximadamente 50 a 100 cópias por célula após a replicação viral (HUBERT & LAIMINS, 2002; ZUR HAUSEN, 2000 e 2002; DOORBAR, 2012, HORVATH *et al.*, 2010).

Após essa fase de latência, o HPV pode iniciar a fase produtiva da infecção, ativando a maquinaria do hospedeiro para permitir a proliferação viral. Os Papilomavírus devem replicar o seu genoma e empacotá-lo em partículas virais, para que assim possam produzir novos vírions infecciosos. Essa replicação ocorre nas células em proliferação geralmente presentes na camada basal do epitélio, sendo necessária a expressão das proteínas E4 e E5 cujas funções na replicação não estão bem definidas. Para que a replicação viral ocorra é necessária a ligação de E2 à região regulatória do DNA viral (LCR), assim como o recrutamento mediado por E2 para a ORI viral, da proteína E1 que atua como uma helicase (ZUR-HAUSEN, 2000; DOORBAR *et al.*, 2012; DOORBAR *et al.*, 2015). Durante a fase produtiva a expressão de E6 e E7 é mantida, havendo conseqüentemente um aumento da expressão dos genes tardios *L1* e *L2* para a formação de vírions nas células sob diferenciação. Adicionalmente, ocorre aumento da produção de E1 e E2 para que possa haver um aumento do número de cópias virais (HUBERT & LAIMINS, 2002; DOORBAR *et al.*, 2012; LOPES, 2014; EGAWA *et al.* 2015; MORGAN *et al.*, 2017).

Para que a produção de partículas virais seja efetuada, a proteína L2 que é a proteína secundária, e a proteína L1 que é a proteína principal do capsídeo são produzidas, assim que a replicação do genoma viral é finalizada. Assim, L1 e L2 são produzidas nas camadas médias ou superficiais do epitélio infectado, e as partículas virais são formadas e liberadas somente quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio (ZUR-HAUSEN 2000 e 2002; DOORBAR, 2005).



Nature Reviews | Cancer

Figura 6: Esquema do ciclo de vida do HPV. O papilomavírus humano (HPV) atinge as células basais do epitélio escamoso cervical através de micro-lesões. Após a infecção, os genes precoces do HPV *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7* são expressos e se inicia a replicação do DNA viral episossomal (núcleos roxos). Nas camadas superiores do epitélio, o genoma viral é replicado ainda mais, e os genes tardios *L1* e *L2* são expressos para a formação do capsídeo e conseqüentemente das partículas virais que irão infectar novas células. Lesões Intraepiteliais de baixo-grau (NIC I) suportam a replicação viral produtiva. No entanto, algumas lesões ancoradas a infecções por HPV de alto-risco progridem para Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto-grau (NIC II e III). A progressão de Lesões Intraepiteliais não tratadas para o câncer invasivo está associada à integração do genoma do HPV nos cromossomos da célula hospedeira (núcleos vermelhos), com perda de *E2* e o aumento subsequente da expressão de *E6* e *E7*. Fonte: Adaptado de Woodman, C. *et al.*, 2007.

1.4. Lesões Precursoras do Câncer de Colo Útero

O câncer do colo uterino normalmente aparece após uma longa fase de doença pré-invasiva, que correspondem às lesões precursoras do câncer cervical. Essas lesões que ocorrem antes do câncer invasivo são caracterizadas microscopicamente como resultado de uma série de eventos, que progridem desde a atipia celular até vários graus de displasia (MARTIN & O'LEARY 2011).

As Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs) são lesões proliferativas que apresentam células com diferentes graus de atipias e maturações anormais, que podem estar presentes em parte ou em toda a espessura do epitélio escamoso cervical. De acordo com a classificação Citológica de Bethesda, as lesões mais simples ou de baixo-grau são classificadas na Citologia como Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau – LGB (LSIL, sigla inglesa para *Low-grade Squamous*

Intraepithelial Lesion), e de acordo com a classificação histológica as LGB correspondem à Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau I (NIC I). Já as lesões cervicais de alto-grau, as Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau – LAG (HSIL, sigla inglesa para *High-grade squamous Intraepithelial Lesion*) são classificadas pela Histopatologia em Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau II (NIC II) e grau III (NIC III) (PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011).

Segundo critérios histológicos, a classificação das NICs em graus I, II e III depende da proporção de células maduras e diferenciadas presente na espessura do epitélio cervical (Figura 7). Sendo assim, são consideradas lesões de NIC I aquelas que apresentam células neoplásicas indiferenciadas, localizadas no primeiro terço inferior do epitélio escamoso, ou seja, próximo à camada basal (Figura 7B). Lesões classificadas como NIC II possuem células alteradas que ocupam os dois terços inferiores desse epitélio (Figura 7C). Quando há presença de graus mais severos de NIC, temos proporção maior de células indiferenciadas na espessura do epitélio, com a camada superficial delgada composta por células maduras e diferenciadas (AIDÉ *et al.* 2009; IARC, 2019b). Portanto em NIC III, as células atípicas comprometem acima de dois terços ou toda a espessura do epitélio (Figura 7D). Uma vez que essas lesões invadem o estroma do tecido, temos o surgimento do Carcinoma cervical (Figura 7E).

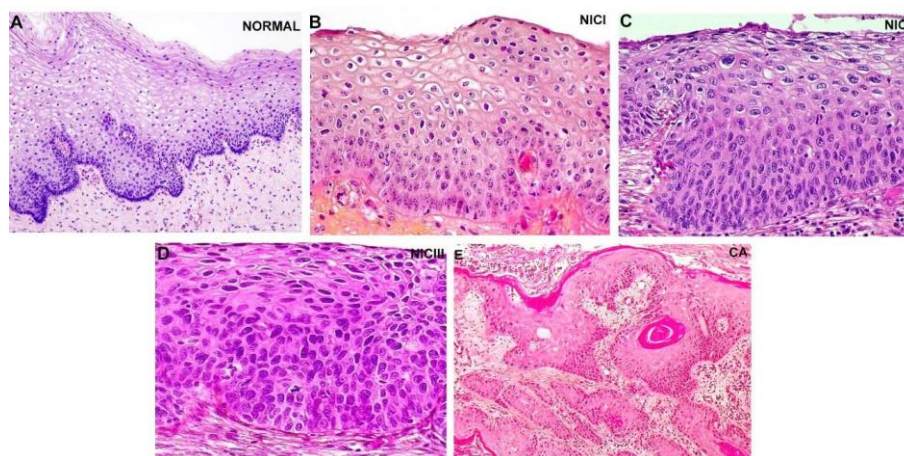


Figura 7: Imagens de cortes histológicos do tecido cervical corados por HE (Hematoxilina e Eosina). Na primeira imagem A, observa-se o epitélio cervical normal composto por camadas basais e parabasais contendo células epiteliais imaturas sem alterações, e camada superficial com células diferenciadas normais. No corte histológico B, observa-se a presença de lesão que acomete um terço da espessura do epitélio e apresentando células indiferenciadas principalmente próximas à camada basal do epitélio, caracterizando uma lesão de NIC I. Em C, a lesão é classificada como NIC II, uma vez que compromete os dois terços inferiores do epitélio, e ainda é possível observar anormalidades nucleares mais evidentes do que as vistas em NIC I. No corte representado em D, temos uma lesão classificada como NIC III que está presente em toda a extensão do epitélio, no qual observa-se a presença significativa de anormalidades nucleares e perda de polaridade celular. Na imagem E, há um corte histológico de Carcinoma cervical com células com diferentes graus de diferenciação e formando ninhos sólidos. Além disso, observa-se uma grande infiltração das massas tumorais no estroma no tecido e a presença de infiltrados inflamatórios. Coloração de HE. Em A: aumento de 40X, B: aumento de 400X, C-E: aumento de 100X. Fonte: Adaptado de Anatomia Patológica UNICAMP 2019; IARC 2019b.

As Lesões Intraepiteliais Escamosas podem regredir, persistir ou progredir, dependendo da resposta imune de cada paciente (GRAVITT, 2011). Muitos trabalhos têm demonstrado resultados de regressão, persistência e progressão dessas lesões Intraepiteliais cervicais (OSTÖR, 1993; COLIE *et al.* 2018, TAINIO *et al.*, 2018, ZHANG & LU, 2019). Lesões menos graves como a NIC I regredem espontaneamente na maioria dos casos; porém lesões de alto grau (NIC II ou NIC III) possuem chances maiores de progressão ao câncer cervical (ZHANG & LU, 2019). Aproximadamente 20% das NICs I progridem para NIC II, 30% destas lesões irão progredir para NICIII e 40% dessas lesões irão progredir ao câncer invasivo (MELNIKOW *et al.*, 1998; ZUR-HAUSEN 2002; MOSCICKI *et al.*, 2004; PETO *et al.*, 2004).

Diferentes estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos, foram dedicados à elucidação dos fatores de risco associados à patologia do câncer cervical. E atualmente sabe-se, que a infecção persistente por tipos oncogênicos de HPVs e a carga viral representam fatores de risco essenciais para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (BOSCH & MUÑOZ, 2002; BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002; ZUR HAUSEN, 2009). As taxas de frequência dos HPVs de AR entre as mulheres diferem de acordo com os países e etnias, além de serem dependentes de fatores socioeconômicos. No entanto, os HPVs 16 e 18 são os mais prevalentes e contribuem aproximadamente com 70% de todos os casos de CCU, entre 41%-67% de lesões de alto grau (NIC II e III) e entre 16-32% de lesões de baixo grau (NIC I) (CLIFFORD *et al.*, 2006; WANG, X. *et al.*, 2018; BRUNI *et al.*, 2019). Sabe-se que o HPV16 é responsável por pelo menos 50% dos casos de carcinoma cervical. Mas há outros tipos de HPVs de AR que também estão relacionados com esse tipo de câncer como os 31, 33, 35, 45, 52 e 58; estes representam mundialmente acima de 20% das neoplasias do colo do útero (CLIFFORD *et al.*, 2006; WANG, X. *et al.*, 2018). Com relação aos HPVs de BR oncogênico, os tipos mais prevalentes são os HPVs 6 e 11 que são frequentemente encontrados em cerca de 90% dos condilomas acuminados (HAWKINS *et al.*, 2013; PINTO & QUEIROZ, 2013).

Outros fatores como a presença de múltiplos parceiros sexuais, o tabagismo, a multiparidade, o uso de anticoncepcionais orais e o comprometimento do sistema imune podem levar a um aumento na probabilidade de progressão das lesões pré-cancerígenas ao carcinoma invasor (BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002, KASAP *et al.*, 2011; BOSCH *et al.*, 2013). De fato, o modelo atualmente mais aceito para a progressão de lesões Intraepiteliais cervicais ao carcinoma é baseado na infecção e persistência de HPVs de AR, que associadas à

deficiência imunológica e à exposição a fatores mutagênicos (que elevariam a atividade de genes virais como *E6* e *E7*), poderiam causar a progressão das LSIL para as HSIL e dessas lesões ao câncer invasor (ZUR-HAUSEN, 2002; KASAP *et al.*, 2011; HIBMA *et al.*, 2012).

1.5. O Câncer do Colo do Útero

A integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro é um dos principais fatores para o desenvolvimento do carcinoma cervical, uma vez que há a perda de controle do ciclo celular devido ao aumento da expressão dos genes *E6* e *E7* (GAO *et al.*, 2011; PAULINO JÚNIOR *et al.*, 2011; MOTEVASELI *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; TAN & ANKATHIL *et al.* 2015; GRAHAM, 2017; GROVES & COLEMAN, 2018). Durante qualquer fase do processo infeccioso pode ocorrer a integração do genoma do HPV. Assim, sua detecção se dá em lesões pré-malignas, mas a quantidade de células contendo o DNA do HPV integrado aumenta de acordo com a progressão das lesões ao câncer (SHUKLA *et al.*, 2014). Sabe-se que grande parte dos Carcinomas cervicais (aproximadamente 90% dos casos) apresenta o genoma dos HPVs de AR integrado ao DNA celular (PINTO & QUEIROZ, 2013).

Com relação à infecção persistente, observa-se que a maior parte das infecções por HPV são transitórias. No entanto, estima-se que 20% das mulheres e 6% dos homens desenvolvem infecção persistente pelo HPV levando à progressão da doença (GIULIANO *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.* 2013; SHANMUGASUNDARAM & YOU, 2017). Alguns trabalhos descrevem outros fatores que estão relacionados à persistência viral como o tabagismo (HAUKIOJA *et al.*, 2014), o consumo elevado de bebidas alcoólicas (OH *et al.* 2014), o uso de contraceptivos orais, a susceptibilidade genética (WANG S. & HILDESHEIM, 2003; MOSCICKI *et al.* 2012), os mecanismos de evasão à resposta imune (STERN, 2005; HERNANDEZ-MONTES *et al.*, 2012) e a infecção por múltiplos tipos de HPV (MIRANDA *et al.*, 2013; WEELE *et al.*, 2016).

A carga viral do HPV pode estar diretamente associada com a carcinogênese, sabe-se que a presença de alta carga viral de HPVs de AR oncogênico está relacionada com maiores taxas de persistência viral, com o surgimento das lesões pré-cancerígenas, com o aumento das proteínas virais oncogênicas, com o aumento da probabilidade de integração do DNA viral. Portanto, todos esses fatores podem favorecer a progressão das Lesões Intraepiteliais Cervicais para o CCU (MÄNNIK *et al.*, 2002; KADAJA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; NACHAJOVA *et al.*, 2015; WEELE, *et al.*, 2016).

A carga viral do HPV pode estar diretamente associada com a carcinogênese. No estudo desenvolvido por Dong e colaboradores (2018) a carga viral dos HPVs 16, 31, 33, 52 e 58 foi relacionada à severidade das lesões cervicais. No entanto para os HPVs dos tipos 18, 45, 56 e 59 não foi observada correlação entre a carga viral e o agravamento das lesões (DONG, *et al.*, 2018). Sabe-se que a presença de alta carga viral de HPVs de AR oncogênico está relacionada com maiores taxas de persistência viral, com o surgimento das lesões pré-neoplásicas, com o aumento das proteínas virais oncogênicas e com o aumento da probabilidade de integração do DNA viral. Portanto, todos esses fatores podem favorecer a progressão das Lesões Intraepiteliais Cervicais para o CCU (MÄNNIK *et al.*, 2002; KADAJA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; NACHAJOVA *et al.*, 2015; WEELE, *et al.*, 2016).

1.5.1. Estadiamento do Câncer do Colo do Útero

O sistema de estadiamento FIGO ou Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (sigla inglesa para *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) é usado com mais frequência para a classificação de cânceres dos órgãos reprodutivos femininos, incluindo o Câncer Cervical (*American Cancer Society*, 2020). A finalidade desse sistema de estadiamento é estabelecer um grande banco de dados para estudo, sendo baseado no uso de critérios diagnósticos universais (RAMIREZ *et al.*, 2017).

O estágio clínico é definido com base nos resultados do exame físico realizado pelo médico, de biópsias, de exames de imagem e alguns outros exames realizados, como cistoscopia e proctoscopia. O sistema de estadiamento do CCU não é baseado nos achados obtidos durante a realização de alguma eventual cirurgia. No entanto, se a cirurgia for realizada, um estágio patológico pode ser determinado a partir dos achados no processo cirúrgico, mas esse fato não altera seu estágio clínico (*American Cancer Society*, 2020).

O CCU pode atingir toda a extensão direta no peritônio, vagina, útero e órgãos adjacentes, como bexiga e reto. Além disso, esse tipo de tumor pode se espalhar ao longo dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais. O estadiamento da FIGO era baseado principalmente em dados obtidos no exame clínico, podendo ser alterado apenas pela adição de alguns procedimentos permitidos pela FIGO. Contudo, no ano de 2018, o Comitê de Oncologia Ginecológica da FIGO revisou como deveriam ser os critérios e/ou procedimentos para o estabelecimento dos estágios do CCU, e passou a permitir que resultados de exames de imagem e patológicos, quando disponíveis, poderiam atribuir o estágio clínico do tumor (BHATLA *et al.*, 2018).

Os estágios do CCU variam de I a IV, e como regra, quanto menor o número, menor a extensão do câncer, enquanto um número maior (estágio IV) determina a presença de um câncer mais avançado. Além disso, dentro de um estágio, uma letra anterior significa um estágio inferior (Tabela 1). Destaca-se que os cânceres que são classificados como apresentando estágios semelhantes geralmente são tratados segundo o mesmo protocolo (*American Cancer Society, 2020; BHATLA et al., 2018*).

Tabela 1 – Estadiamento da FIGO para o Câncer do colo do útero (2018)

Etapa	Descrição
I	O carcinoma é estritamente confinado ao colo do útero (a extensão do corpo uterino deve ser desconsiderada);
IA	Carcinoma invasivo que pode ser diagnosticado apenas por microscopia, com profundidade máxima de invasão <5 mm;
IA1	Invasão estromal medida <3 mm em profundidade;
IA2	Invasão estromal medida ≥3 mm e <5 mm em profundidade;
IB	Carcinoma invasivo com invasão mais profunda medida ≥5 mm (maior que no estágio IA), lesão limitada ao colo uterino;
IB1	Carcinoma invasivo ≥5 mm de profundidade de invasão estromal e <2 cm na maior dimensão;
IB2	Carcinoma invasivo ≥2 cm e <4 cm na maior dimensão;
IB3	Carcinoma invasivo ≥4 cm na maior dimensão;
II	O carcinoma invade além do útero, mas não se estende para o terço inferior da vagina ou para a parede pélvica;
IIA	Envolvimento limitado aos dois terços superiores da vagina sem envolvimento parametrial;
IIA1	Carcinoma invasivo <4 cm na maior dimensão;
IIA2	Carcinoma invasivo ≥4 cm na maior dimensão;
IIB	Com envolvimento parametrial, mas não até a parede pélvica;
III	O carcinoma envolve o terço inferior da vagina e/ou se estende até a parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante e/ou envolve linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos.
IIIA	O carcinoma envolve o terço inferior da vagina, sem extensão da parede pélvica.
IIIB	Extensão da parede pélvica e / ou hidronefrose ou rim não funcionante (a menos que se saiba que é devido a outra causa);
IIIC	Envolvimento dos linfonodos pélvicos e / ou para-aórticos, independentemente do tamanho e extensão do tumor;
IIIC1	Apenas metástases nos linfonodos pélvicos;
IIIC2	Metástase de linfonodos para-aórticos;
IV	O carcinoma se estendeu além da pelve verdadeira ou envolve (comprovada biópsia) a mucosa da bexiga ou do reto. (Um edema bolhoso, não permite que um caso seja alocado no estágio IV).
IVA	Espalhe para os órgãos pélvicos adjacentes
IVB	Espalhe para órgãos distantes

Legenda: Estadiamento FIGO de câncer do colo do útero. Fonte: Adaptado de BHATLA, N. *et al.*, 2018.

1.5.2. Classificação histopatológica do Câncer do Colo do Útero

Existem três tipos de carcinoma que acometem o colo do útero - o carcinoma de células escamosas (CCE) invasor, o adenocarcinoma e o carcinoma neuroendócrino; o CCE é o tipo mais comum correspondendo a cerca de 90% de todas as neoplasias cervicais (ROSAI, 2004). Microscopicamente, grande parte dos carcinomas de células escamosas apresenta células neoplásicas com variação no padrão de crescimento, tipo de células e grau de diferenciação. As células malignas presentes no estroma do tecido lesionado são subdivididas em dois tipos, queratinizadas e não-queratinizadas. Além disso, o CCU é classificado histopatologicamente quanto ao seu grau de diferenciação em: (i) Carcinoma de células escamosas bem diferenciado (CCEB); (ii) Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM); (iii) Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP) (Figura 8). Aproximadamente 50% a 60% dos carcinomas são classificados como moderadamente diferenciados e o restante são distribuídos igualmente entre as categorias pouco e bem diferenciados (SELLORS *et al.*, 2004).

O carcinoma escamoso queratinizado bem diferenciado (grau I) tem como característica a formação de pérolas de queratina (Figura 8A). A formação de queratina é a característica predominante desses tumores, que são compostos de células cancerígenas escamosas típicas (KOSS, 2006). Morrison e colaboradores (2001) descreveram esse tipo raro de tumor, e observaram que carcinomas com essas características apresentavam comportamento agressivo e falta de associação com o HPV. Embora esse tipo de lesão possa ser profundamente invasivo, raramente induzem a formação de metástases, e seguem um curso relativamente benigno após o tratamento. As células tumorais de carcinomas de grau I mostram apenas pequenas anormalidades nucleares.

O carcinoma de células escamosas invasor do colo uterino moderadamente diferenciado (grau II) (Figura 8B) é derivado de lesões de alto grau do tipo metaplásicas. Esses tumores são compostos por células cancerígenas de aparência relativamente semelhante, mas geralmente esse tipo de carcinoma contém focos de câncer escamoso queratinizante que não eram evidentes na lesão precursora (KOSS, 2006). Os tumores moderadamente diferenciados apresentam um grau de diferenciação intermediário entre os carcinomas bem e os pouco diferenciados (BRAMBS *et al.*, 2019).

Com relação ao carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (grau III), sabe-se que esse tumor é derivado de lesões precursoras compostas por células

pequenas (Figura 8C). As células tumorais geralmente estão dispostas em ninhos que podem ser separados por septos do tecido conjuntivo, ou podem estar infiltrados de forma difusa no estroma (KOSS, 2006).

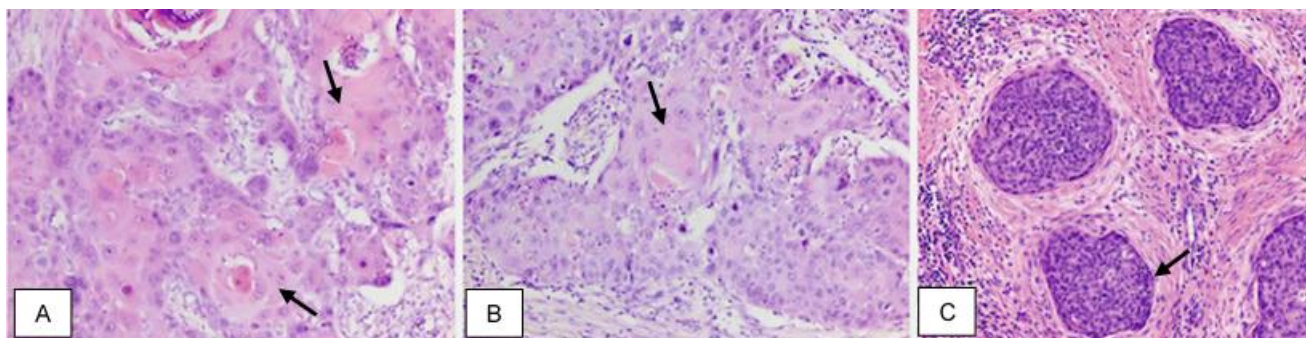


Figura 8: Imagens capturadas de Carcinomas de células escamosas do colo do útero de diferentes graus corados por Hematoxilina e Eosina. No corte histológico A, observa-se o Carcinoma de células escamosas bem diferenciado apresentando ninhos de células tumorais com características de queratinização facilmente visíveis (setas). No corte representado em B há o Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado apresentando um grau de diferenciação intermediário com queratinização focal dentro das células tumorais (seta). Na imagem C, o Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado possui ninhos de células tumorais, no estroma do tecido, com características escamosas sem queratinização e infiltrado inflamatório evidente. Coloração de HE. Em A: aumento de 100X, B: aumento de 100X, C: aumento de 40X. Fonte: Adaptado de BRAMBS, *et al.*, 2019.

1.6. Desenvolvimento de Biomarcadores

A definição de biomarcador é dada como qualquer parâmetro biológico que possa ser mensurado e avaliado com precisão, e que seja capaz de refletir processos biológicos normais ou patogênicos (STRIMBU & TAVEL, 2010). O desenvolvimento de biomarcadores além de ser destinado às atualizações terapêuticas, também é focado no aprimoramento de métodos que permitam avaliar o risco de um indivíduo desenvolver o câncer, e detectar ainda em estágios iniciais diferentes tipos de tumores, para que esses ainda possam ser tratados em tempo hábil e de forma mais eficaz (DASARI *et al.*, 2015).

Os biomarcadores são moléculas relacionadas: (i) a sinalização celular; (ii) a regulação da expressão gênica via modulação por miRNAs (BEN *et al.*, 2015); (iii) a proliferação celular, como o antígeno de proliferação Ki-67 (AHMED *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2015); (iv) ao controle da duplicação do DNA, como as proteínas de manutenção de minicromossomos ou MCMs (*Minichromosome Maintenance Proteins*) de 2 a 7 (LOBATO *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2013; ZHANG, J. *et al.*, 2013); e (v) ao controle da atividade do ciclo celular, como as proteínas regulatórias p16INK4a, p53, p21 e p27 (VAN DE PUTTE *et al.*, 2003; JIN & XU, 2015; LONGATTO FILHO *et al.* 2015; TAN & ANKATHIL *et al.* 2015).

Os biomarcadores de prognóstico têm como objetivo identificar a probabilidade de ocorrência de um evento clínico, recidiva ou progressão de alguma

doença em pacientes com uma condição médica de interesse. Além disso, esses biomarcadores são especialmente importantes para se prever o risco de um evento, ou um prognóstico reservado de um dado paciente (CALIFF *et al.*, 2018). Na literatura há diversos trabalhos que foram direcionados ao desenvolvimento de biomarcadores de prognóstico em diversos tipos de câncer como: (i) a glicoproteína PDL1 no adenocarcinoma de pulmão e no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (SHINCHI *et al.*, 2019; MULLER *et al.*, 2017); (ii) da ciclina-D1 e do fator de crescimento VEGF-A no carcinoma de língua (ALMANGUSH *et al.*, 2017); e (iii) das proteínas p53 e p16 no câncer de vulva (SAND *et al.*, 2018).

Alguns estudos têm destacado o papel das proteínas MCMs como biomarcadores de prognóstico do câncer. No trabalho de KWOK e colaboradores (2014) observou-se que o uso combinado da imunomarcção das proteínas MCM2-7 constitui um novo potencial indicador preditivo e de prognóstico para pacientes com câncer de mama. Além disso, o estudo desenvolvido por QU e colaboradores (2017) sugere que a via MCM7 – ciclina D1 participa da progressão tumoral no carcinoma hepatocelular, e, portanto, tais proteínas poderiam ser utilizadas como um biomarcador para o prognóstico desse tipo de carcinoma. Verificou-se nesse estudo, que a expressão elevada de MCM7 e da ciclina D1 apresentou sensibilidade e especificidade relativamente altas, na predição de pior prognóstico dos pacientes com carcinoma hepatocelular (HCC).

A capacidade de proliferação das células tumorais é um aspecto fundamental de tumores em progressão e em crescimento. Dessa forma, a medida da estimativa da proliferação celular oferece aos patologistas e clínicos informações mais objetivas para o diagnóstico e o prognóstico das neoplasias (HALL & LEVISON, 1990; QUINN & WRIGHT, 1990; ALISON *et al.*, 2002; BAAK *et al.*, 2006). Existem muitas maneiras de se aferir os níveis de proliferação celular em tecidos processados, mas a técnica de escolha para esse fim consiste na análise Imuno-histoquímica (IHQ) de marcadores de proliferação como PCNA e Ki-67 (FREEMAN *et al.*, 1999; KEATING *et al.*, 2001; AGOFF *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; PAN *et al.*, 2015). Dessa forma, a análise de marcadores diretamente envolvidos com a replicação do DNA, pode representar uma maneira mais precisa para se avaliar a capacidade proliferativa de células displásicas e neoplásicas.

1.7. As Proteínas de Manutenção de Minicromossomo

A manutenção da integridade genética de todos os organismos é profundamente dependente da duplicação do DNA de maneira completa e fiel, evento esse iniciado em células eucarióticas, em centenas a milhares de elementos

cromossomais denominados de — Origens de Replicação (ORI). Essas sequências direcionam a associação de complexos de multi-proteínas que formarão duas forquilhas de replicação que atuarão em direções opostas em cada origem de replicação (BELL, 1995; MAIORANO, *et al.*, 2000; DHAR, *et al.*, 2001; revisão em BELL & DUTTA, 2002; OEHLMANN, *et al.*, 2004; BLOW & DUTTA 2005; ALBERTS, 2010; PARKER, 2017).

As Proteínas de Manutenção de Minicromossomos (MCM) são um grupo de proteínas pertencentes à Super - Família (SF6) de helicases, que são essenciais para o licenciamento da replicação do DNA e para o controle do ciclo celular (LUO, 2011; DAS *et al.*, 2013; NEVES & KWOK, 2017; PARKER, 2017; ISHIMI, 2018).

Atualmente são conhecidas seis proteínas MCMs (MCM 2-7) que formam em conjunto um anel em volta do DNA e agem como helicases do DNA, desenrolando a fita dupla quando a síntese de DNA começa, ao mesmo tempo em que as forquilhas de replicação bidirecionais se afastam da Origem de Replicação (ORI) (Figura 9). Assim, embora cada uma das MCMs seja altamente relacionada uma com a outra, elas apresentam sequência única que as diferenciam (ALBERTS, 2010; revisão em BELL & DUTTA, 2002; BLOW & DUTTA 2005; DAS *et al.*, 2013; NEVES & KWOK, 2017; PARKER, 2017; ISHIMI, 2018).

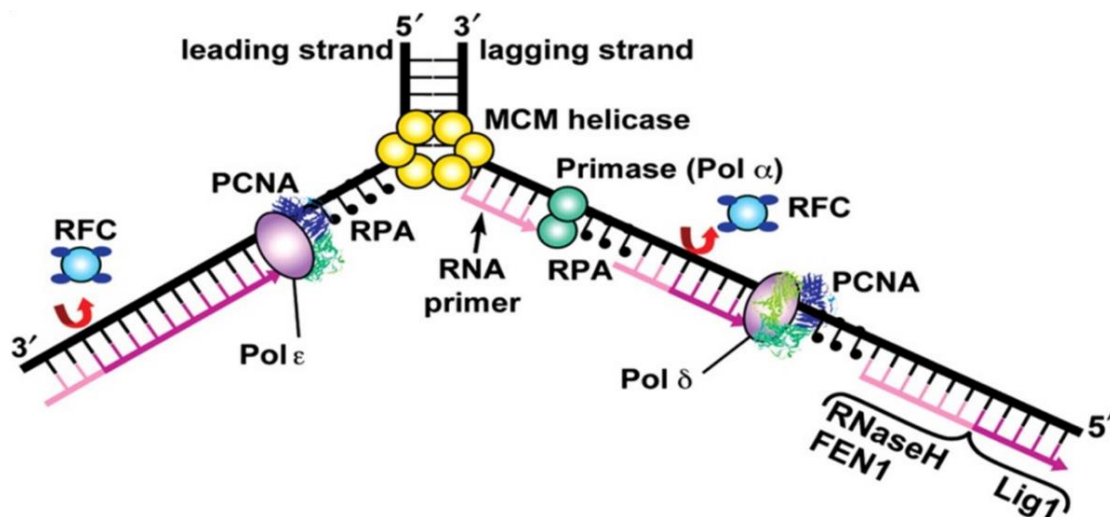


Figura 9: Esquema da dupla fita de DNA no qual é mostrada a forquilha de Replicação que surge a partir de uma ORI eucariota. Destaca-se a presença de várias subunidades da DNA Polimerase (α , δ , ϵ), de fatores de Replicação (RFC, RPA, PCNA), além de um complexo de proteínas MCM formando uma estrutura em forma de anel (amarelo). Fonte: BELL, 1995; MAIORANO, *et al.*, 2000; DHAR *et al.*, 2001; ALBERTS 2010; PARKER 2017; revisão em BELL & DUTTA, 2002; OEHLMANN, *et al.*, 2004; BLOW & DUTTA 2005).

1.7.1. Licenciamento e Duplicação do DNA

A duplicação do genoma é de extrema importância na manutenção da integridade genômica de cada espécie, e particularmente importante para os organismos multicelulares. Para que a duplicação ocorra de maneira efetiva é importante que o genoma inteiro seja duplicado uma única vez a cada etapa da divisão celular, e posteriormente segregado para as células filhas. As ORI são utilizadas pelas células eucarióticas para permitir que o genoma seja completamente replicado, e são sítios do genoma extremamente regulados para garantir que o DNA seja replicado apenas uma vez a cada etapa do ciclo celular (revisão em BELL & DUTTA, 2002; BLOW & DUTTA, 2005; NEVES & KWOK, 2017; PARKER, 2017; ISHIMI, 2018). Estudos baseados em experimentos *in-vitro* foram realizados para elucidar de que maneira a célula seria capaz de distinguir se segmentos do DNA já haviam sido replicados ou não. Essa análise foi realizada em ovócitos de *Xenopus*, nos quais se observa a utilização das ORI durante a rápida duplicação do DNA. Assim, foi demonstrado que ao final da fase G1, essas origens de Replicação se encontravam em um **estado licenciado** para a replicação. No entanto, após a finalização da fase S, esse estado era convertido para **não-licenciado** (GILLESPIE *et al.*, 2001). Com base nesses resultados foi proposto um modelo de licenciamento da duplicação do DNA no qual: (i) as ORI são licenciadas por complexos de MCMs (2 a 7) que se ligam nas origens durante a fase G1; (ii) a ligação do complexo MCM2-7 às ORIs é fundamental para que estas se tornem aptas para formar as duas forquilhas de replicação, e conseqüentemente, se **tornarem licenciadas** para que ocorra a duplicação do DNA; (iii) tanto a ligação do complexo MCM2-7 às ORIs quanto o licenciamento devem acontecer no final da fase M e no início da fase G1 do ciclo celular; (iv) as MCMs (2 a 7) se dissociam das ORI assim que a duplicação começa, e isso provavelmente acontece porque as MCMs são responsáveis por atuar principalmente na forquilha de replicação (BLOW & HODGSON, 2002; BLOW & DUTTA, 2005).

Além de terem grande importância no estabelecimento da forquilha de replicação, as MCMs também apresentam função na progressão dessa forquilha (SCHWACHA & BELL, 2001). Estudos prévios também demonstraram que a inibição da função do complexo MCM2-7 durante a fase S causava uma rápida interrupção da síntese do DNA (APARÍCIO *et al.*, 1997). Assim, foi possível concluir que o complexo MCM formado pelas suas subunidades atuaria como uma DNA helicase responsável pelo desenrolamento da dupla hélice, sendo esse complexo removido do DNA pelo próprio movimento da forquilha de Replicação. O deslocamento do

complexo MCM2-7 do DNA recém-replicado é considerado o aspecto central do **modelo de licenciamento** da duplicação do DNA (BLOW & DUTTA, 2005).

A análise por cristalografia de Raio-X do domínio N-terminal de MCMs da archaeobactéria *M. thermoautotrophicum*, revelou a formação de uma estrutura em forma de noz que apresenta um canal central carregado positivamente (ADACHI *et al.*, 1997; FLETCHER *et al.*, 2003). Essa estrutura está relacionada à função de licenciamento do DNA das proteínas MCM, devido ao fato de que, por meio da estrutura em forma de noz/anel, o complexo MCM2-7 se ligaria de maneira estável e regulada à dupla fita de DNA (carregada negativamente) no final da fase M e durante a fase G1 do ciclo celular, sendo esse complexo deslocado das origens licenciadas à medida que a duplicação do DNA prosseguisse na fase S (BLOW & DUTTA, 2005; REMUS *et al.*, 2009). Portanto, para impedir que as origens replicadas fossem licenciadas novamente durante a fase de duplicação do DNA, a atividade do complexo MCM2-7 é regulada antes da entrada na fase S do ciclo.

1.7.2. MCM7 como Marcador de Proliferação e de Prognóstico no Câncer do Colo do Útero

Diversos estudos foram dedicados à avaliação de proteínas MCMs como marcadores de proliferação em células e tecidos humanos, com base no fato de que a expressão dessas proteínas é frequentemente demonstrada em células sob proliferação, mas não em células em estado de quiescência, senescência ou diferenciação (FUJITA *et al.*, 1996), sugerindo que as MCMs poderiam ser moléculas úteis como marcadores de proliferação (HIRAIWA *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1998).

No estudo realizado por FREEMAN e colaboradores (1999) foi analisada pela primeira vez a imunomarcação das MCMs 2, 5 e 7 em amostras de tecido cervical humano (tecido normal, NICI, NIC III e câncer), sendo observada uma maior expressão das MCMs 2 e 5 em lesões de alto grau quando comparadas com lesões de baixo grau e tecido normal. No entanto, a análise da proteína MCM7 na progressão das lesões cervicais não foi avaliada neste trabalho (FREEMAN, *et al.*, 1999).

Estudos posteriores avaliaram a expressão de MCM7 como indicador de proliferação em diversos tipos de neoplasias, como o câncer de cólon (NISHIHARA, *et al.*, 2008), de próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; LAITINEN *et al.*, 2008) e cervical (WILLIAMS *et al.*, 1998; BRAKE *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2013). Esses trabalhos demonstraram que a utilização de MCM7 como indicador de proliferação oferece algumas vantagens sobre outros marcadores, como o Ki-67.

A especificidade da proteína Ki-67 em avaliar a proliferação celular é considerada baixa, uma vez que a proteína está ausente em uma proporção de células de cada fase do ciclo celular incluindo a fase S. Adicionalmente, Ki-67 é frequentemente produzida em um número menor de células malignas ou pré-malignas do que MCM7, em uma ampla variedade de sítios anatômicos incluindo a cérvix uterina (WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2013), a próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004), o endométrio (LI *et al.*, 2005), o cólon (NISHIHARA *et al.*, 2008), o pulmão (FUJIOKA *et al.*, 2009), a cavidade oral (TAMURA *et al.*, 2010); fígado (QU *et al.*, 2017). Além disso, Ki-67 possui uma baixa especificidade na detecção de progressão de lesões cervicais (AGOFF *et al.*, 2003). A imunomarcaçãõ dessa proteína em amostras cervicais apresentou correlaçãõ com a presençã de inflamaçãõ, sendo verificada elevada marcaçãõ de Ki-67 em células sob proliferaçãõ de lesões atípicas (como ASCUS) e reativas (AGOFF *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2015).

Portanto, uma das principais vantagens de MCM7 é que essa proteína constitui parte essencial do complexo pré-replicativo, com importante função no processo de “licenciamento” da duplicaçãõ do DNA, e assim, a presençã da mesma tem sido caracterizada atravẽs de todo o ciclo celular (BELL & DUTTA, 2002; BLOW e DUTTA 2005). Adicionalmente, as MCMs representam o ponto de convergẽcia de numerosas vias de sinalizaçãõ envolvidas no crescimento celular (ROMANOWSKI *et al.* 1997; DAS *et al.*, 2013; GOU *et al.*, 2018), e assim, constituem melhores marcadores de células que estejam no ciclo celular do que outros possíveis candidatos, como receptores de fatores de crescimento ou moléculas envolvidas na transduçãõ de sinal (ROMANOWSKI *et al.* 1997; DAS *et al.*, 2103; GOU *et al.*, 2018).

Do ponto de vista técnico, existe uma maior disponibilidade de anticorpos no mercado para todos os tipos de MCMs, e estes têm sido considerados superiores aos anticorpos que reconhecem Ki-67, para a avaliaçãõ de compartimentos proliferativos em ambos tecidos, normais e anormais (WILLIAMS *et al.*, 1998, FREEMAN *et al.*, 1999; CHATRAT *et al.*, 2004; XUE *et al.*, 2003). Dessa forma, as proteínas MCM com destaque para MCM7, têm sido consideradas excelentes marcadores para triagem e prognóstico do câncẽr (PADMANABHAN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009).

Destacam-se alguns estudos que avaliaram a significãncia de MCM7 como marcador de prognóstico do câncẽr, como o Carcinoma endometrial (LI *et al.*, 2005). Nesse trabalho, pacientes que apresentavam altos valores de marcaçãõ tecidual de MCM7 exibiam menor taxa de sobrevivẽncia. Além disso, MCM7 demonstrou correlaçãõ inversa com o grau de diferenciaçãõ dos tumores, ou seja, observou-se

maior nível de proliferação em tumores de estágios mais avançados (estágios II e III). Entretanto não foi verificada nesse estudo, a associação da imunomarcagem de MCM7 com outros importantes aspectos histopatológicos do carcinoma endometrial como o subtipo e o estágio clínico do tumor, a invasão do miométrio e a presença de metástases em linfonodos (LI *et al.*, 2005). Dessa forma, a elucidação do papel que MCM7 desempenha na patogênese de tumores, necessitará de investigações adicionais com o objetivo de caracterizar as interações moleculares de MCM7 e a identificação de vias celulares pró - tumorigênicas que possam ser influenciadas por elevados níveis da proteína MCM7 (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006).

Um estudo de meta-análise recentemente publicado foi desenvolvido com o objetivo de se analisar a relação existente entre a expressão das MCMs e a sobrevida geral de pacientes afetados por diversos tipos de câncer. O estudo mostrou que a expressão positiva ou elevada de MCM2, MCM5 e MCM7 pode estar relacionada a um pior prognóstico do Câncer, e que esses resultados podem ser úteis para fornecer evidências clínicas para o tratamento eficaz de pacientes nessas situações. Destaca-se que para MCM7 observou-se relação da mesma com parâmetros desfavoráveis do câncer como maior proliferação celular, pior estágio clínico do tumor e presença de metástase linfática, dados esses que enfatizam o grande potencial de MCM7 como biomarcador de prognóstico do câncer (GOU *et al.*, 2018).

Entretanto, a despeito desses dados, poucos estudos investigaram a expressão de MCM7 em amostras de tecido da cérvix uterina obtidas de pacientes humanos (FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003) ou de camundongos transgênicos (modelo experimental) (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006). Em um estudo prévio desenvolvido em nosso Laboratório, foi avaliado o padrão de expressão das proteínas p16INK4a, Ki-67 e MCM7 em amostras de tecido cervical, com o objetivo de se investigar o potencial dessas moléculas como biomarcadores de progressão das lesões intraepiteliais cervicais, além da possível correlação entre a expressão dessas moléculas, com a infecção pelo HPV (LOBATO *et al.*, 2012). Entretanto, nenhum dos estudos anteriores avaliou a relevância prognóstica e o potencial de aplicabilidade da proteína MCM7 como biomarcador de diferenciação do Câncer cervical.

2. JUSTIFICATIVA

O CCU é uma patologia responsável por numerosas mortes de mulheres em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Dentre os diferentes tipos de carcinoma que podem acometer o colo uterino, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o mais prevalente entre as mulheres, correspondendo a cerca de 90% de todas as neoplasias cervicais (ROSAI, 2004). Sabe-se ainda, que a elevada incidência do carcinoma cervical está relacionada à infecção persistente por HPVs de AR como os tipos 16 e 18 que são os mais frequentes.

Estudos anteriores realizados com diferentes tipos de tumores já demonstraram que proteínas MCMs podem ser usadas como marcadores de proliferação e de prognóstico, em face da sua importante função como helicases no início da replicação do DNA, atuando ainda no licenciamento e no controle da replicação em mamíferos. De fato, o potencial da proteína MCM7 de atuar como excelente marcador prognóstico já foi demonstrado em alguns tipos de tumores como o câncer de pulmão, o colorretal e o endometrial. Contudo, nenhum desses estudos avaliou qual a relevância prognóstica e o potencial de aplicabilidade de MCM7, como marcador de proliferação no carcinoma cervical em comparação com os dados clínico-histopatológicos das pacientes. Portanto, a realização de estudos que visem avaliar a expressão de moléculas como as MCMs, e em especial a MCM7, em tecidos cervicais são de grande relevância, uma vez que essa proteína está intimamente relacionada com a proliferação celular, e com um pior prognóstico dos pacientes em vários tipos de câncer.

Todos esses aspectos justificam a realização desse estudo que tem como objetivo analisar a imunomarcagem de MCM7 em amostras de tecido cervical obtidas de pacientes com carcinoma invasor através da técnica de IHQ, e assim, visando o uso futuro desse biomarcador como ferramenta diagnóstica para detecção precoce dessas lesões. Além disso, sabendo-se da estreita relação existente entre o câncer de colo e a infecção pelo HPV, essa Dissertação também se propõe investigar nas amostras de Câncer invasor, a presença do HPV e do HPV 16, buscando avaliar a correlação existente entre a expressão de MCM7 e a infecção pelo HPV. Por fim, pretende-se analisar a possível associação da expressão de MCM7 com características histopatológicas dos tumores, com o objetivo de se avaliar o potencial dessas moléculas como marcadores celulares de agressividade do CCU.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar o padrão de imunomarcação da proteína MCM7 em amostras de CCE, e sua correla o com o grau de diferencia o do tumor e a infec o pelo HPV e pelo HPV16 de alto-risco oncogênico.

3.2. Objetivos Específicos

Em amostras de câncer cervical e amostras controle temos como objetivos:

- Investigar, por meio da rea o de *Nested PCR* e *Hemi-nested PCR*, a presença do DNA do HPV e do HPV16 de AR, respectivamente, em amostras de DNA extraídas do tecido cervical;
- Determinar, por meio da técnica de Imuno-histoquímica e de análise morfométrica, a área de marca o da proteína MCM7 em amostras de carcinoma cervical portadoras de distintos graus de diferencia o;
- Determinar a densidade celular (celularidade) em amostras de tecido cervical por meio da análise morfométrica, de acordo com o número de células contadas e a área de tecido epitelial normal e alterado verificado nas amostras de Cervicite e câncer, respectivamente;
- Avaliar, uma possível diferença de celularidade entre os grupos de amostras de tecido cervical, e diferenças da Imunomarca o por MCM7;
- Avaliar uma possível correla o existente entre a marca o tecidual da proteína MCM7, as características histopatológicas das amostras de câncer analisadas e a presença da infec o pelo HPV, com o objetivo de determinar se a imunomarca o dessa proteína poderia ser utilizada como marcador de prolifera o e de agressividade do CCU.

4. METODOLOGIA

4.1. População de Estudo

Para a realização desse estudo foram utilizadas 43 amostras de tecido cervical obtidas por biópsias de pacientes diagnosticadas com CCU, e 15 amostras de tecido cervical obtidas por biópsia, de mulheres que apresentavam diagnóstico de cervicite ou alterações benignas ao exame ginecológico por colposcopia. Todas as amostras de tecido analisadas no estudo correspondem a espécimes incluídas em parafina, que foram selecionadas de um Banco de amostras do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, localizado à Rua São Paulo, Nº 893, Centro, Belo Horizonte, MG, e gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Tafuri, Coordenador do referido Laboratório. Tais amostras foram coletadas por médicos ginecologistas para realização de exame histopatológico de rotina, de pacientes em acompanhamento em Consultórios ginecológicos de Belo Horizonte, MG. É importante ressaltar que tais amostras foram emprestadas durante o período de realização da pesquisa, e que o Dr. Alexandre Tafuri, colaborador desse projeto, emitiu anuência para o empréstimo temporário das amostras cervicais parafinadas ao Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Para tal, um Termo de Responsabilidade foi assinado entre as duas Instituições, para firmar o compromisso pela guarda temporária dos Blocos de parafina contendo as amostras de Câncer cervical e de tecidos sem alterações neoplásicas, no Laboratório de Patogênese Molecular do ICB, UFMG.

Após a coleta, os fragmentos de tecido cervical foram processados rotineiramente para inclusão em parafina, sendo inicialmente realizada a fixação dos tecidos em formalina a 10% por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação gradativa em álcool absoluto, posteriormente à diafanização em xilol e à impregnação e inclusão em parafina, sob a temperatura média de 75°C. Após todo processamento histológico e coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E) foi realizada a análise por Médicos Patologistas, para emissão do Diagnóstico Histopatológico. O diagnóstico histopatológico de cada amostra foi independentemente revisado e confirmado por 3 médicos patologistas com larga experiência profissional.

A utilização destas amostras parafinadas para fins de pesquisa havia sido aprovada pelo Comitê em Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG, em dois outros estudos anteriores. Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi

encaminhado e submetido à aprovação do COEP – UFMG (Anexo 1, Seção de Anexos).

4.1.1. Classificação Histopatológica das amostras de Câncer do Colo do Útero

Cortes histológicos preparados a partir das biópsias cervicais foram analisados por Médico patologista do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, sendo emitido o Diagnóstico histopatológico de cada amostra. Posteriormente esse resultado foi independentemente revisado e confirmado por dois outros Médicos patologistas de reconhecida competência (Tabela 2).

Como explicado anteriormente, o grau de diferenciação dos carcinomas analisados nesse estudo foi definido com base nos critérios estabelecidos pela FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*). Para realização da análise histopatológica subsequente e da técnica de Imuno-histoquímica os blocos de amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina e (FFPE, sigla inglesa para *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues*) foram submetidos à microtomia no micrótomo (MICROM, Modelo HM335E) pertencente ao Laboratório de Experimentação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Esses cortes apresentavam uma espessura de 5 µm e foram, posteriormente, corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) e/ou utilizados para a Imuno-histoquímica.

Tabela 2 – Classificação do grau de diferenciação das amostras de CCU

Diagnóstico Histopatológico	Nº de amostras
CCEP- Carcinoma de Células Escamosas Pouco diferenciado (grau III)	19
CCEM- Carcinoma de Células Escamosas Moderadamente diferenciado (grau II)	24
TOTAL DE AMOSTRAS	43

4.2. Testes Moleculares

4.2.1. Extração do DNA das amostras cervicais

Diferentes métodos moleculares foram utilizados a partir do lisado celular obtido, de acordo com técnicas já padronizadas pelo nosso grupo.

A análise molecular das amostras de tecido foi feita após a extração do DNA (lisado) das células para posterior realização da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com o objetivo de se investigar a presença do DNA/HPV. Para tal, foi necessária a obtenção de cortes histológicos, realizada no micrótomo (MICROM, Modelo HM335E) pertencente ao Laboratório de Experimentação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Foram obtidos cinco cortes com cerca de 10µm de cada amostra, que foram transferidos com o auxílio de um palito estéril para um microtubo de 1,5mL ou 2,0mL. Entre o manuseio de um bloco e outro, o micrótomo foi cuidadosamente limpo com xilol e a navalha do micrótomo também cuidadosamente limpa com xilol, etanol e solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nessa ordem, para que dessa maneira não ocorresse contaminação cruzada entre as amostras (WRIGHT & MANOS, 1990; GREER *et al.*, 1991; SHIMIZU & BURNS, 1995).

Após a obtenção dos cortes, para realizar a extração do DNA das amostras parafinadas utilizamos o protocolo descrito por WRIGHT & MANOS (1990) com algumas adaptações. A etapa inicial desse protocolo consiste na remoção da parafina presente em cada corte; esse processo foi realizado duas vezes, sendo para isso os cortes imersos em 3 banhos de 1ml de xilol aquecido a 65°C, e lentamente agitados no homogeneizador de tecidos (PROENIX®, modelo AP 22), por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas (centrífuga B. BRAUN SIGMA®, modelo 2K15) a 3.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante (SND) desprezado. Posteriormente os cortes foram lavados com 1ml de álcool etílico a 95% e 1ml de álcool etílico a 70%, respectivamente, para remoção da mistura xilol e da parafina residual, com consecutiva centrifugação e desprezo do SND. Em seguida, foi realizada a secagem do tecido precipitado cobrindo-se os tubos com Parafilm (American N.C.) à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Na última etapa da obtenção do lisado foi realizada a lise do tecido a 56°C, em banho maria com 500µL de solução de digestão contendo: 50mM de Tris-HCl pH 8,5 (Promega), 1mM de EDTA (Gibco), 0,5% de Tween 20 (Invitrogen) e 1 µg/µL de proteinase K. Após o período necessário para a lise do tecido (1-5 dias) os tubos foram centrifugados, sendo o sobrenadante das células (correspondente ao lisado) transferido para outro tubo eppendorf, e armazenado no freezer à -20°C para ser posteriormente utilizado nas reações de PCR.

4.2.2. Amplificação do fragmento do gene β -globina Humana

Para verificação da qualidade e da integridade do DNA obtido das amostras após o protocolo de extração, foi utilizada a amplificação direta do gene de β -globina

humana através dos iniciadores PC03 e PC04 (SAIKI *et al.*, 1985), que são capazes de amplificar um fragmento de 110pb desse gene. As condições de preparo da reação e o programa de amplificação utilizados nesse procedimento estão descritos no Anexo 2, na Seção de Anexos.

Devido à dificuldade de amplificação das amostras que foram fixadas com formalina (solução de formol a 10%) e posteriormente incluídas em parafina, algumas dessas amostras foram negativas para reação de PCR direta do gene de β -globina humana. Sendo assim, todas as amostras negativas para esse primeiro experimento foram submetidas ao protocolo de *Hemi-Nested* PCR (descrito no Anexo 2, na Seção de Anexos).

Os protocolos do tipo *Nested*-PCR e *Hemi-Nested* PCR são usados com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR. Em ambas as técnicas de PCR há amplificação inicial de um segmento genômico com um conjunto de primers específicos. O produto amplificado dessa primeira reação é utilizado como fonte de DNA para uma segunda reação de PCR. Portanto, a *Nested*-PCR amplifica sequências localizadas internamente ao segmento amplificado na primeira reação. Ao realizar a segunda reação utilizando somente um primer diferente ao da primeira reação, a reação é denominada de *Hemi-nested* PCR (RAHMAN *et al.*, 2013). As técnicas de *Nested*-PCR e de *Hemi-nested* PCR provaram ser mais sensíveis para a detecção do DNA humano e do HPV quando comparados à metodologia de PCR baseadas em apenas uma reação de amplificação (PELT-VERKUIL *et al.*, 2008).

Como controle positivo da amplificação do gene de β -globina humano tanto para o PCR direto (Convencional) quanto para o *Hemi-Nested* PCR foram usadas amostras de DNA sabidamente positivas e obtidas no próprio Laboratório por diferentes testes. Como controle negativo da reação de PCR foi utilizado o branco do Mix da reação, que consiste em uma mistura de todos os componentes da reação (dNTP's, Tampão 4G, iniciadores e *Taq* DNA polimerase 4G) sem adição de amostra de DNA.

4.2.3. Detecção do DNA do HPV

As amostras em análise que foram positivas para a amplificação do gene β -globina humana foram testadas para a presença do DNA do HPV. Para isso foi utilizado o protocolo de *Nested*-PCR utilizando-se os *primers* MY09/MY11 e GP5+/GP6+ (MOLIJN *et al.*, 2005) que são capazes de amplificar fragmentos de DNA de 450pb e de 150pb, respectivamente, da região do gene *L1* do genoma do HPV (protocolo descrito no Anexo 3).

Como controle positivo das reações de PCR para o HPV foram utilizadas amostras de DNA extraídas de células Siha, que possui o DNA do HPV 16 em seu genoma, e de células HeLa, que possuem o DNA do HPV18 integrado ao seu genoma. Já o controle negativo da PCR continha apenas os componentes da reação (dNTP's, Tampão 4G, iniciadores e *Taq* DNA polimerase 4G), sem adicionar de qualquer amostra de DNA.

4.2.4. Tipagem do HPV 16

Após os experimentos que verificaram a presença do DNA do HPV nas amostras de tecido cervical foi realizada nas amostras positivas para o HPV, a tipagem do HPV16 de alto risco.

A pesquisa do DNA do HPV 16 foi realizada por meio de um protocolo *Hemi-nested* PCR, utilizando-se os primers E6CF4 e E7CR3 que são complementares aos genes *E6* e *E7* de todos os HPVs, para a amplificação de um primeiro fragmento de tamanho variável (350 a 390pb) (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Em seguida foi realizada uma segunda reação de amplificação, em que se usou como DNA molde o produto obtido na primeira reação, o iniciador reverso E7CR3 e o iniciador direto específico para o HPV16, HPV16SF (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Os protocolos de amplificação empregados (condições de preparo da reação e programa de amplificação) estão descritos no Anexo 4, Seção de Anexos.

Utilizamos como controles positivos das reações de PCR para tipagem do HPV16: (i) amostras de DNA do Laboratório de Patogênese Molecular, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, que já são sabidamente classificadas quanto ao tipo específico do HPV; (ii) amostras de DNA extraídas de células Siha que possuem o DNA do HPV16, integrado ao seu genoma. Como controle negativo da reação de PCR foi utilizado o branco do Mix da reação.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de Poliacrilamida 6% por duas horas em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA), a uma voltagem constante de 100 Volts por 20 minutos. Cinco microlitros de cada produto da PCR foram homogeneizados com 5µl de tampão de amostra 2X (5X TBE/ azul de bromofenol a 0,25%/ Ficoll 400 a 15%) e aplicados por canaleta do gel. Após o término da eletroforese, os produtos de interesse foram visualizados nos géis de policrilamida após coloração pela solução de Nitrato de Prata (Anexo 6, Seção de Anexos).

4.3. Imuno-histoquímica

A imunomarcagem da proteína MCM7 foi analisada por meio da técnica de Imuno-histoquímica, utilizando-se o anticorpo primário anti-MCM7 (monoclonal de coelho, ABCAM – ab 52489) na concentração de 1:400, e o anticorpo secundário *anti-Rabbit* na concentração de 1:500. Para a marcação dos núcleos realizou-se a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (RenyLab®). Os cortes de tecido de 5µm foram desparafinizados em quatro banhos de xilol por 5 minutos e reidratados em uma série decrescente de solução de etanol (100 a 25%). Para aumentar a detecção da proteína, a recuperação antigênica foi realizada, onde todos os cortes foram imersos em solução de Tris/EDTA pH 9,0 por 30 minutos a 100°C em banho-maria. Após o resfriamento de 20 minutos, os cortes passaram por uma etapa de bloqueio em solução a 2% de BSA em PBS 1X, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti-MCM7 (à diluição de 1:400) *overnight* à 4°C. No dia seguinte, após cinco lavagens com PBS 1X, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotilado (VEC-STAIN. Elite ABC Kit, *Vector Laboratories*, CA, USA- *Rabbit*), diluído a 1:500 em solução 0.3% BSA em PBS 1X, por 60 minutos à temperatura ambiente. Foi realizada novamente a lavagem das lâminas em PBS 1X e, posteriormente a incubação dos cortes, na solução ABC *Vector* (*Vectastain ABC KIT- PK 6101 ou -PK 6102; Vector Laboratories*, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois do bloqueio com a solução ABC, foi realizada a lavagem das lâminas, e em seguida a revelação da marcação nos cortes utilizando como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (*Spring Bioscience*). Após o desenvolvimento de cor marrom (etapa de “viragem”), os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris por 20 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados através de uma série crescente de solução de etanol (70 a 100%), diafanizados em 3 banhos de xilol e as lâminas foram montadas em *Entellan* (*Merck Millipore*, Código 3208 20 10, USA). Em cada experimento foi utilizado como controle positivo uma amostra de câncer sabidamente com uma grande área de lesão. Para controle negativo de cada reação foi realizada a substituição do anticorpo primário pela solução de bloqueio (2% BSA em PBS 1X), utilizando-se uma amostra de câncer cervical, com representativa área de lesão.

4.4. Avaliação da marcação de MCM7 em amostras de Câncer de Colo do Útero

A Imunorreatividade para MCM7 foi avaliada pela distribuição de núcleos positivos para o marcador em todas as áreas lesionadas no estroma do tecido, e sendo consideradas células positivas, apenas aquelas que apresentavam forte marcação nuclear da proteína. Além do número de células marcadas com MCM7 foi avaliado o tamanho da área de câncer de cada amostra de tecido da paciente.

Para realização da análise quantitativa (morfométrica) nas amostras, as imagens das lâminas histológicas foram capturadas das seguintes maneiras: (i) as imagens de 19 amostras foram capturadas com o auxílio de um fotomicroscópio *Zeiss AxioLab 1* equipado com uma Câmera digital *Zeiss Axiovision* (Carl Zeiss, NY, EUA), utilizando-se o *Software Zen*. Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia, ICB-UFMG, coordenado pela Profa. Cristina Guatimosim Fonseca; (ii) as imagens de 25 amostras foram capturadas com microscópio digital – *scanner* de lâminas 3D HISTECH, localizado no Laboratório de Patologia Mamária na Faculdade de Medicina da UFMG, coordenado pela Profa. Cristiana Buzelin Nunes.

Como assinalado acima, durante a realização desse estudo foi necessária a mudança da forma de obtenção das imagens dos cortes histológicos, devido à constatação da grande extensão das áreas de lesão, e para que conseguíssemos capturar em tempo hábil, todas as áreas de câncer de cada amostra. Além disso, esse equipamento permite a obtenção da imagem de toda a Lâmina Histológica em diferentes aumentos, além de promover a aquisição de imagens com qualidade superior àquelas obtidas ao microscópio de luz. Por meio de ambos os equipamentos foi realizada a captura de imagens digitais de toda a extensão da lesão, correspondentes às áreas de câncer presentes nas amostras de tecido que apresentaram marcação positiva e/ou negativa da proteína MCM7. Nas amostras de Cervicite foram capturadas imagens de todo o epitélio cervical sem alterações morfológicas, com ênfase nas áreas de marcação da proteína MCM7 nas camadas proliferativas do epitélio.

Para a seleção das áreas de lesão e de epitélio normal, as imagens foram capturadas nas objetivas de 5X e 10X (aumento de 50X e 100X, respectivamente). Para a contagem das células positivas as imagens foram obtidas com a objetiva de 20X (aumento de 200X). Após a captura das imagens, a seleção de toda a área de lesão e do epitélio normal, e a quantificação de células marcadas e não marcadas pelo anticorpo de interesse (MCM7) foi realizada com o auxílio do programa *Image J Fiji* (Figura 1) que pode ser obtido no seguinte link: <https://imagej.net/Welcome>. O

programa *Image J Fiji* apresenta como ferramenta um contador de células que permite ao usuário selecionar as células marcadas e não marcadas pelo anticorpo de interesse, e assim, torna-se possível obter o **número exato** de células de uma dada área.

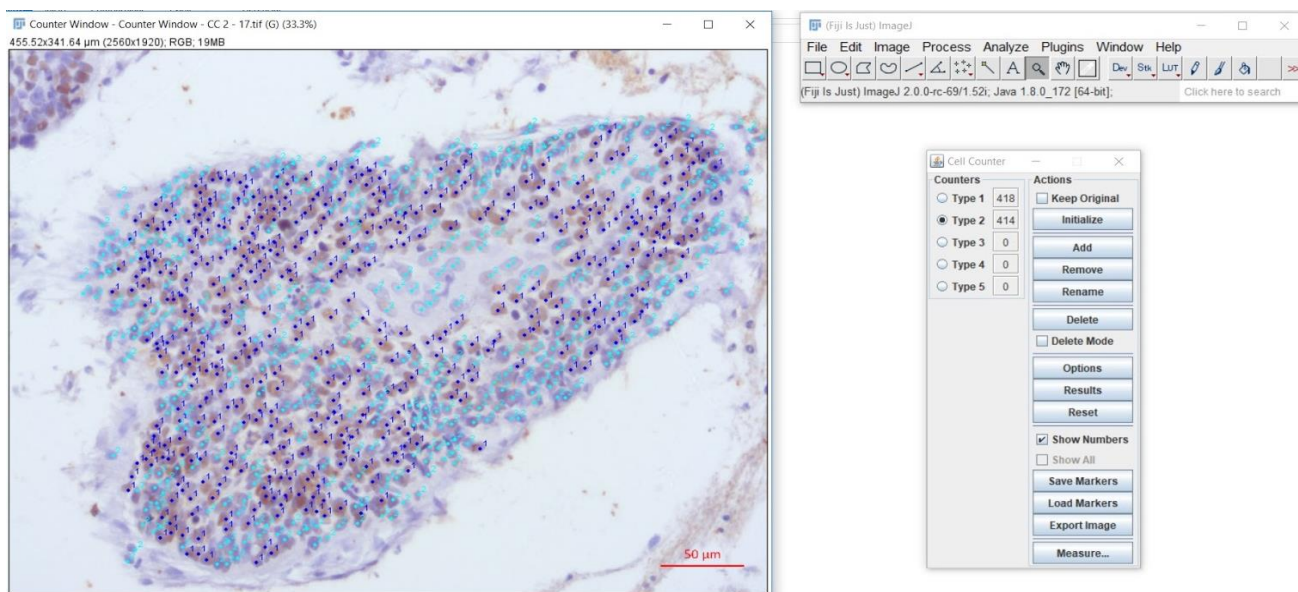


Figura 10: Imagem de câncer cervical capturada no programa *Image J Fiji*. Observa-se a imagem capturada pelo Microscópio de Luz de uma amostra de CCU, em que as células marcadas com o número 1 (azul escuro) são as células positivas para MCM7, enquanto as células marcadas com o número 2 (azul claro) são as células negativas para MCM7.

4.5. Análise Estatística

Os dados morfométricos e numéricos obtidos pela análise do epitélio cervical normal, e do tecido tumoral localizado no estroma da cérvix foram submetidos ao Teste de normalidade, e posteriormente, analisados com o Teste de Comparação não-paramétrico de *Mann-Whitney* para avaliação de significância estatística dos seguintes parâmetros: número de células epiteliais normais nas amostras controle; número total de células epiteliais alteradas nas amostras de câncer; número de células marcadas para MCM7 no epitélio normal e na área total da lesão; número de células positivas para MCM7 por mm² e em reação ao número de células totais contadas. Esses parâmetros também foram comparados entre dois tipos diferentes de câncer, pouco e moderadamente diferenciados. Utilizou-se o Coeficiente de Correlação de *Spearman* para análise da associação existente entre a marcação de MCM7, o grau de diferenciação do câncer do colo do útero e a presença de infecção pelo HPV. Para ambos os testes estatísticos, amostras consideradas como *Outlier* foram retiradas de todas as análises. A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism 8*. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise Histopatológica

Para este estudo 58 amostras de tecido cervical (43 amostras de CCU e 15 amostras controle) obtidas por biópsia e incluídas em parafina foram diagnosticadas e selecionadas do Banco de amostras do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri. O diagnóstico histopatológico de cada amostra foi revisado e confirmado de maneira independente por três experientes médicos patologistas.

Como descrito anteriormente na seção de Metodologia (Tabela 2), as amostras de Câncer Cervical foram classificadas histopatologicamente como: (i) Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP) apresentando células epiteliais de câncer pequenas, com formatos regulares e com menor grau de atipia, formando as massas de câncer infiltradas no estroma do tecido cervical e, (ii) Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM) que possui células epiteliais de câncer de formatos irregulares, tamanhos diferentes e maior grau de atipia.

Imagens representativas de cortes de tecido cervical normal e apresentando os diferentes diagnósticos histopatológicos estão ilustradas na Figura 11.

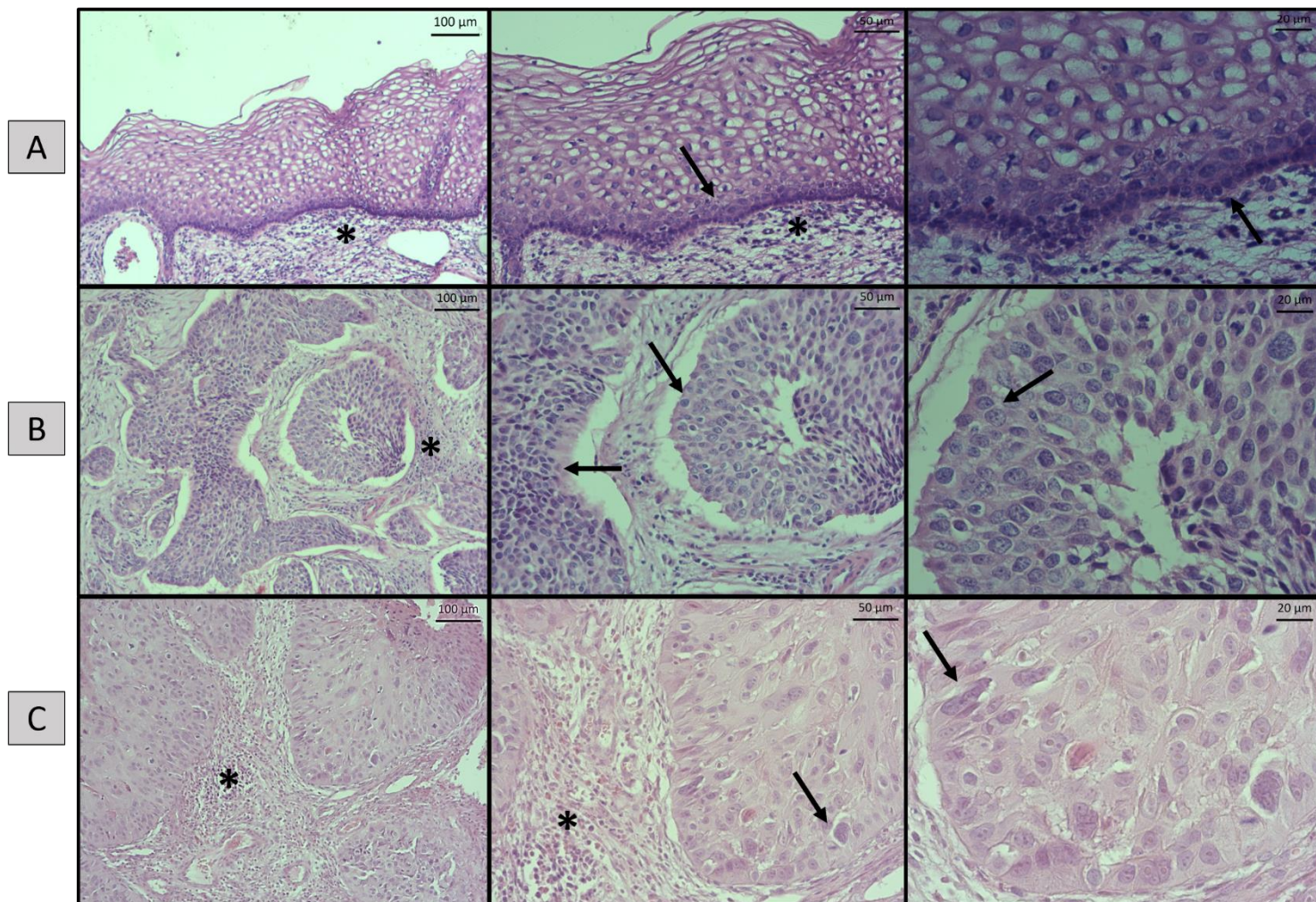


Figura 11: Imagens dos cortes histológicos das amostras de Cervicite, Carcinoma de células escamosas pouco (CCEP) e moderadamente diferenciados (CCEM) corados com Hematoxilina e Eosina. Na fileira A, observa-se os cortes histológicos de Cervicite nos aumentos de 10X, 200X e 400X, respectivamente. Esse grupo apresenta epitélio estratificado cervical composto por células escamosas, sem atipias (setas) e presença de infiltrado inflamatório no estroma do tecido (*). Verifica-se na fileira B, os cortes histológicos representativos de CCEP, nos aumentos de 10X, 200X e 400X, respectivamente, com as massas tumorais presentes no estroma do tecido cervical e presença de Infiltrado inflamatório (*). Essas massas são formadas de células com características morfológicas primitivas relacionadas a imaturidade: pequenas, com citoplasma escasso e conteúdo nuclear hiper cromático (setas). Já na fileira C, há os cortes de CCEM (aumentos de 10X, 200X e 400X). Observa-se presença de massas tumorais infiltrando o estroma do tecido apresentando células epiteliais alteradas, atípicas, de diferentes formatos e tamanhos, além de conteúdo nuclear hiper cromático (setas). Verifica-se presença de Infiltrado inflamatório permeando as massas infiltrantes (*).

5.2. Verificação da integridade do DNA extraído das amostras cervicais

Com o objetivo de avaliar a integridade do DNA extraído das amostras cervicais, realizou-se a amplificação do fragmento de 110pb do gene da β -globina humana por PCR convencional e *Hemi-Nested* PCR (descrito no item 4.2.2 da seção de Metodologia). A Figura 12 apresenta resultados obtidos pela utilização do DNA extraído de amostras cervicais, que apresentou em sua maioria amplificação positiva do gene de β -globina humana.

Neste estudo, foram analisadas 15 amostras de Cervicite e 43 amostras de CCE utilizando o protocolo de PCR convencional. As amostras que apresentaram resultado negativo para o PCR direto foram reavaliadas utilizando-se o protocolo *Hemi-Nested* PCR. Portanto, todas as 58 amostras de tecido cervical (58/58) apresentaram resultado positivo para a análise da integridade do DNA extraído.

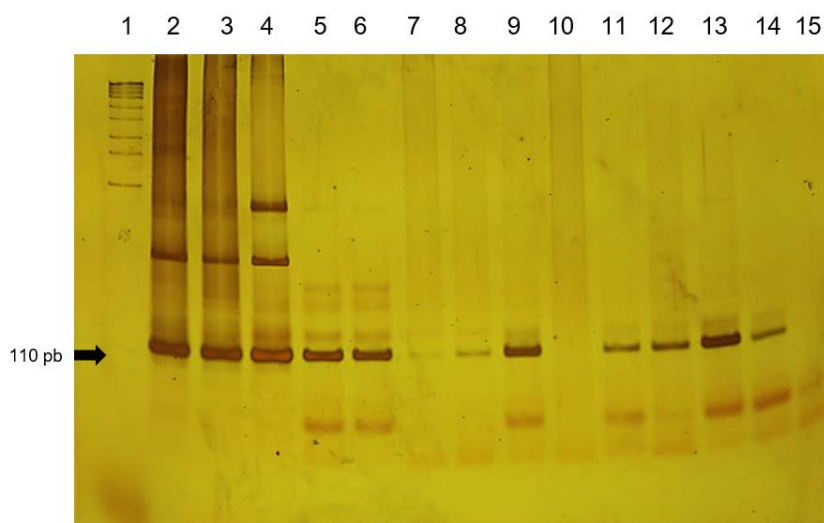


Figura 12: Imagem do gel de poliacrilamida a 6% corado pelo nitrato de prata, e apresentando o amplicon de 110 pb do gene de β -globina obtido pela utilização de amostras cervicais. As canaletas 3 a 13 correspondem ao produto de PCR obtido pela análise dessas amostras. Como controle positivo, nas canaletas 2 e 3, foi utilizado DNA extraído de cultura de células SiHa. Como padrão de tamanho molecular (canaleta 1) foi utilizado o 1kb *Ladder* (Ludwig Biotec®), e como controle negativo da reação foi utilizada água destilada estéril (canaleta 15).

5.3. Detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais

Após a análise da integridade do DNA obtido das amostras cervicais, foram realizadas as reações de *Nested*-PCR para detecção da infecção por HPV. A Figura 13 mostra resultados representativos obtidos pela amplificação nas amostras cervicais, do fragmento de 150pb da região do gene *L1*, conservado entre os tipos de HPVs.

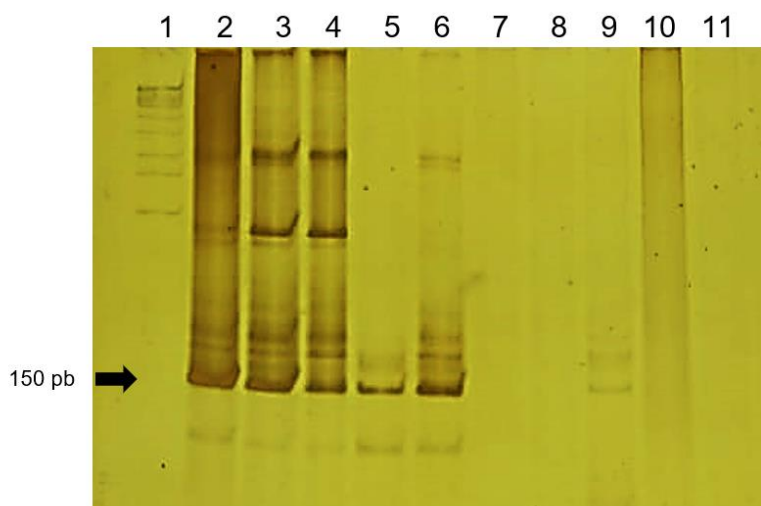


Figura 13: Imagem do gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, apresentando o amplicon de 150 pb do gene *L1* a partir de amostras cervicais. As canaletas 4 a 10 correspondem ao produto de PCR obtido pela análise de amostras de câncer. Como controle positivo, nas canaletas 2 e 3 foi utilizado DNA extraído de cultura de células SiHa (puro e na diluição de 1:10). Como padrão de tamanho molecular (canaleta 1) foi utilizado o 1kb *Ladder* (Ludwig Biotec®), e como controle negativo da reação foi utilizada água destilada estéril (canaleta 11).

Na Tabela 3, observa-se que o DNA-HPV está presente em aproximadamente 71% (41/58) das amostras de tecido cervical de Cervicite e de CCU. Nas amostras do grupo de Cervicite foi detectada a presença do DNA do HPV em 46,66% das amostras (7/15). Nas amostras classificadas como CCEP, 73,68% (14/19) dessas amostras foram positivas para a detecção do HPV, e em relação às amostras de CCEM a taxa de positividade foi de 83,33% (20/24).

Tabela 3 – Resultado da detecção da presença do DNA do HPV (150 pb) nas amostras de CCU e Cervicite por PCR

RESULTADOS	GRUPOS ANALISADOS			
	CERVICITE	CCEP	CCEM	TOTAL
	N (% resultado)	N (% resultado)	N (% resultado)	N (% resultado)
HPV Positivo	7 (46,66%)	14 (73,68%)	20 (83,33%)	41 (70,68%)
HPV Negativo	8 (53,34%)	5 (26,32%)	4 (16,67%)	17 (29,32%)
TOTAL	15 (25,88%)	19 (32,75%)	24 (41,37%)	58 (100%)

Legenda: CCEP – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado; CCEM – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado.

5.4. Detecção do DNA do HPV16 nas amostras cervicais

A análise da presença do DNA do HPV16 nas amostras de Cervicite e em CCU foi realizada pelo protocolo *Hemi-Nested* PCR utilizando-se primers específicos na primeira e na segunda reação, responsáveis por amplificar um fragmento de 149 pb na segunda reação da PCR. A taxa de positividade das amostras de câncer para esse tipo de HPV foi de 56% (24/43). No entanto, para o grupo de Cervicite não foi detectado a presença do DNA do HPV16 em nenhuma amostra (0/15). A Figura 14 mostra o gel de Poliacrilamida com alguns dos resultados da amplificação desse fragmento.



Figura 14: Imagem do gel de poliacrilamida a 6%, corado com nitrato de prata, apresentando o amplicon de 149 pb do HPV16 em amostras cervicais. As canaletas 2 a 12 correspondem ao produto de PCR obtido pela análise das amostras cervicais. Como controle positivo, na canaleta 13 e 14, foi utilizado DNA extraído de cultura de células SiHa. Como padrão de tamanho molecular (canaleta 1) foi utilizado o 1kb *Ladder* (*Ludwig* Biotec®), e como controle negativo da reação foi utilizada água destilada estéril (canaleta 15).

Na Tabela 4, verifica-se que o DNA do HPV 16 está presente nas amostras de CCU com uma positividade de aproximadamente 56% (24/43). Nas amostras classificadas como CCEP foram encontradas 52,63% (10/19) de amostras positivas para o DNA do HPV16, e enquanto nas amostras de CCEM a taxa de positividade foi de 58,33% (14/24).

Tabela 4 – Resultado da detecção da presença do DNA do HPV16 (149 pb) nas amostras de CCU e Cervicite por *Hemi-Nested* PCR

RESULTADOS	GRUPOS ANALISADOS			
	CERVICITE	CCEP	CCEM	TOTAL
	N (% resultado)	N (% resultado)	N (% resultado)	N (% resultado)
HPV16 Positivo	0 (0,00%)	10 (52,63%)	14 (58,33%)	24 (55,81%)
HPV16 Negativo	0 (0,00)	9 (47,37%)	10 (41,67%)	19 (44,19%)
TOTAL	15 (0,00%)	19 (44,19%)	24 (55,81%)	58 (100%)

Legenda: CCEP – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado; CCEM – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado

5.5. Análise da Imunomarcção por MCM7 nas amostras cervicais

Nesse estudo, Imuno-histoquímica para MCM7 foi realizada nas 15 amostras de Cervicite (consideradas como controle negativo) e 43 amostras de CCU. Nas Figuras 15, 16 e 17 observam-se imagens representativas da Imunomarcção para MCM7 em amostras de tecido cervical, onde evidencia-se a localização nuclear desse marcador tanto no grupo controle sem lesão cervical, quanto nos grupos de carcinoma uterino.

Em amostras de tecido cervical diagnosticadas como Cervicite (representadas nas Figuras **15A**, **15B** e **15C**), observa-se marcação nuclear da proteína MCM7 na camada basal e parabasal do epitélio cervical normal, composto por células sem alterações não diferenciadas e diferenciadas, respectivamente.

Nas micrografias **16A**, **16B** e **16C** estão representadas as amostras diagnosticadas como CCEP, onde é possível observar que no tecido tumoral não há presença de focos de queratinização, que as células de câncer de origem epitelial são pequenas, arredondadas, de formato regular, e com nenhuma ou quase nenhuma atipia, além de apresentar grande quantidade de núcleos marcados de marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB), evidenciando a imunorreacção positiva para MCM7 nas massas de câncer presentes no tecido.

As figuras **17A**, **17B** e **17C** exibem cortes histológicos das amostras classificadas como CCEM, em cujas áreas de tecido se evidenciam focos de queratinização, e presença de células epiteliais anormais com maior grau de atipia. Nesse tipo de carcinoma, verifica-se também a presença de vários núcleos de células tumorais marcadas de marrom, caracterizando a positividade para MCM7.

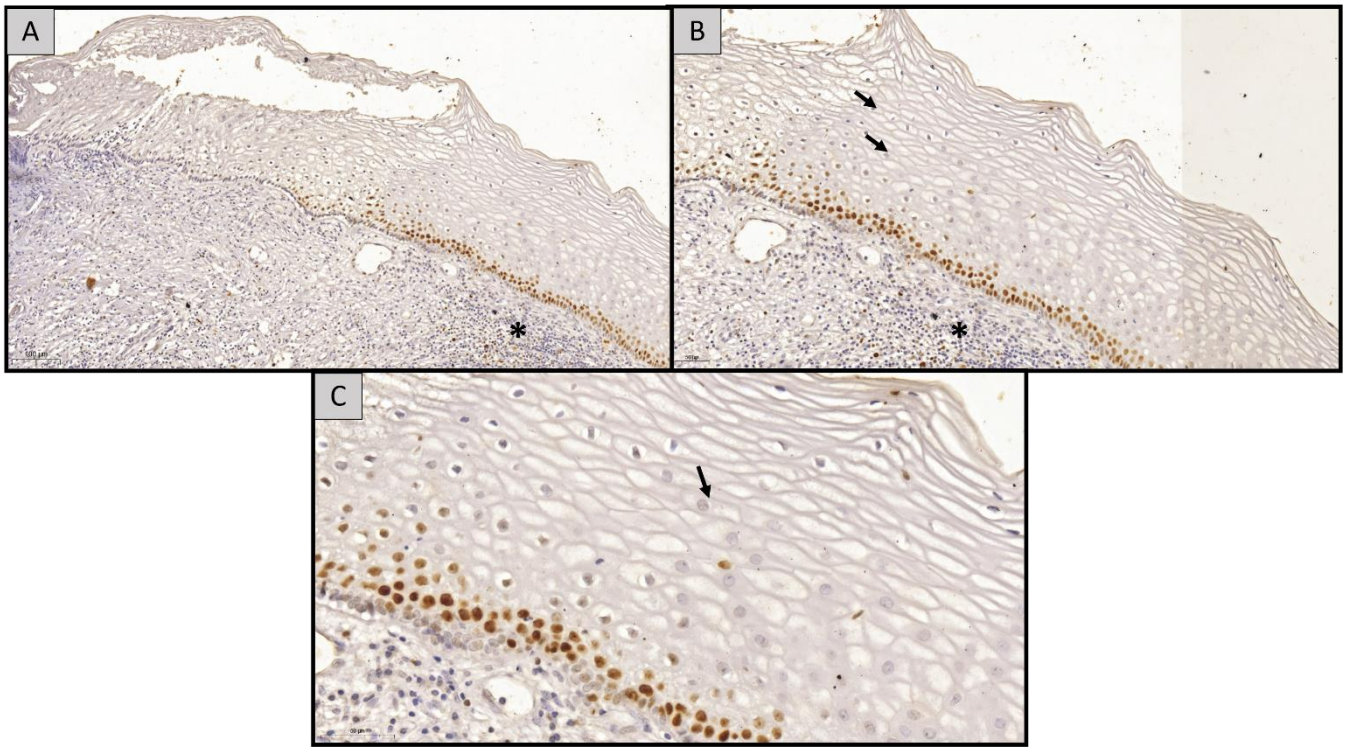


Figura 15: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostra de Cervicite utilizando-se a técnica de Imuno-histoquímica. As imagens obtidas pelo scanner de lâminas 3D HISTECH, nos aumentos de 10X, 200X e 400X, são representadas pelas figuras A, B e C, respectivamente. Nas figuras 16A, B e C do grupo Cervicite, encontra-se o Epitélio estratificado cervical composto por células diferenciadas sem alterações. Observa-se a presença de células ricas em vacúolos de glicogênio citoplasmáticos (setas) na parte superficial do epitélio. Há presença de Infiltrado inflamatório no estroma adjacente (*). A Imunomarcção para MCM7 é verificada nos núcleos das células da camada basal e parabasal do epitélio marcados em marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB).

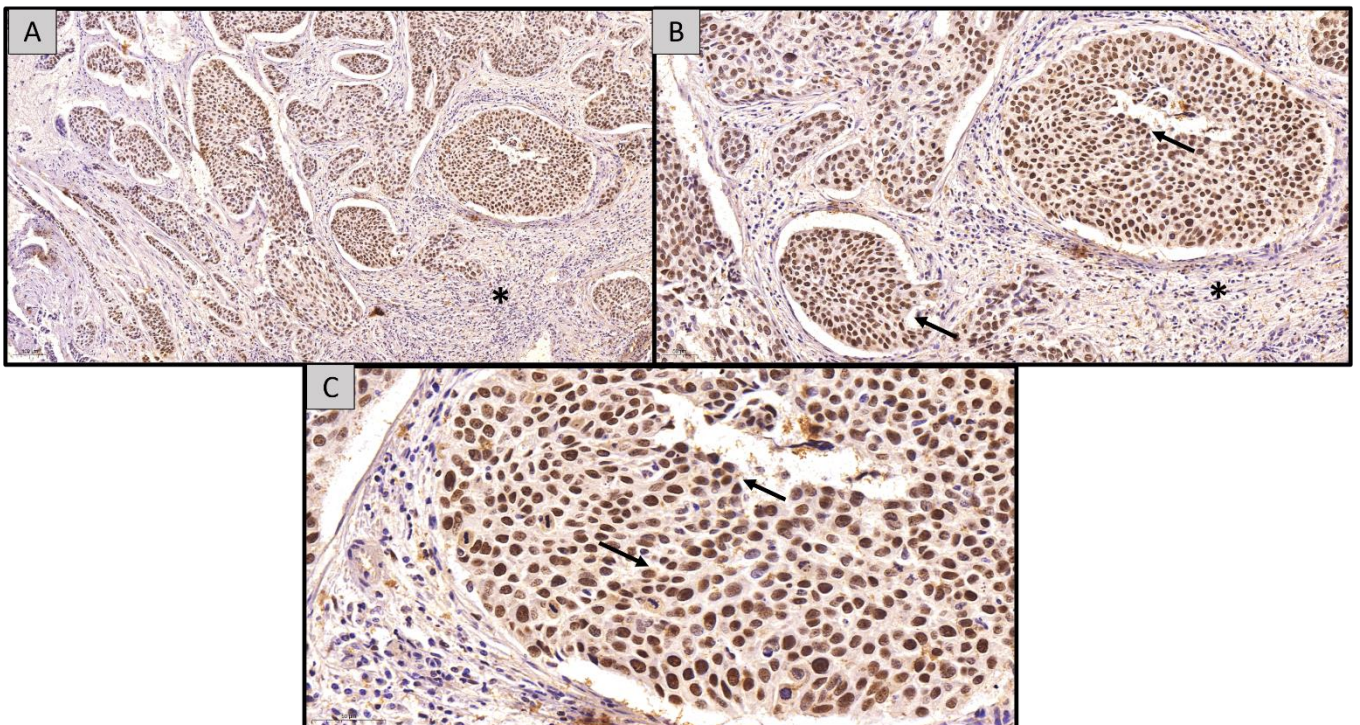


Figura 16: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostra de Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado utilizando-se a técnica de Imuno-histoquímica. As imagens obtidas pelo scanner de lâminas 3D HISTECH, nos aumentos de 10X, 200X e 400X são representadas pelas figuras A, B e C, respectivamente. Nas figuras 17A, B e C do grupo Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado há presença de massas tumorais que invadiram o estroma do tecido cervical formadas por células epiteliais alteradas, com atipias celulares, de formato e tamanho regular (setas). Observa-se nas imagens que há presença de Infiltrado inflamatório no estroma circundante (*). A Imunomarcção para MCM7 é verificada nos núcleos das células localizadas dentro das massas de câncer, núcleos esses marcados em marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB).

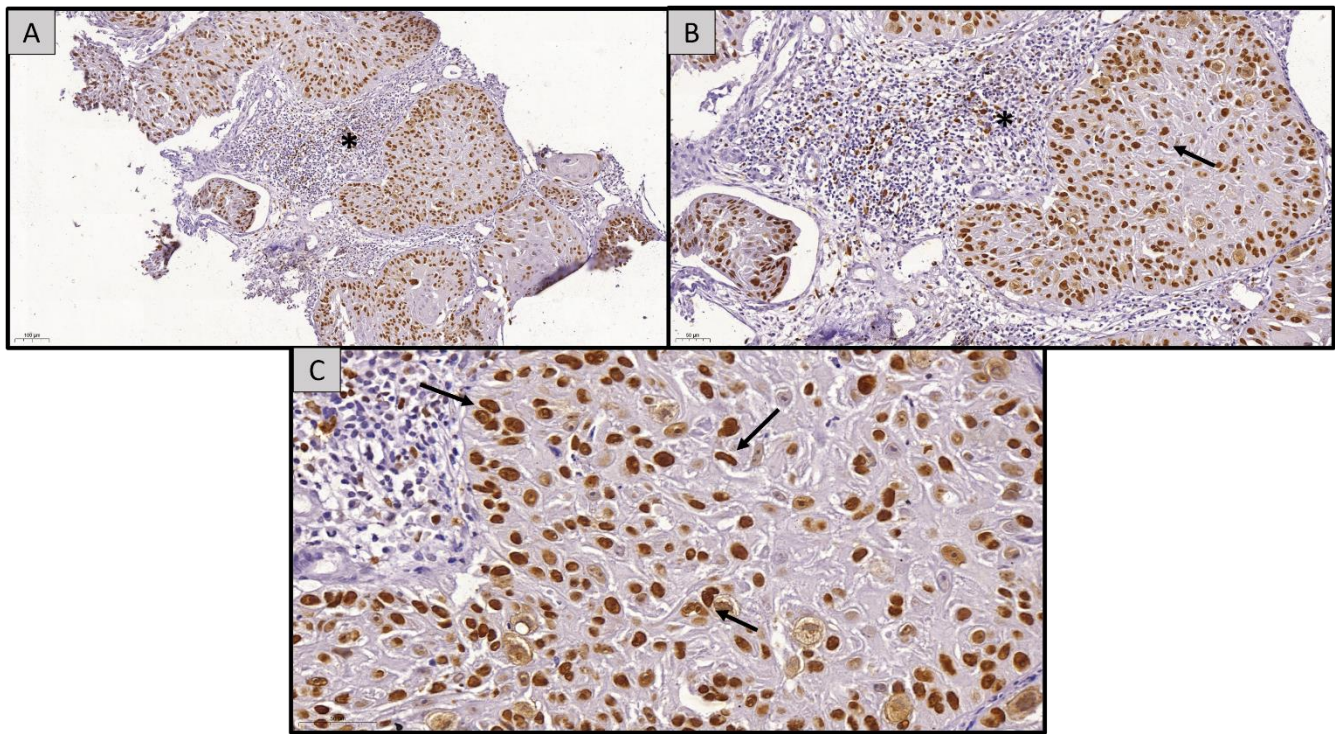


Figura 17: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostra de Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado utilizando-se a técnica de Imuno-histoquímica. As imagens obtidas pelo scanner de lâminas 3D HISTECH, nos aumentos de 10X, 200X e 400X são representadas pelas figuras A, B e C, respectivamente. Nas figuras 18A, B e C do grupo Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, há presença de células tumorais com diferentes graus de atipia, com formato e tamanho irregulares (setas). Observa-se presença de intenso Infiltrado inflamatório (*) circundando as massas tumorais que invadiram o estroma do tecido cervical. A Imunomarcção para MCM7 é verificada nos núcleos das células localizadas dentro das massas de câncer, núcleos esses marcados em marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB).

5.6. Avaliação morfométrica de células marcadas e não-marcadas por MCM7

Após a Imuno-histoquímica para MCM7 em todas as amostras de tecido cervical com Cervicite e com CCU foi realizada a contagem de células do epitélio marcadas e não marcadas para essa proteína em toda a extensão do epitélio normal das amostras controles, e a contagem de células MCM7 positivas e negativas em todas as áreas de lesão invasora das amostras de carcinoma.

Nas tabelas 5, 6 e 7 estão representados os resultados da contagem de células positivas para a proteína MCM7, além do número de células totais contadas no epitélio do grupo de Cervicite, e na área de lesão (mm²) dos grupos CCEP e CCEM, respectivamente. É importante ressaltar que neste trabalho foram consideradas células positivas para MCM7, todas as células epiteliais com forte marcação nuclear para a proteína. Nas amostras de câncer, além da forte marcação nuclear, as células positivas deveriam apresentar alterações morfológicas.

Tabela 5 – Contagem de células positivas para MCM7 e presença do DNA-HPV e do HPV16 no grupo de Cervicite.

Nº da Amostra	Área total do epitélio	Nº total de células contadas marcadas e não marcadas para MCM7 em todo o epitélio normal	Nº de células marcadas para MCM7	Porcentagem de células marcadas para MCM7	Presença do DNA-HPV	Presença do HPV16
1	1,2 mm ²	4865	1433	28,37%	-	-
3	1,1 mm ²	2276	986	43,32%	+	-
4	4,4 mm ²	15032	4612	30,68%	+	-
5	0,9 mm ²	3204	1716	53,55%	+	-
7	1,3 mm ²	4622	308	6,66%	+	-
8	3,7 mm ²	9543	4370	45,79%	+	-
9	1,4 mm ²	3940	2245	56,97%	+	-
11	0,7mm ²	2310	1434	62,07%	-	-
12	0,2 mm ²	732	88	12,02%	-	-
13	0,9 mm ²	4062	1801	44,33%	-	-
14	1,1 mm ²	3203	2285	71,33%	-	-
17	1,1 mm ²	3846	920	23,92%	-	-
18	1,7 mm ²	3672	983	26,77%	-	-
19	1,2 mm ²	1246	609	48,87%	-	-
20	0,1 mm ²	458	240	52,40%	+	-

Tabela 6 – Contagem de células positivas para MCM7 e presença do DNA-HPV e do HPV16 no grupo do Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP).

Nº da Amostra	Área total da lesão	Nº total de células contadas marcadas e não marcadas para MCM7 em todas as áreas lesionadas	Nº de células marcadas para MCM7	Porcentagem de células marcadas para MCM7	Presença do DNA-HPV	Presença do HPV16
15	2,2 mm ²	24203	10489	43,33%	-	-
17	29,3 mm ²	104056	53617	51,52%	+	+
18	7,2 mm ²	51372	17966	34,97%	+	-
21	21,1 mm ²	127188	17503	13,76%	-	-
38	4,5 mm ²	25661	23642	92,13%	+	-
39	23,6 mm ²	174130	113195	65%	-	-
40	30,6 mm ²	115009	29053	25,26%	+	+
41	21,6 mm ²	106409	58912	55,36%	-	-
44	7 mm ²	72574	48273	66,51%	+	+
47	8,7 mm ²	93671	41694	44,51%	+	+
50	1,6 mm ²	20695	19305	93,28%	+	+
52	11,8 mm ²	48137	16792	34,88%	+	+
54	45,2 mm ²	464328	282024	60,73%	+	+
58	12,9 mm ²	104342	90437	86,67%	+	+
62	47,1 mm ²	208925	186030	89,04%	+	+
72	19,6 mm ²	53499	18008	33,66%	+	-
73	24 mm ²	173027	88945	51,35%	+	-
74	39 mm ²	105774	66489	58,20%	-	-
75	106,7 mm ²	287769	227940	79,20%	+	+

Tabela 7 – Contagem de células positivas para MCM7 e presença do DNA-HPV e do HPV16 no grupo do Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM).

Nº da Amostra	Área total da lesão	Nº total de células contadas marcadas e não marcadas para MCM7 em todas as áreas lesionadas	Nº de células marcadas para MCM7	Porcentagem de células marcadas para MCM7	Presença do DNA-HPV	Presença do HPV16
1	11,9 mm ²	156664	38836	24,70%	+	+
2	1,6 mm ²	20855	5186	24,86%	+	+
3	18,1 mm ²	158991	47954	30,16%	+	+
4	5,8 mm ²	49545	15703	31,69%	+	+
5	4,5 mm ²	47158	30211	64,06%	+	+
6	1,7 mm ²	17077	8265	48,39%	+	+
9	12,9 mm ²	49829	12120	24,32%	+	+
12	11 mm ²	74652	36731	49,20%	+	+
13	2,5 mm ²	20316	12122	59,70%	+	+
16	2,5 mm ²	15250	14777	96,89%	-	-
19	4,3 mm ²	45612	37774	82,81%	-	-
22	4,6 mm ²	32213	13710	42,56%	+	-
23	2 mm ²	19379	12193	62,91%	+	-
24	7 mm ²	40419	38007	94,03%	+	-
27	26,9 mm ²	127306	39566	31,07%	+	-
28	13,1 mm ²	113466	103108	90,87%	+	-
34	9,8 mm ²	85183	73670	86,48%	+	+
35	13 mm ²	84679	65542	77,40%	+	+
46	21 mm ²	195888	173729	88,68%	-	-
49	11,6 mm ²	94116	58323	61,96%	+	+
61	20,4 mm ²	118549	114900	96,90%	+	+
64	21 mm ²	155694	140092	89,97%	+	-
68	13,7 mm ²	46688	31051	66,50%	-	-
71	5,6 mm ²	18170	9163	50,42%	+	+

Os resultados obtidos neste trabalho relativos à determinação do número de células epiteliais normais (amostras controle) e alteradas (amostras de câncer), marcadas e não-marcadas para MCM7, e à determinação da presença da infecção pelo HPV foram submetidos à análise estatística segundo os parâmetros: (i) diferenças da Celularidade entre os grupos de amostras; (ii) diferenças da Imunomarcagem por MCM7; e (iii) possível associação da presença do HPV e do HPV 16 nas amostras de tecido cervical e a marcação para MCM7.

5.6.1. Análise da celularidade nas amostras de tecido cervical normal e alterado

A celularidade de um tecido está relacionada com o número de células que o constitui, podendo indicar o nível de proliferação do tecido em questão. Portanto, com o objetivo de investigar a existência de possível diferença de proliferação celular nas amostras cervicais normais (controle) e nos carcinomas, dados relativos ao Parâmetro Celularidade foram analisados pelos testes estatísticos de *Mann-Whitney* (Teste t) e de Correlação de *Spearman*.

A diferença de celularidade observada entre o grupo controle (n=15) e o grupo de CCU (n=43) foi estimada: (i) da área total do epitélio normal e das células epiteliais alteradas dos tumores invasivos (Figura 18); (ii) do número de células totais contadas entre controle e câncer (Figura 19); e (iii) do número de células epiteliais por mm² entre as amostras de cervicite e câncer (Figura 20). Pode-se observar que houve diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os grupos controle e CCU em relação à área de células contadas (Figura 18), ao número total de células contadas no epitélio normal e nas massas de câncer (Figura 19), e ao número de células contadas por mm² (Figura 20). Portanto, verifica-se que amostras de CCU apresentam maior celularidade quando comparadas às amostras do grupo Cervicite utilizadas como controle.

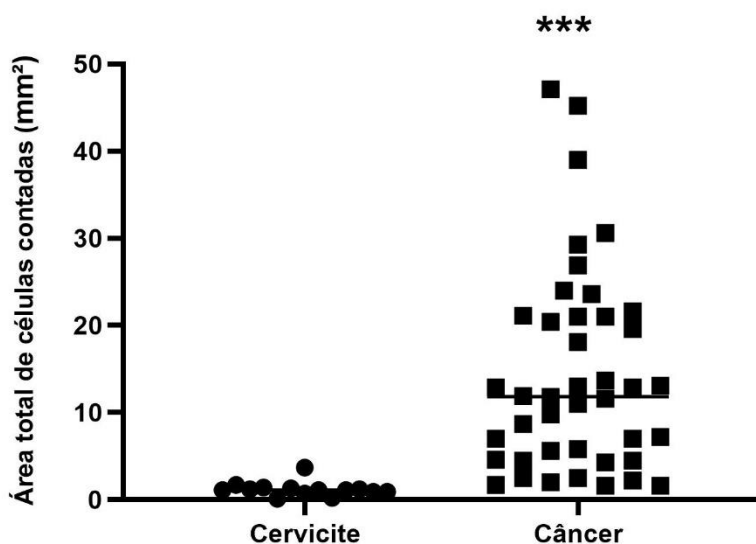


Figura 18: Comparação da área total do epitélio normal em Cervicite e da lesão invasora em amostras de câncer. Observa-se diferença da área de células epiteliais contadas (mm²) entre o grupo de amostras de Cervicite (controle) e o grupo de amostras de Câncer do colo uterino (CCU); teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$.

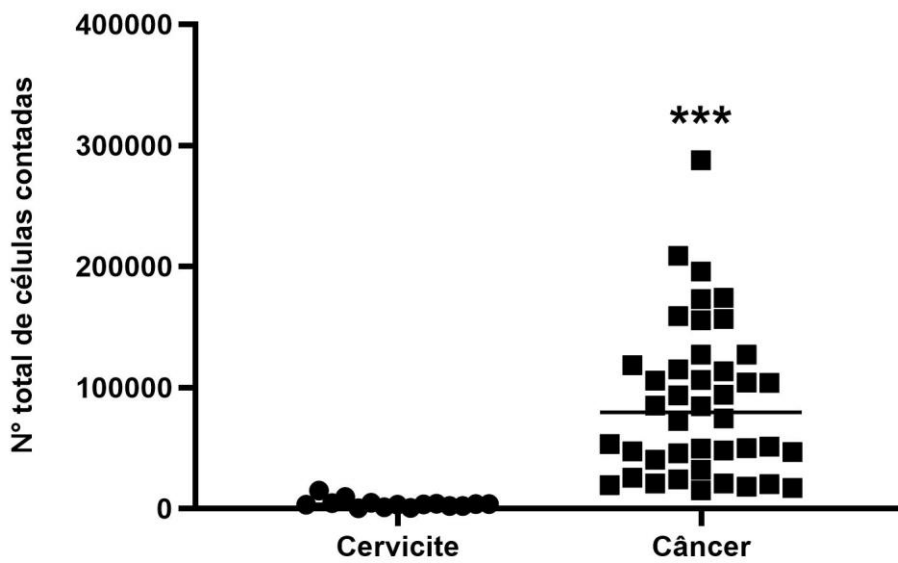


Figura 19: Comparação do número total de células epiteliais contadas no epitélio normal e na lesão invasora. Pode-se observar a diferença da quantidade total de células epiteliais, marcadas e não marcadas por MCM7. Nas amostras de Cervicite foram contadas células epiteliais normais em toda a extensão do epitélio, e nas amostras de CCU presentes nas massas de câncer foram contadas células epiteliais alteradas; teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$.

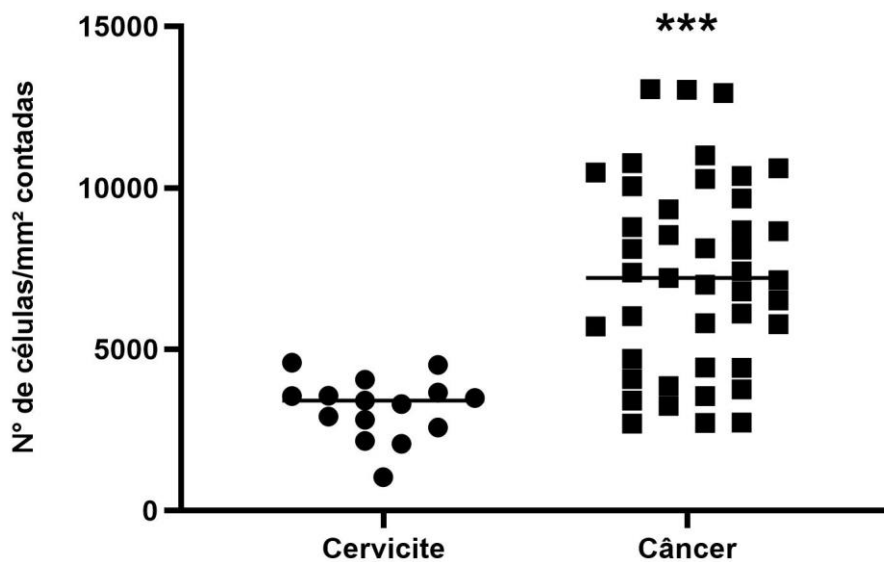


Figura 20: Comparação da relação de células epiteliais por mm² em amostras de Cervicite e do Câncer do Colo do Útero. Verifica-se possível diferença da quantidade de células totais por mm² em amostras controle (Cervicite) e em amostras de Câncer do Útero; teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$.

Analisamos também a possível diferença de Celularidade existente entre os dois grupos de Carcinomas de Células Escamosas, pouco (CCEP) (n =19) e moderadamente (CCEM) (n= 24) diferenciados pelos parâmetros: (i) área total de células epiteliais alteradas (Figura 21), e (ii) correlação do número total de células nos dois grupos de Carcinoma (Figura 22).

Observa-se diferença significativa com relação à área total lesionada entre os grupos CCEP e CCEM ($p = 0,0069$) (Figura 21). A análise de possível correlação entre o número total de células de câncer contadas nas áreas lesionadas e o grau de diferenciação dos tumores (1= Pouco diferenciado e 2= Moderadamente diferenciado) não mostrou significância estatística (Figura 22). No entanto, é possível observar uma tendência maior em relação ao número total de células epiteliais alteradas no grupo CCEP quando comparado ao grupo CCEM; Correlação de Spearman r ($r = -0,2943$ e $p=0,0554$).

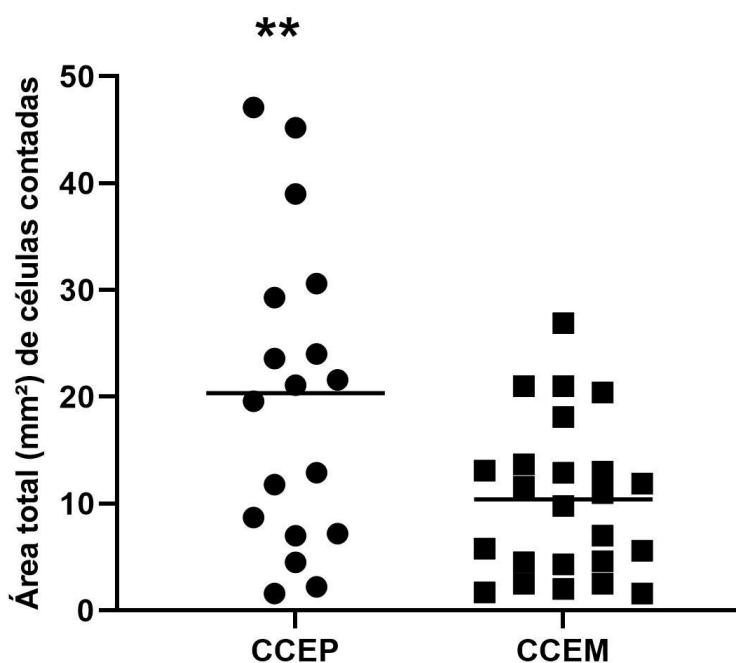


Figura 21: Comparação da área total de lesão entre os Carcinomas de Células Escamosas pouco (CCEP) e moderadamente (CCEM) diferenciados. Verifica-se a diferença estatística entre a área total da lesão tumoral entre as amostras de carcinomas classificadas histopatologicamente como pouco e moderadamente diferenciados (Teste de *Mann-Whitney*, $p=0,0069$).

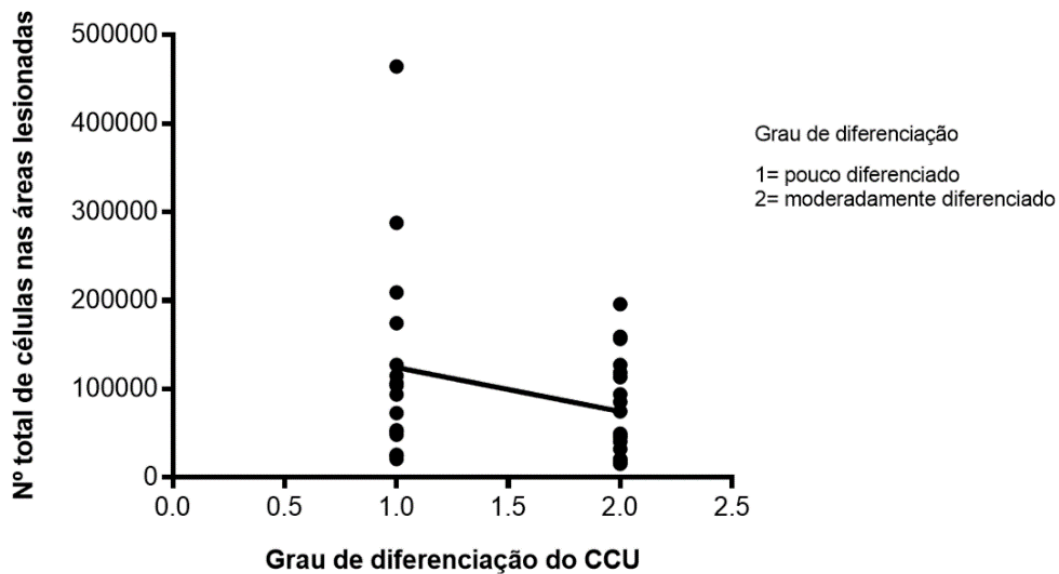


Figura 22: Correlação do número total de células epiteliais alteradas nas áreas de lesão e o grau de diferenciação dos tumores. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos. Porém, é possível observar uma tendência maior quanto ao número total de células contadas nas áreas de lesão no grupo de Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado em comparação com o grupo moderadamente diferenciado (teste de *Spearman* $r = -0,2943$ e de $p=0,0554$).

5.6.2. Análise da Imunomarcção por MCM7 entre Cervicite, Carcinoma de células escamosas pouco e moderadamente diferenciados.

Com o objetivo de verificar a possível diferença da Imunomarcção da proteína MCM7 nos grupos de tecido cervical foi realizado o tratamento estatístico dos valores de marcação por MCM7 entre o grupo de Cervicite e CCU, e entre o grupo de Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP) e moderadamente diferenciado (CCEM).

A análise realizada através do teste de *Mann-Whitney* (Teste t) para verificar a diferença entre as amostras de Cervicite ($n=15$) e CCU ($n=43$) foi baseada nos seguintes parâmetros: (i) número total de células marcadas para MCM7 (Figura 23), e (ii) porcentagem de células marcadas para MCM7 (Figura 24). Ao analisar os resultados obtidos, observa-se diferença estatística em relação ao número de células marcadas para MCM7 entre os grupos Cervicite (controle) e CCU ($p < 0,0001$) (Figura 23). Além disso, verificou-se diferença estatística entre os grupos controle e CCU quanto à porcentagem de células marcadas para MCM7 ($p=0,0118$) (Figura 24). Portanto, amostras de CCU apresentam maior imunomarcção para MCM7 quando comparadas às amostras de Cervicite (controle).

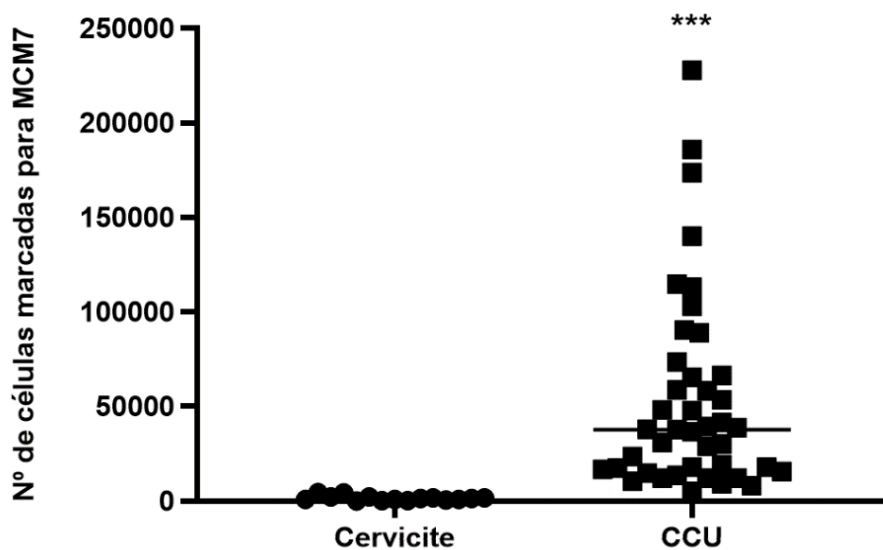


Figura 23: Comparação do número de células marcadas para MCM7 entre o grupo de Cervicite e o de Câncer do Colo do Útero (CCU). Observa-se diferença estatística entre os grupos analisados, onde o Carcinoma cervical apresenta maior quantidade de células marcadas para MCM7 (teste de *Mann-Whitney* com valor de $p < 0,0001$).

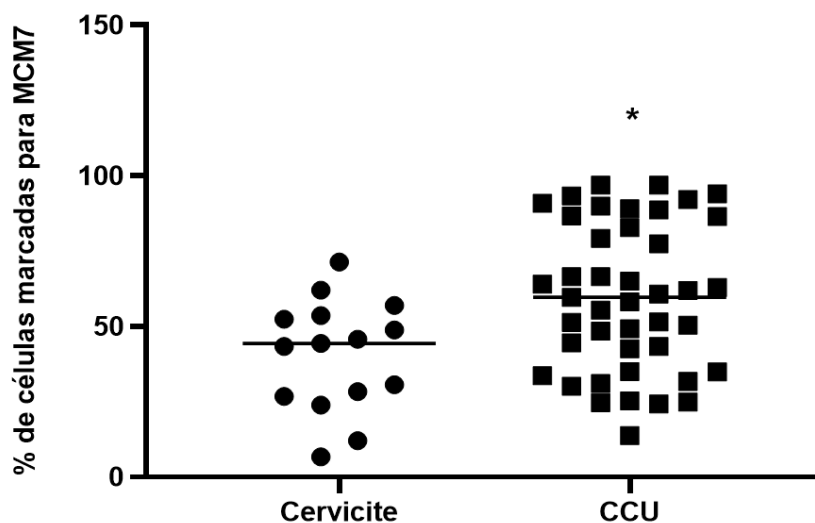


Figura 24: Comparação da percentagem de células marcadas para MCM7 entre o grupo de Cervicite e o grupo de Câncer do Colo do Útero (CCU). A percentagem de células marcadas para MCM7 foi calculada através da razão entre o número de células epiteliais positivas para o marcador e o número total de células epiteliais de toda a área lesionada, multiplicado por 100. Observa-se diferença estatística entre a percentagem de células marcadas para a proteína MCM7 nos dois grupos. As amostras diagnosticadas com Carcinoma Cervical apresentaram maior percentagem de marcação para a proteína em análise (teste de *Mann-Whitney* com valor de $p = 0,0118$).

Adicionalmente, foi verificada a Correlação da razão entre o número total de células epiteliais marcadas para MCM7, e (i) o número total de células epiteliais sem alterações no grupo Cervicite (Figura 24A, Anexo 5), e (ii) o número total de células epiteliais alteradas no grupo CCU (Figura 24B, Anexo 5). O resultado dessas análises mostrou correlação existente entre os dois parâmetros de interesse para o grupo de Cervicite ($r= 0,6143$ e $p= 0,0003$) e para o grupo de CCU (teste de Correlação *Spearman* $r= 0,8318$ e $p< 0,0001$).

Após as análises entre os grupos controle e CCU, realizamos por meio dos testes estatísticos de *Mann-Whitney* (Teste T) e Correlação de *Spearman* r a comparação da Imunomarcagem para MCM7 entre as amostras de CCEP ($n=19$) e CCEM ($n=24$). Essa análise teve por objetivo comparar o padrão de marcação da proteína para esses dois tipos de carcinomas, e assim, verificar se MCM7 poderia ser utilizado como Biomarcador do grau de diferenciação do câncer cervical, com potencial para distinguir carcinomas com graus distintos de diferenciação, e, de certo modo, de agressividade.

Dessa forma, foram comparados o seguinte parâmetro entre as duas categorias de tumor (i) o número de células de câncer marcadas para MCM7 entre os grupos de carcinomas (Fig. 25). E dentro de cada categoria individual de câncer: (ii) correlação do número de células de câncer positivas para MCM7 no CCEP e o número total de células de câncer contadas na área da lesão invasora (Fig. 26); (iii) correlação do número de células de câncer positivas para MCM7 no CCEM e o número total de células de câncer contadas na área da lesão invasora (Fig. 27); (iv) correlação do número de células de câncer positivas para MCM7 no CCEP e a área lesionada (Fig. 28); e (v) correlação do número de células de câncer positivas para MCM7 no CCEM e a área lesionada (Fig. 29).

Ao compararmos o número de células marcadas para MCM7 nos grupos CCEP e CCEM (Figura 25) não foi observada significância estatística ($p=0,1063$) em relação a esse parâmetro. No entanto observa-se no gráfico a tendência de o grupo de amostras de CCEP apresentar uma quantidade maior de células marcadas quando comparado ao CCEM (Figura 25). Sobre a análise da possível correlação entre o número de células marcadas para MCM7 e o número total de células contadas em toda a área lesionadas, em ambos os grupos de Carcinoma, observa-se que há diferença estatística nas duas análises realizadas (Figuras 26 e 27). Além disso, verifica-se a presença de significância estatística entre o número de células marcadas para MCM7 e a área lesionada em CCEP ($r=0,7544$ e $p=0,0003$) e CCEM ($r=0,8113$ e $p<0,0001$), (Figuras 28 e 29).

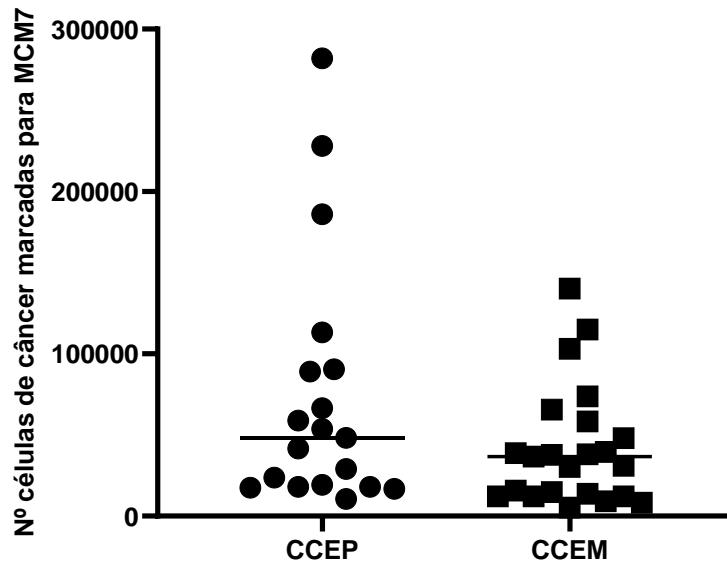
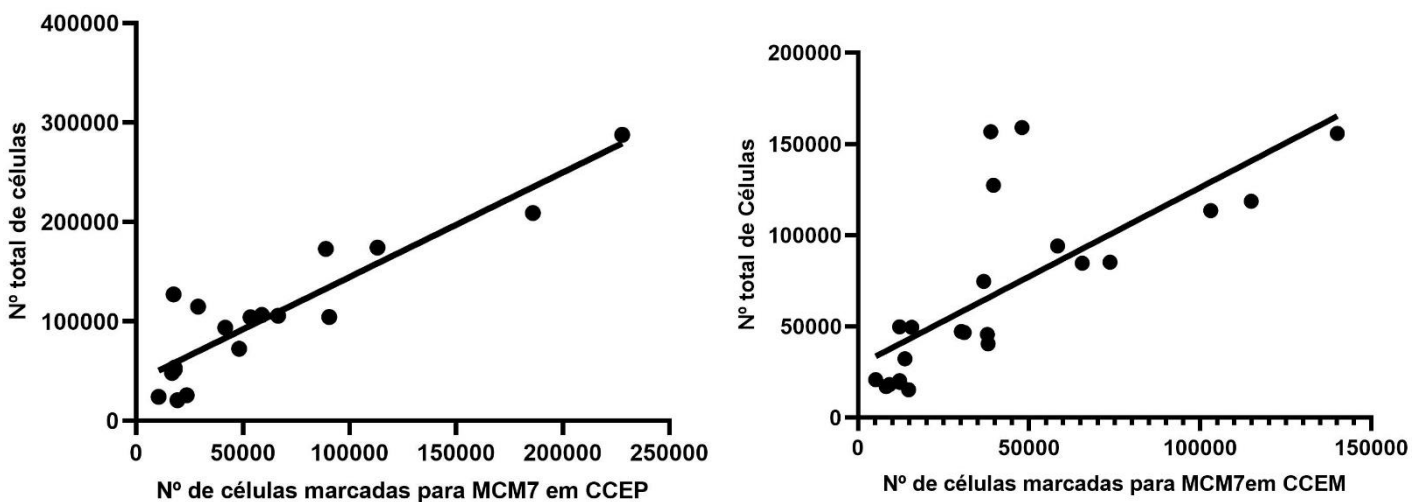
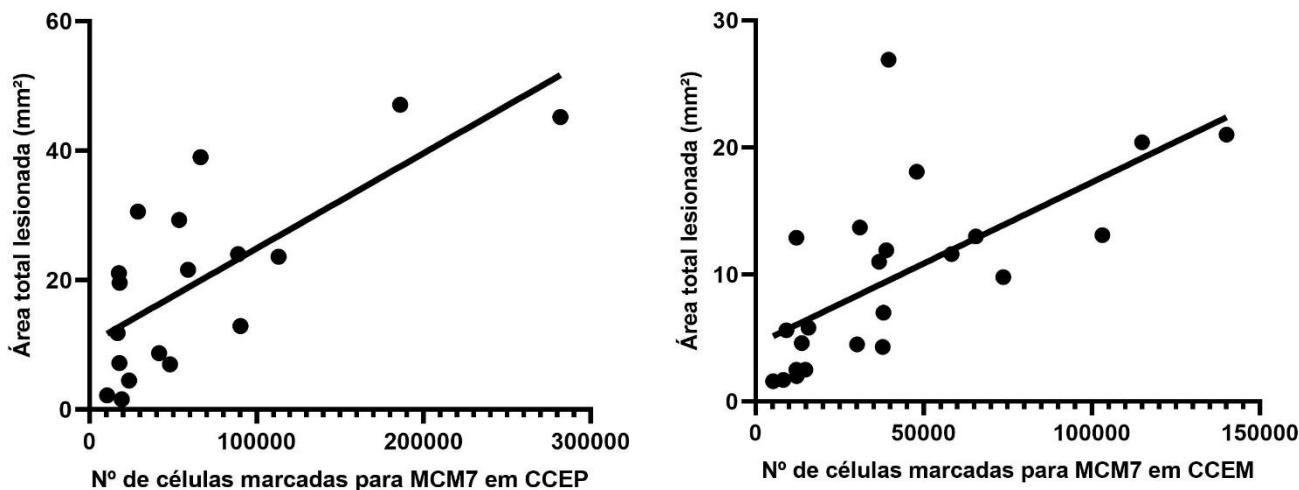


Figura 25: Comparação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinomas de Células Escamosas pouco (CCEP) e moderadamente (CCEM) diferenciados. Observa-se que apesar de haver uma tendência de as amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado apresentarem maior número de células marcadas para MCM7, não há diferença estatística entre o número de células câncer marcadas pela proteína MCM7 entre as amostras de carcinoma cervical pouco e moderadamente diferenciadas (Teste de *Mann-Whitney* com o $p=0,1063$).



Figuras 26 e 27: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco (Fig.26) e moderadamente (Fig. 27) diferenciados, e o número de células contadas nas áreas de lesão. Observa-se no gráfico da esquerda que há correlação existente entre a quantidade de células de câncer marcadas para MCM7 em CCEP e o número total de células contadas em toda a área de lesão tumoral (teste de *Spearman*, $r=0,7544$ e $p=0,0003$). No gráfico da direita verificou-se presença de correlação entre a quantidade de células de câncer marcadas para MCM7 em CCEM e o número total de células contadas em toda a área de lesão (teste de *Spearman*, $r=0,8113$ e $p<0,0001$).



Figuras 28 e 29: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco (Fig. 28) e moderadamente (Fig. 29) diferenciados, e a área total da lesão (em mm²). Observa-se no gráfico *da esquerda* que há correlação existente entre a quantidade de células de câncer marcadas para MCM7 em CCEP e a área de lesão tumoral (teste de *Spearman*, $r=0,6760$ e $p=0,0021$). No gráfico *da direita* verificou-se presença de correlação significativa entre a quantidade de células de câncer marcadas para MCM7 em CCEM e a área lesionada (teste de *Spearman*, $r=0,7586$ e $p<0,0001$).

5.6.3. Análise da presença do HPV e do HPV 16 nas amostras de Câncer do Colo do Útero

A presença do DNA do HPV e do DNA do HPV 16 nas amostras de CCU foi analisada com o objetivo de verificar se existiria ou não correlação entre a marcação de MCM7 e a presença de infecção viral dentro de cada grupo de Carcinoma. Portanto, analisamos correlação da presença do DNA do HPV e do HPV16 (considerando 1 = sim para presença viral e 2 = não para a presença viral) nas amostras de CCEP (n=19) e CCEM (n=24) por meio do teste estatístico de *Spearman* r utilizando os parâmetros a seguir: (i) número de células de câncer marcadas para MCM7 no CCEP e a presença do DNA-HPV (Fig. 30); (ii) número de células de câncer marcadas para MCM7 no CCEM e a presença do DNA-HPV (Fig. 31); (iii) número de células de câncer marcadas para MCM7 no CCEP e a presença do DNA-HPV16 (Fig. 32); (iv) número de células de câncer marcadas para MCM7 no CCEM e a presença do DNA do HPV16 (Fig. 33).

Os resultados dessas análises mostraram que não houve correlação estatística entre o número de células de câncer marcadas para MCM7 em ambos os tipos de carcinoma e a presença do HPV. Contudo nos gráficos observa-se que a maioria das células marcadas nas amostras CCEP e CCEM eram positivas para a presença do DNA do HPV (Figuras 30 e 31, respectivamente). Com relação ao

HPV16 nesses dois grupos de amostras, não verificamos correlação estatística entre o número de células positivas para MCM7 nos grupos CCEP e CCEM e a presença do HPV16 (Figuras 32 e 33, respectivamente). Apesar disso, observou-se que amostras de câncer CCEP com maior quantidade de células marcadas para MCM7, apresentaram maior prevalência do HPV16 (Figura 32).

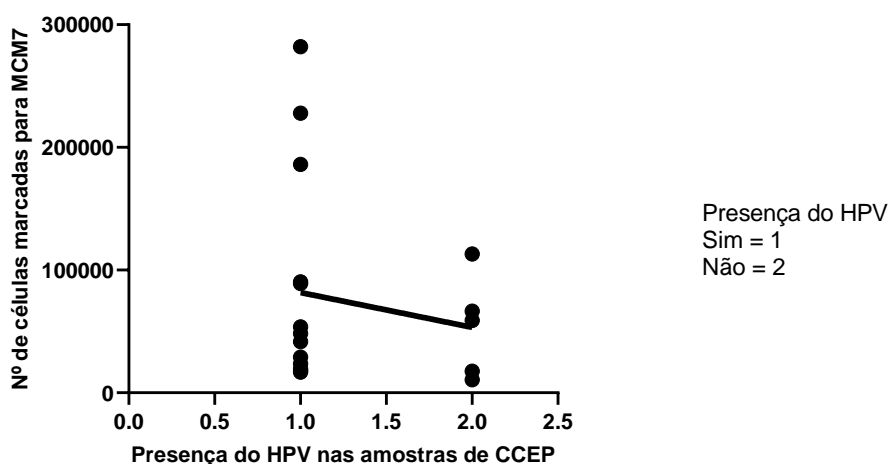


Figura 30: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinomas de Células Escamosas pouco diferenciadas e a presença do DNA do HPV. Observa-se que não houve correlação entre o número de células marcadas no Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado e a presença do DNA do HPV (teste de *Spearman* $r = -0,1091$ e $p=0,6566$). No entanto, houve maior número de amostras de câncer pouco diferenciado que foram positivas para o DNA do HPV com maior quantidade de células marcadas para MCM7.

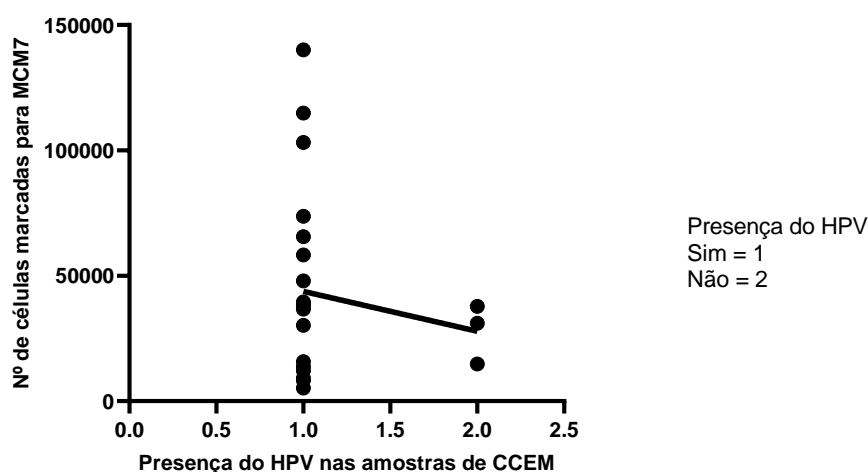


Figura 31: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 entre amostras de Carcinomas de Células Escamosas moderadamente diferenciadas e a presença do DNA do HPV. Observa-se que não houve uma correlação entre o número de células marcadas do Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado e a presença do HPV (teste de *Spearman* $r = -0,07785$ e $p=0,7240$). No entanto, houve maior número de amostras de câncer moderadamente diferenciado com maior número de células positivas para MCM7 que também foram positivas para a presença do DNA-HPV.

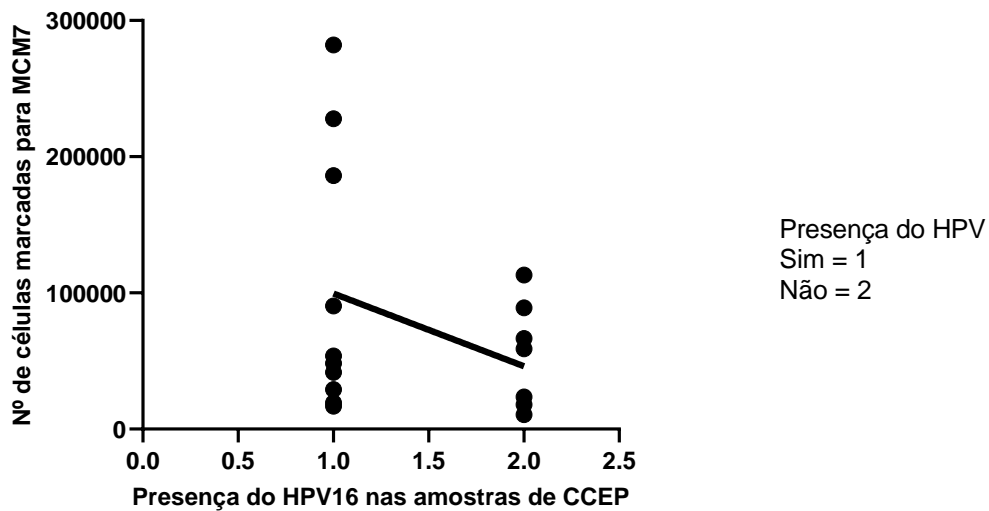


Figura 32: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 em amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado e a presença do DNA do HPV16. Observa-se que não houve uma correlação entre o número de células marcadas por MCM7 no Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado e a presença do HPV16 (teste de *Spearman*, $r = -0,2887$ e $p=0,2307$). Contudo, verifica-se no gráfico, presença do DNA do HPV16 em amostras com maior quantidade de células marcadas para MCM7.

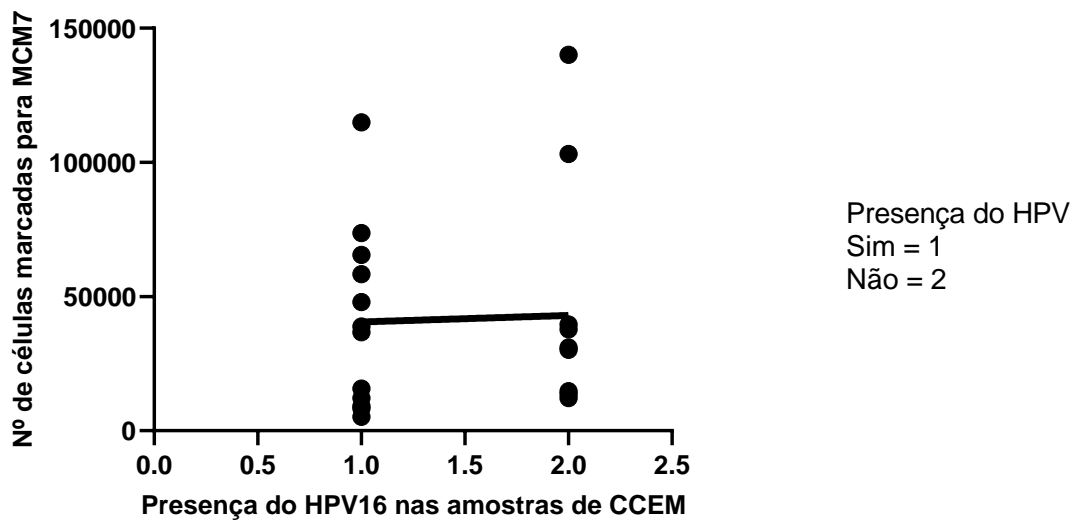


Figura 33: Correlação do número de células de câncer marcadas para MCM7 em amostras de Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado e a presença do DNA do HPV16. Observa-se que não houve correlação entre o número de células marcadas por MCM7 no Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado e a presença do DNA do HPV16 (teste de *Spearman* $r = 0,01312$ e $p=0,9526$).

Com o objetivo de verificar possível diferença existente entre o número de células marcadas para MCM7 em amostras de CCEP testadas pela Biologia Molecular como HPV 16 positivas, e o número de células marcadas para MCM7 em amostras CCEM positivas para o HPV 16, foi realizada análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney* (Teste T). O resultado dessa análise revelou uma tendência da presença do DNA do HPV16 ser maior em amostras de CCEP que apresentaram uma maior quantidade de células marcadas para MCM7 ($p=0,0643$) (Figura 34).

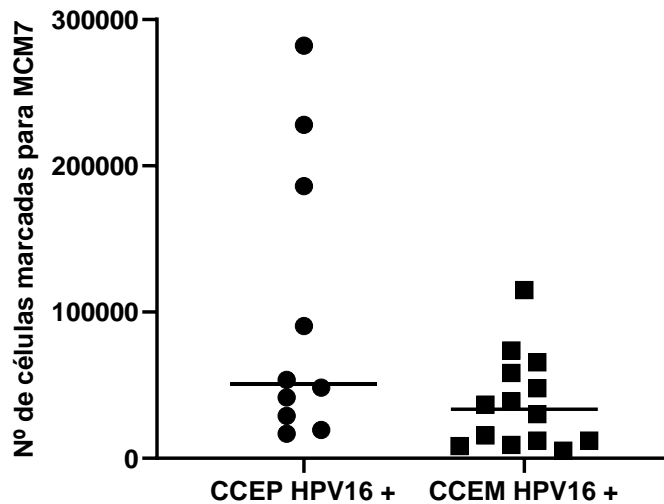


Figura 34: Número de células de câncer marcadas para MCM7 em amostras de Carcinoma de Células escamosas pouco e moderadamente diferenciados que foram HPV16 positivas. Observa-se que apesar de haver uma tendência de as amostras de Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado apresentar maior número de células marcadas para MCM7 HPV16 positivas, não houve diferença estatística entre a quantidade de células de câncer marcadas pela proteína MCM7 e a presença do DNA do HPV16, (teste de *Mann-Whitney* com o $p=0,0643$).

6. DISCUSSÃO

Investigou-se, no presente estudo, a Imunomarcagem da proteína MCM7 em amostras de CCU humano e sua correlação (i) com o grau de diferenciação do tumor (pouco ou moderadamente diferenciado), e (ii) com a infecção pelo HPV16 de alto-risco oncogênico. Assim, observamos que há maior celularidade em amostras de CCU quando comparadas às amostras de Cervicite. Além disso, os grupos de CCEP e de CCEM apresentam correlação entre o número de células marcadas para MCM7 e o número de células contadas em toda a área de lesão e, nesses dois grupos há também correlação entre o número de células marcadas para MCM7 com o tamanho da área de lesão. Observou-se nesse estudo, (i) um aumento não significativo da marcação de MCM7 em amostras classificadas como CCEP, e que, (ii) o grau de diferenciação das amostras de CCU e a marcação por MCM7 podem estar relacionados com a presença do DNA do HPV e/ou do DNA do HPV16.

Diversas moléculas têm sido avaliadas quanto ao seu uso potencial como biomarcadores de prognóstico em diferentes tipos de carcinomas como: a PD-L1 no carcinoma (adenocarcinoma) de pulmão (SHINCHI *et al.*, 2019) e no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (MULLER *et al.*, 2017); a ciclina-D1 e o fator de crescimento VEGF-A no carcinoma de língua (ALMANGUSH *et al.*, 2017), as proteínas p16 e p53 no câncer de vulva (SAND *et al.*, 2018), entre outros. A expressão aumentada de proteínas MCMs já foi verificada em grande parte dos tumores e dos estados proliferativos pré-malignos (HIRAIWA *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN, *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009; KWOK *et al.*, 2015; QU, *et al.*, 2017). A proteína MCM7 tem sido alvo de diferentes estudos como um marcador potencial de células neoplásicas (KEATING *et al.*, 2001; GRAFLUND *et al.*, 2004; LOBATO, 2012; DAS *et al.*, 2018).

Sabe-se que a atividade das proteínas MCMs, incluindo a MCM7, é essencial para o controle da replicação do DNA na divisão de células e, portanto, a localização nas células dessa proteína é nuclear (BELL & DUTTA, 2002; BLOW & DUTTA, 2005; NEVES & KWOK, 2017; PARKER, 2017; ISHIMI, 2018). BRAKE e colaboradores (2003) utilizando amostras parafinadas de tecido cervical normal, de lesões intraepiteliais (NIC I, II ou III), e de amostras de CCU originadas de camundongos transgênicos observaram por meio da técnica de Imuno-histoquímica a marcação nuclear positiva para a proteína MCM7 nas camadas basais e parabasais do epitélio normal, e em células alteradas nos tecidos lesionados. Esse padrão de marcação para MCM7 também foi observado no estudo de ZHANG e colaboradores (2013) em

biópsias de tecidos cervicais humanos. Tais estudos, corroboram nossos achados de que MCM7 se encontra exclusivamente localizado no núcleo das células epiteliais das camadas basais e parabasais das amostras cervicais, que correspondem à zona de proliferação do epitélio normal. Observou-se também marcação de MCM7 em núcleos de células epiteliais alteradas que formam as massas invasivas de câncer nas amostras de CCU.

Como a atividade das MCMs é de extrema importância para a replicação do DNA na divisão de células, essas proteínas são excelentes marcadores para proliferação. Alguns trabalhos avaliaram especificamente a expressão de MCM7 como marcador de proliferação, e entre eles destacam-se aqueles que utilizaram essa proteína como indicadores de proliferação em diversos tipos de neoplasias como o câncer de cólon (NISHIHARA *et al.*, 2008), de próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; LAITINEN *et al.*, 2008), de endométrio (LI *et al.*, 2005), da cavidade oral (TAMURA, 2010), de esôfago (ZHONG, *et al.*, 2015), de laringe (ALMADORI, *et al.*, 2017), do fígado (QU, *et al.*, 2017), e do estômago (adenocarcinoma gástrico) (YANG, 2018). Contudo, poucos trabalhos analisaram a produção de MCM7 em tecidos cervicais de pacientes (BRAKE *et al.*, 2003; MIDDLETON 89 *et al.*, 2003; LOBATO *et al.*, 2012; ZHANG, J. *et al.*, 2013) e de camundongos (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006). Destaca-se que na maior parte desses estudos não foi realizada a análise de amostras de CCU.

A celularidade está relacionada à proliferação de um tecido, uma vez que por definição, celularidade é o estado de um tecido relativamente ao número de células que o constitui, e assim podemos avaliar o nível de proliferação do tecido em questão. Em nosso estudo verificou-se significativa diferença de celularidade entre as amostras de Cervicite e de CCU. Assim, observou-se nas amostras de CCU: (i) maior quantidade de células marcadas para MCM7, (ii) maior quantidade de células por mm² e, (iii) maior área de marcação por MCM7, quando comparado às amostras de tecido cervical normal. Os resultados observados são devido à alta taxa de proliferação das células de câncer constituintes das massas tumorais, contribuindo à alta celularidade observada nesses carcinomas.

Com relação à Imunomarcção de MCM7, nosso estudo demonstrou diferença de marcação entre as amostras do grupo Cervicite e do grupo CCU. Amostras de Cervicite exibiram marcação para MCM7 apenas nas camadas proliferativas do epitélio normal. Amostras do grupo CCU apresentaram uma maior quantidade de células positivas para MCM7, devido à grande extensão das lesões e à alta capacidade de proliferação das células de câncer.

No estudo de meta análise conduzido por GOU e colaboradores (2018) demonstrou-se que a expressão positiva ou elevada de MCM2, MCM5 e MCM7 estava associada a um pior prognóstico em diferentes tumores. Com relação a proteína MCM7 observou-se relação da mesma com parâmetros desfavoráveis ao câncer como maior proliferação celular, pior estágio clínico do tumor e presença de metástase linfática, enfatizando o potencial de MCM7 como um excelente biomarcador de prognóstico do câncer.

Outros trabalhos na literatura apresentam resultados promissores em relação ao potencial de MCM7, como excelente biomarcador de prognóstico em diferentes tipos de carcinomas. Como uma das principais moléculas reguladoras na replicação do DNA, a expressão anormal de MCMs é observada em muitos tipos de tumores, e se relaciona à presença de um pior prognóstico. Zhong e colaboradores (2015) observaram em amostras de carcinoma esofágico, que a proteína MCM7 apresentou marcação nuclear positiva em quase todas as células de câncer presentes em casos classificados como pouco e moderadamente diferenciados, demonstrando que todas as células neoplásicas de tumores mais agressivos estavam em um estado licenciado de replicação. No entanto, em casos bem diferenciados observou-se redução na porcentagem de células positivas para MCM7, sugerindo que nem todas as células malignas dos tumores diferenciados estavam em estado licenciado para a replicação.

Adicionalmente, Qu e colaboradores (2017) verificaram que no carcinoma hepatocelular (HCC) a alta expressão da proteína MCM7 está associada ao pior prognóstico dos pacientes portadores desse tipo de câncer. Por meio do aumento da indução de MCM7 foi observado o aumento da proliferação de linhagens celulares de carcinoma hepatocelular, em experimentos de transfecção realizados *in vitro*. Além disso, verificou-se um maior aumento da tumorigenicidade em camundongos que apresentavam células transfectadas com o gene clonado de MCM7, quando comparado com camundongos que apresentavam células silenciadas para o RNAm de MCM7. Maior nível da síntese da proteína foi relacionado a um pior prognóstico do HCC. Portanto, os autores do estudo argumentaram que, sendo MCM7 responsável por controlar o início da replicação do DNA, sua ação pode contribuir para a tumorigênese induzida por oncogene. Em conclusão, no HCC a maior expressão de MCM7 estaria relacionada à alta capacidade proliferativa das células no estágio inicial do câncer. Porém, nos pacientes com câncer em estágio avançado, fatores como o tamanho do tumor, a invasão vascular ou de linfócitos, podem afetar o valor de MCM7 como biomarcador de prognóstico no HCC (QU *et al.*, 2017).

Como destacado, até onde se sabe, não existem trabalhos descritos na literatura que analisaram a imunomarcação de MCM7 por IHQ em amostras de CCU para distinguir os graus de diferenciação desse tipo de câncer, visando avaliar a possível utilização dessa proteína como um biomarcador de prognóstico do CCU. No entanto, no estudo conduzido por Das e colaboradores (2013), verificou-se em amostras cervicais normais, em amostras de CCU obtidas por biopsia e em linhagens celulares o perfil de expressão das proteínas MCMs por meio da PCR em tempo real. Observou-se que a expressão de MCM7 apresentou diferença significativa entre os tumores e as amostras normais, porém, não houve correlação significativa entre os graus de diferenciação dos estágios do tumor.

Um dos objetivos desse estudo foi verificar se havia diferença de marcação dessa proteína entre os graus de diferenciação do CCU e, portanto, avaliar o uso potencial de MCM7 como biomarcador de prognóstico desse tipo de carcinoma. Verificou-se individualmente nas amostras de CCEP e CCEM: (i) correlação entre o número de células marcadas e o número total de células contadas em todas as áreas de lesão; e (ii) correlação entre o número de células marcadas para MCM7 e o tamanho da área lesionada. Ao analisarmos a diferença do número de células marcadas para MCM7 entre os graus de diferenciação das amostras de CCU, verificou-se que não há diferença estatística em relação a esse parâmetro, entre os grupos CCEP e CCEM. Porém, observou-se que o grupo CCEP apresentou maior número de amostras com grande quantidade de células marcadas para MCM7, quando comparado às amostras do grupo CCEM.

Destaca-se que nosso estudo é o primeiro a avaliar o potencial da proteína MCM7 como biomarcador de diferenciação do câncer cervical. Nossos resultados fortemente sugerem que amostras de CCEP apresentam maior número de células com marcação positiva para MCM7. Nesse tipo de carcinoma há um predomínio de células com maior potencial de proliferação e exibindo menor número de atípias celulares quando comparado às amostras de CCEM (KOSS 2006; PAULINO-JÚNIOR *et al.*, 2011).

É bem estabelecido na literatura o papel do HPV, especialmente dos tipos de alto-risco na patogênese do CCU. Sabe-se, portanto, que nos casos de câncer, o HPV está presente em cerca de 99% das amostras (WALBOOMERS *et al.*, 1999; BURD, 2003; TULAY & SERAKINCI, 2016). No presente estudo a detecção do DNA-HPV foi positiva em 41 amostras de Cervicite e de CCU (70,7%). Observou-se que 46,66% de amostras de Cervicite foram positivas (7/15) para o DNA do HPV; para amostras de CCEP observou-se 73,7% de positividade (14/19), enquanto nas

amostras de CCEM obtivemos 83,3% de positividade para a presença do DNA-HPV (20/24).

Realizou-se no presente estudo a detecção da presença do DNA do HPV16 nas amostras de Cervicite e de CCU. Verificou-se ausência do DNA do HPV16 em amostras de Cervicite. Contudo, a presença do HPV16 foi detectada em 55,81% (24/43) das amostras de CCU. No grupo de amostras classificado como CCEP observou-se 52,63% (10/19) de positividade para o DNA do HPV16, enquanto nas amostras de CCEM a taxa de positividade foi de 58,33% (14/24). No estudo de meta-análise conduzido por SanJosé e colaboradores (2019), baseado em trabalhos epidemiológicos da infecção do HPV realizados em mulheres de todo o mundo, os HPVs de alto-risco 16 e 18 foram os mais prevalentes na cérvix, sendo que a taxa de contribuição do HPV16 para o surgimento de carcinomas foi de aproximadamente 60%, e para o HPV18 de 10,5% (SanJosé, *et al.*, 2019).

Em comparação aos dados da literatura nos quais se verifica maior detecção do DNA do HPV e/ou do HPV16 em amostras de CCU do que aquela descrita em nosso estudo, destaca-se a interferência das etapas de coleta e de processamento de tecidos na eficiência da realização de testes moleculares. As amostras de tecido que foram fixadas em formol e incluídas em parafina apresentam marcantes limitações para o uso em Biologia Molecular devido à sua fixação em formaldeído, que pode causar a degradação e a modificação química dos ácidos nucleicos (MASUDA *et al.*, 1999; VON AHLFEN *et al.* 2007; SEILER *et al.*, 2016). A degradação dos ácidos nucleicos compromete a utilização da técnica de PCR, sendo a pesquisa do DNA alvo de interesse prejudicada pela redução da quantidade e do tamanho dos produtos amplificados (LEHMANN & KREIPE, 2001; DIETRICH *et al.*, 2013; ALVAREZ- ALDANA *et al.* 2015; SEILER *et al.*, 2016).

É de extrema importância a busca por biomarcadores que estejam relacionados com a infecção por HPVs de alto-risco, para o acompanhamento de pacientes com CCU. No trabalho desenvolvido por Garnaes e colaboradores (2016) em amostras de carcinomas de úvula e de língua verificou-se que a presença do DNA do HPV juntamente com a imunomarcagem da proteína P16 foram considerados eficientes marcadores prognósticos nesses tumores, sendo esses resultados considerados promissores para se avaliar o tipo de tratamento aos quais esses pacientes seriam submetidos. Em relação ao tecido cervical, Das e colaboradores (2013) avaliaram em linhagens celulares e em biópsias de carcinoma cervical coletadas em líquido conservante de RNA (RNA *later*®), a presença do DNA-HPV e dos HPVs 16/18 por PCR em tempo real e a sua correlação com a expressão de diferentes MCMs. Observou-se que a maioria das linhagens celulares e a maior parte

das biópsias (71%) foram positivas para o DNA do HPV, e principalmente o HPV16. No entanto, o estudo não demonstrou correlação entre a expressão de nenhuma das MCMs incluindo a MCM7, e a presença do DNA-HPV e/ou dos tipos de HPV.

Em trabalho anterior realizado em nosso grupo por Lobato e colaboradores (2012), investigando a associação entre a imunomarcagem de MCM7 em amostras de tecido normal e NICs e a infecção pelo HPV, verificou-se uma correlação significativa entre as amostras de tecido normal e de lesões intraepiteliais positivas para MCM7 e a presença do DNA viral. Adicionalmente, Brake e colaboradores (2003) observaram por meio da utilização de camundongos transgênicos que super-expressavam a proteína E7 do HPV 16 em células epiteliais, que as células epiteliais de lesões cervicais pré-neoplásicas ou neoplásicas induzidas nesses camundongos apresentavam elevada expressão da proteína MCM7 endógena. Esse resultado fortemente sugere uma correlação direta entre a função de MCM7 e o desenvolvimento da doença cervical por meio da infecção persistente pelo HPV16.

Em nosso estudo não houve correlação entre o número de células de câncer marcadas para MCM7, e a presença do DNA do HPV e/ou do HPV16 nas amostras de CCEP e CCEM. No entanto, foi possível notar uma tendência de amostras de CCEP, que obtiveram resultado positivo para o DNA do HPV e/ou HPV16, exibirem maior número de células marcadas para MCM7. É possível que a qualidade deficiente das amostras de DNA extraído das amostras parafinadas tenha contribuído para os resultados obtidos na Biologia Molecular. Assim, torna-se necessário a realização de estudos adicionais, para que a correlação entre a presença do DNA-HPV16 e a marcação de MCM7 em amostras de CCU com graus distintos de diferenciação seja adequadamente avaliada.

Conclui-se que a proteína MCM7 apresenta importante função na patogênese de tumores, sendo necessária a realização de novos trabalhos visando ampliar o estudo aqui desenvolvido sobre o papel de MCM7 no grau de diferenciação do CCU.

A utilização de MCM7 como marcador de proliferação oferece algumas vantagens sobre outras moléculas usadas como indicadores de proliferação, devido à sua alta especificidade em células neoplásicas (ZHANG, *et al.*, 2013). Além disso, essa proteína constitui parte essencial do complexo pré-replicativo, com importante função no processo de licenciamento da duplicação do DNA, sendo a presença de MCM7 bem caracterizada através de todo o ciclo celular (BELL & DUTTA, 2002; BLOW e DUTTA 2005; NEVES & KWOK, 2017; PARKER, 2017; ISHIMI, 2018). Portanto, as proteínas MCM7 têm sido consideradas excelentes biomarcadores para triagem e prognóstico em diferentes tipos de câncer (PADMANABHAN *et al.*, 2004; LI

et al., 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009; ZHONG, *et al.*, 2015; ALMADORI, *et al.*, 2017; QU, *et al.*, 2017).

Os resultados do nosso estudo sugerem que a proteína MCM7 pode ser considerada excelente marcador de proliferação no CCU, cuja Imunomarcção tecidual pode estar associada aos HPVs, principalmente aos tipos de alto-risco como o HPV16. Assim, a utilização de MCM7 como um biomarcador de agressividade do câncer cervical poderia contribuir como ferramenta complementar aos métodos de diagnóstico histopatológico, principalmente na discriminação dos graus de diferenciação (CCEP e CCEM) desses tumores, contribuindo assim para o acompanhamento, o manejo e a sobrevida das pacientes portadoras de câncer cervical.

7. CONCLUSÕES

- As amostras de CCU apresentam maior celularidade quando comparadas às amostras de Cervicite devido ao maior número de células em proliferação e, conseqüentemente, maior quantidade de células marcadas para MCM7;
- Os grupos CCEP e CCEM apresentam correlação entre o número de células marcadas para MCM7 e o número de células contadas em toda a área de lesão;
- Os grupos CCEP e CCEM apresentam correlação entre o número de células marcadas para MCM7 e o tamanho da área de lesão;
- Observou-se um aumento não significativo da presença de células epiteliais alteradas e marcadas por MCM7 em amostras classificadas como CCEP. Esse aumento pode estar relacionado com maior capacidade de proliferação das células tumorais presentes em amostras desse grupo;
- O grau de diferenciação das amostras de CCU e a marcação por MCM7 podem estar relacionados com a presença do DNA do HPV e/ou do DNA do HPV16.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI Y, USUKURA J, YANAGIDA M. A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. **Genes Cells**. 1997 Jul;2(7):467-79.
- AGOFF, SN; LIN, P; MORIHARA, J; *et al.* p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. **Mod Pathol**. 2003 Jul; 16(7):665-73.
- AHMED SM, AL H, REID WM, JOHNSON MA, POULTER LW. The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects. **Scand J Immunol** 56(2):204-11. 2002.
- AIDÉ, S.; ALMEIDA, G.; VAL, I.; JUNIOR, N. V.; CAMPANER, A. B. DST - **J bras Doenças Sex Transm** v. 21, n. 4, p. 166-170, 2009.
- ALBERTS B. **Biologia Molecular da Célula**. Ed. Artmed. 2010.
- ALISON M.R, HUNT T, FORBES S.J. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. **Gut**. 2002 Mar;50(3):290-1. doi: 10.1136/gut.50.3.290. PMID: 11839701; PMCID: PMC1773123.
- ALMADORI G; LAURIOLA L; COLI A, *et al.* Minichromosome maintenance protein 7 and geminin expression: Prognostic value in laryngeal squamous cell carcinoma in patients treated with radiotherapy and cetuximab. **Head Neck**. 2017;39(4):684-693. doi:10.1002/hed.24670
- ALMANGUSH A, HEIKKINEN I, MAKITIE AA, *et al.* Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Br J Cancer**. 2017;117(6):856-866. doi:10.1038/bjc.2017.244
- ALVAREZ-ALDANA, A.; MARTÍNEZ, J. W.; SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. **Pathol Res Pract**. v. 211, n. 2, p. 150-5, 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, **Early Detection, Diagnosis, and Staging**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/detection-diagnosis-staging.html>>. Acesso em 23 de junho de 2020.

APARICIO OM, WEINSTEIN DM, BELL SP. Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: Redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. **Cell** 1997;91:59–69

ARAÚJO, C.S; LUZ, H.A.; RIBEIRO, G.T.F. EXAME PREVENTIVO DE PAPANICOLAOU: PERCEPÇÃO DAS ACADÊMICAS DE ENFERMAGEM DE UM CENTRO UNIVERSITÁRIO DO INTERIOR DE GOIÁS. **remE – Rev. Min. Enferm.** v. 15, n. 3, p. 378-385, 2011.

ARORA, R; KUMAR, A; PRUSTY, B.K; *et al.* Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types 16 and 18 in healthy women with cytologically negative Pap smear. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2005; 121(1):104-9.

ASHTARIAN, H.; MIRZABEIGI, E.; MAHMOODI, E.; KHEZELI, M. Knowledge about Cervical Cancer and Pap Smear and the Factors Influencing the Pap test Screening among Women. **International journal of community based nursing and midwifery.** v. 5, n. 2, p. 188–195.

BAAK J.P.A, KRUSE A, ROBOY S.J, *et al.* Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. **Journal of Clinical Pathology** 2006;59:1017-1028.

BARROS A, LIMA D, AZEVEDO M, AZEVEDO M, OLIVEIRA M. **Caderno de referência 1: Citopatologia Ginecológica** – Brasília: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: CEPESC, 2012.

BELL, S.P. Eukaryotic replicators and associated protein complexes. **Curr Opin Genet Dev.** 1995 Apr; 5(2):162-7.

BELL, S.P & DUTTA, A. DNA Replication In Eukaryotic Cells. **Annu. Rev. Biochem.** 2002;71:333–74.

BERNARD H.U, BURK R.D, CHEN Z, VAN DOORSLAER K, ZUR HAUSEN H, DE VILLIERS E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology.** 2010;401(1):70-79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002

BHATLA N, AOKI D, SHARMA DN, SANKARANARAYANAN R. Cancer of the cervix uteri. **Int J Gynaecol Obstet.** 2018;143 Suppl 2:22-36. doi:10.1002/ijgo.12611

BLOW, J.J & DUTTA, A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2005 June; 6(6): 476–486.

BLOW J.J, HODGSON, B. Replication licensing - defining the proliferative state? **Trends Cell Biol.** 2002;12:72–78

BOSCH, J. F.X.; MUÑOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Research.** v.89, n. 2, p. 183 – 190, 2002.

BOSCH, F.X; de SANJOSÉ, S. Human papillomavirus in cervical cancer. **Current Oncology Reports.** 2002; 4(2):175-83.

BOSCH FX, BROKER TR, FORMAN D, MOSCICKI AB, GILLISON ML, DOORBAR J, STERN PL, STANLEY M, ARBYN M, POLJAK M, CUZICK J, CASTLE PE, SCHILLER JT, MARKOWITZ LE, FISHER WA, CANFELL K, DENNY LA, FRANCO EL, STEBEN M, KANE MA, SCHIFFMAN M, MEIJER CJ, SANKARANARAYANAN R, CASTELLSAGUÉ X, KIM JJ, BROTONS M, ALEMANY L, ALBERO G, DIAZ M, DE SANJOSÉ S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine.** 31;31(7) 1-31. 2013.

BOUSARGHIN L., TOUZE A., SIZARET PY, COURSAGET P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. **J. Virol** 77, 3846–3850. 200

BRAY, F.; REN, J.-S.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int. J. Cancer.** v. 132, n. 5, p. 1133–1145, 2013.

BRAKE, T; CONNOR, J.P; PETEREIT, D.G; *et al.* Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. **Cancer Res.** 2003; 63: 8173–80.

BRAMBS CE, HOHN AK, HENTSCHEL B, FISCHER U, BILEK K, HORN LC. The Prognostic Impact of Grading in FIGO IB and IIB Squamous Cell Cervical Carcinomas. **Geburtshilfe Frauenheilkd.** 2019;79(2):198-204. doi:10.1055/a-0828-7681.

BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; FERRER, E.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J Infect Dis.** v. 202, n. 12, p. 1789-99, 2010.

BURD E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical microbiology reviews.** v.16, n. 1, p. 1–17, 2003

BURGER, E. A.; SY, S.; NYGÅRD, M.; KRISTIANSEN, I. S.; KIM, J. J. Prevention of HPV-related cancers in Norway: cost-effectiveness of expanding the HPV vaccination program to include pre-adolescent boys. **PloS one**. v. 9, n. 3, p. e89974, 2014.

BURLAMAQUI, J.C.F.; CASSANTI, A.C.; BORIM, G.B.; DAMROSE, E.; VILLA, L.L.; SILVA, L. HPV e estudantes no Brasil: avaliação do conhecimento de uma infecção comum-relato preliminar. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. v. 83, n. 2, p. 120-125, 2017.

CALIFF R.M. Biomarker definitions and their applications. **Exp Biol Med (Maywood)**. 2018;243(3):213-221. doi:10.1177/1535370217750088

CASTLE P.E. SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; RODRIGUEZ, A.C.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E.; WACHOLDER, S.; TARONE, R.; BURK, R.D. A Prospective Study of Age Trends in Cervical Human Papillomavirus Acquisition and Persistence in Guanacaste, Costa Rica. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 191, p. 1808–16, 2005.

CHABEDA A, YANEZ R.J.R, LAMPRECHT R, MEYERS A.E, RYBICKI E.P, HITZEROTH II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. **Papillomavirus Res**. 2018;5:46-58. doi:10.1016/j.pvr.2017.12.006.

CHATRATH P, SCOTT I.S, MORRIS L.S, *et al*. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. **Br. J. Cancer** 2003; 89; 1048–1054

CHEN, A.A.; HEIDEMAN, D.A.; BOON, D.; GHEIT, T.; SNIJDERS, P.J.; TOMMASINO, M.; FRANCESCHI, S.; CLIFFORD, G.M. IARC HPV Variant Study Group. Human papillomavirus 45 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. **Journal of virology**. v. 88, n. 8, p. 4514–4521, 2014.

CHOW, I. H.; TANG, C. H.; YOU, S. L.; LIAO, C. H.; CHU, T. Y.; CHEN, C. J.; CHEN, C. A.; PWU, R. F. Cost-effectiveness analysis of human papillomavirus DNA testing and Pap smear for cervical cancer screening in a publicly financed health-care system. **British journal of cancer**. v. 103, n. 12, p. 1773–1782, 2010.

CLIFFORD, GARY.; FRANCESCHI, SILVIA.; DIAZ, MIREIA.; MUÑOZ, NUBIA.; VILLA, L. L. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**. v. 24, n. 3, p. S26-S34, 2006.)

COLIE, C.; MICHEL, K. G.; MASSAD, L. S.; WANG, C.; D'SOUZA, G.; RAHANGDALE, L.; FLOWERS, L.; MILAM, J.; PALEFSKY, J. M.; MINKOFF, H.; STRICKLER, H. D.; KASSAYE, S. G. Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia-2 in HIV-Positive Women of Reproductive Age. **J Acquir Immune Defic Syndr.** v. 79, n. 5, p. 573-579, 2018.

CRISH J.F, BONE F, BALASUBRAMANIAN S, ZAIM TM, WAGNER T, YUN J, RORKE E.A, ECKERT RL. Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins. **Carcinogenesis** 21: 1031-7. 2000.

CUTTS, F.T.; FRANCESCHI, S.; GOLDIE, S.; CASTELLSAGUE, X.; DE SANJOSE, S.; GARNETT, G.; EDMUNDS, W.J.; CLAEYS, P.; GOLDENTHAL, K.L.; HARPER, D.M.; MARKOWITZ, L. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bull World Health Organ.** v.85, n. 9, p. 719-26, 2007.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. C. **Anatomia sistêmica e segmentar.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DAS, M.; PRASAD, S. B.; YADAV, S. S.; GOVARDHAN, H. B.; PANDEY, L. K.; SINGH, S.; PRADHAN, S.; NARAYAN, G. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PloS one.* v. 8, n. 7, p. e69607, 2013.

DASARI S, WUDAYAGIRI R, VALLURU, L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. **Clin Chim Acta.** 2015;445:7-11. doi:10.1016/j.cca.2015.03.005.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 47, p. 2-13, 2018.

DE SANJOSÉ, S; SERRANO B, TOUS S, *et al.* Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. **JNCI Cancer Spectr.** 2019;2(4):pky045. Published 2019 Jan 7. doi:10.1093/jncics/pky045

DE VILLIERS, E.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H-U; HAUSEN, H. Z. Classification of papillomaviruses. **Virology.** v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DEPUYDT, C. E.; BEERT, J.; BOSMANS, E.; SALEMBIER, G. Human Papillomavirus (HPV) virion induced cancer and subfertility, two sides of the same coin. **Facts, views & vision in ObGyn.** v. 8, n. 4, p. 211–222, 2017.

DERCHAIN, S. F. M.; FILHO LONGATTO, A.; SYRJANEN, K. J. Neoplasia Intraepitelial cervical: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 27, n. 7, p. 425-433, 2005.

DHAR SK, DELMOLING L, DUTTA A. Architecture of the human origin recognition complex. **J. Biol. Chem.** 2001;276:29067–29071

DICKINSON, J. A.; STANKIEWICZ, A.; POPADIUK, C.; POGANY, L.; ONYSKO, J.; MILLER, A. B. Reduced cervical cancer incidence and mortality in Canada: national data from 1932 to 2006. **Biomedcentral Public Health**. v. 12, p., 992, 2012.

DIETRICH, D.; UHL, B.; SAILER, V.; HOLMES, E. E.; JUNG, M.; MELLER, S.; KRISTIANSEN, G. Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. **PLoS ONE**. v. 8, n. 10, e77771, 2013.

DOEBERITZ M.V.K. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **European Journal of Cancer** 2002; 38: 2229-2242.

DOEBERITZ M.V.K. Searching for new biomarkers for cervical cancer: molecular accidents and the interplay of papillomavirus oncogenes and epithelial differentiation Part I e II. **Papillomavirus Report** 2002; 13 (2):35-74.

DONG, B., SUN, P., RUAN, G., HUANG, W., MAO, X., KANG, Y., PAN, D.; LIN, F. Type-specific high-risk human papillomavirus viral load as a viable triage indicator for high-grade squamous intraepithelial lesion: a nested case- control study. **Cancer management and research**. v. 10, p. 4839–4851, 2018.

DOORBAR J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**. 32:7-15. 2005.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**. v. 30, n. 5, p.55-70, 2012.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H., KRANJEC, C., MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Medical Virology**. v. 25, p. 2 -23, 2015.

DURZYNSKA, J.; LESNIEWICZ, K.; POREBA, E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. **Mutation Research**. v. 772, p. 36-50, 2017.

EGAWA, N.; DOORBAR, J. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research**. v. 231, p. 119–127, 2017.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFfIN, H.; DOORBAR, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**. v.7, p. 3863-3890, 2015.

ESTEVIÃO D, COSTA N.R, GIL DA COSTA R, M & MEDEIROS, R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms** 1862, 153–162 (2019).

FLETCHER R.J, BISHOP B.E, LEON R.P, SCLAFANI R.A, OGATA C.M, CHEN X.S. The structure and function of MCM from archaeal *M. Thermoauto-trophicum*. **Nature Structural Biology** 2003;10:160–167

FREEMAN, A; MORRIS, L.S; MILLS, A.D; *et al.* Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. **Clin. Cancer Res**. 1999; 5: 2121–2132.

FUJITA MTKYH, ISHIBASHI M. hCDC47, a human member of MCM family. **J. Biol. Chem**. 1996. v. 271, p. 4349-4354.

FUJIOKA S, SHOMORI K, NISHIHARA K, *et al.* Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): prognostic implication. **Lung Cancer** 2009; 65: 223–9.

GAO, L.; PAN, X.; LI, L.; LIANG W.; BAI. P.; RAO, L.; SU, X.; WANG, T.; ZHOU, B.; WEI, Y.; ZHANG, L. Null Genotypes of GSTM1 and GSTT1 Contribute to Risk of Cervical Neoplasia: An Evidence-Based Meta-Analysis. **PLoS One**. v. 6, n. 5, p. e20157, 2011.

GARNAES E, FREDERIKSERN K, KISS K, *et al.* Double positivity for HPV DNA/p16 in tonsillar and base of tongue cancer improves prognostication: Insights from a large population-based study. *Int J Cancer*. 2016;139(11):2598-2605. doi:10.1002/ijc.30389

GILLESPIE, P. J; LI, A; BLOW, J. J. Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins. **BMC Biochem**. 2001; 2: 15-26.

GINSBURG, O.; BRAY, F.; COLEMAN, M. P.; VANDERPUYE, V.; ENIU, A.; KOTHA, S. R.; SARKER, M.; HUONG T. T.; ALLEMANI, C.; DVALADZE, A.; GRALOW, J.; YEATES, K.; TAYLOR, C.; OOMMAN, N.; KRISHNAN, S.; SULLIVAN, R.; KOMBE, D.; BLAS, M. M.; PARHAM, G.; KASSAMI, N.; CONTEH, L. **The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health**. *Lancet* (London, England). v. 389, n. 10071, p. 847–860, 2017.

GIULIANO, A. R.; TORTOLERO-LUNA, G.; FERRER, E.; BURCHELL, A.N.; DE SANJOSE, S.; KJAER, S.K.; MUÑOZ, N.; SCHIFFMAN, M.; BOSCH, F.X. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions. **Vaccine**. v. 26, p. K17– 28, 2008.

GOMES, A. H. **Análise morfométrica aplicada ao diagnóstico citopatológico e/ou à detecção molecular do HPV**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

GOU K, LIU J, FENG X, LI H, YUAN Y, XING C. Expression of Minichromosome Maintenance Proteins (MCM) and Cancer Prognosis: A meta-analysis. **J Cancer**. 2018;9(8):1518-1526. Published 2018 Apr 6. doi:10.7150/jca.22691

GRAHAM S.V. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiol**. 2010;5(10):1493–1506. doi:10.2217/fmb.10.1074.

GRAHAM S.V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clin Sci (Lond)**. 2017;131(17):2201-2221. Published 2017 Aug 10. doi:10.1042/CS20160786

GRAVITT, P.E.; JAMSHIDI, R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. **Infect Dis Clin North Am**. v. 19, n. 2, p. 439-58, 2005.

GRAVITT, P.E; GUPTA, S.B; LIAW, K. The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. **Int J Cancer**. 2011; Jun; 15:128(12):2962-70.

GREER CE, PETERSON SL, KIVIAT NB, MANOS MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. **Am J Clin Pathol**. 95:117-24.1991.

GRIFFIN, H.; WU, Z.; MARNANE, R.; DEWAR, V.; MOLIJN, A.; QUINT, W.; HOOF, C. V.; STRUYF, F.; COLAU, B.; JENKINS, D.; DOORBAR, J. E4 Antibodies Facilitate Detection and Type-Assignment of Active HPV Infection in Cervical Disease. **PLoS One**. v. 7, n. 12: e49974, 2012.

GROVES, I. J.; COLEMAN, N. Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next-generation sequencing studies taught us? **J Pathol**. v. 245, p. 9–18, 2018.

HALL PS, LEVISON, DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **J Clin Pathol** 1990;43:184–92.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

HAUKIOJA, A.; ASUNTA, M.; SÖDERLING, E.; SYRJÄNEN, S. **J Clin Virol**. Persistent oral human papillomavirus infection is associated with smoking and elevated salivary immunoglobulin G concentration. v. 61, n. 1, p. 101-6, 2014.

HAWKINS, M. G.; WINDER, D. M.; BALL, S. L. R.; VAUGHAN, K.; SONNEX, C.; STANLEY, M. A.; STERLING, J. C.; GOON, P. K. C. Detection of specific HPV subtypes responsible for the pathogenesis of condylomata acuminata. **Virology Journal**. v. 10, n. 137, 2013.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, D. M.; APRESA-GARCÍA, T.; PATLÁN-PÉREZ, R.M. Epidemiological overview of uterine cervical cancer. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**. v. 53, n. 2, p. S154-61, 2015

HERNÁNDEZ-MONTES, J.; ROCHA-ZAVALETA, L.; MONROY-GARCÍA, A.; WEISS-STEIDER, B.; ZARAGOZA, O. M. C.; CRUZ-TALONIA, F.; CRUZ Y CRUZ, O.; BONIFAZ-ALFONSO, L.; CHÁVEZ-RUEDA, A. K.; ROJO-AGUILAR, M. P.; LEGORRETA-HAQUET, M. V.; MORA-GARCÍA, M. L. Peripheral blood lymphocytes from low-grade squamous intraepithelial lesions patients recognize vaccine antigens in the presence of activated dendritic cells, and produced high levels of CD8 + IFN γ + T cells and low levels of IL-2 when induced to proliferate. **Infectious Agents and Cancer**. v. 7, n.1, p. 1-12, 2012.

HIBMA, M. H. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. **Open Virol J** 6: 241-248.2012.

HIRAIWA A, FUJITA M, NAGASAKA T, ADACHI A, OHASHI M, ISHIBASHI M. Immunolocalization of hCDC47 protein in normal and neoplastic human tissues and its relation to growth. **Int J Cancer**. 1997 Apr 22;74(2):180-4.

HONEYCUTT KA, CHEN Z, KOSTER MI, MIERS M, NUCHTERN J, HICKS J, *et al*. Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis. **Oncogene**. 2006;25:4027–32.

HORVATH CA, BOULET GA, RENOUX VM, DELVENE PO, BOGERS PL. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology** 7: 11. 2010.

HUBERT, W. G; LAIMINS, L. A. Human Papillomavirus Type 31 Replication Modes during the Early Phases of the Viral Life Cycle Depend on Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of E1 and E2 Expression. **Journal of Virology**. v. 76, n. 5, p. 2263–2273, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. **Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2011. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uter_o.pdf > Acesso em 19 de Julho de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. **Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2016. Disponível em:<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizesparaoraastreamentodocancerdocolodoutero_2016_corrigido.pdf> Acesso em 19 de Julho de 2020a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. **Câncer do colo do útero**. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br/utero> >. Acesso em 23 de junho de 2020b.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em:< <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp> > Acesso em 19 de julho de 2020c.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA Câncer do colo do útero. 2018 Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero> Acesso em 11 de junho de 2020d.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/minas-gerais-belo-horizonte>>. Acesso em 11 de junho 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. A review of human carcinogens. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer. v.100, n. 100, 2012, p. 1–441.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Cancer Today**. Disponível em:<<https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysismap>> Data source: GLOBOCAN 2018. Acesso em 20 de maio 2020a.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Colposcopia e tratamento da neoplasia Intraepitelial cervical: Manual para principiantes, J.W. Sellors & R. Sankaranarayanan. Capítulo 4: Introdução à colposcopia: indicações, instrumental, princípios e documentação dos achados. Disponível em:<<https://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=4> > Acesso em 16 de Maio de 2019b.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Introdução à anatomia do colo uterino**. Disponível em:<<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=1>>. Acesso em 23 de junho 2020c.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Histopatologia do colo uterino - atlas digital**. Disponível em:<<https://screening.iarc.fr/manuals.php>> Acesso em 23 de junho 2020d.

ISHIMI Y. Regulation of MCM2-7 function [published correction appears in Genes Genet Syst. 2019;94(3):139]. **Genes Genet Syst**. 2018;93(4):125-133. doi:10.1266/ggs.18-00026

JASTREBOFF A.M, CYMET T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. **Postgrad Med J**. 2002; 78(918):225-8.

JIN, L.; XU, Z. Recent advances in the study of HPV-associated carcinogenesis. **Virologica Sinica**. v. 30, n. 2, p. 101-106, 2015.

KADAJA, M.; SUMERINA, A.; VERST, T.; OJARAND, M.; USTAV, E.; USTAV, M. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. **Embo J**. v. 26, p. 2180-2191, 2007

KASAP B, YETMALAR H, KEKLIK A, YILDIZ A, CUKUROVA K, SOYLU F. Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology.

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 159, (1):168-171, 2011.

KEATING, J. T.; CVIKO, A.; RIETHDORF, S.; RIETHDORF, L.; QUADE, B. J.; SUN, D.; DUENSING, S.; SHEETS, E. E.; MUNGER, K.; CRUM, C. P. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. **Am J Surg Pathol.** v. 25, n. 7, p. 884–891, 2001.

KOSS, L. G. **Squamous carcinoma of the uterine cervix and its precursors. Diagnostic cytology and its histopathologic bases.** 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. Cap. 11, p.282-318.

KWOK, HF, ZHANG, SD, MCCRUDDEN, CM, *et al.* Prognostic significance of minichromosome maintenance proteins in breast cancer. **Am J Cancer Res** . 2014; 5 (1): 52-71. Publicado em 15 de dezembro de 2014.

LAITINEN, S; MARTIKAINEN, P.M; TOLONEN, T; *et al.* EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. **Int J Cancer.** 2008; 122: 595-602.

LEHMANN, U.; KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. **Methods.** v. 25, n. 4, p. 409-18, 2001.

LI, S.S; XUE, W.C; KHOO, U.S; *et al.* Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. **Histopathology.** 2005; 46: 307–13.

LOBATO, S; TAFURI,A; FERNANDES, P.A; *et al.* Minichromosome maintenance 7 protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease. **J Gynecol Oncol.** 2012; 23 (1): 11-15.

LONGATTO FILHO, A.; LAX, S.F.; YANG, B. Tumors of the female genital system. In: **Bartlett, J. M. S.; Shaaban, A.; Schmitt, F. Molecular Pathology: A Practical Guide for the Surgical Pathologist and Cytopathologist.** Cambridge: Cambridge University Press, 2015. p. 174 - 188.

LOPES, L. V. A. **Análise da expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV como biomarcadores de diagnóstico de ASC-US e lesões escamosas Intra-epiteliais cervicais por meio de técnica de citologia em meio líquido.** 2014. 56 f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LUO, J.H. Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. **World J Clin Oncol.** 2011 Feb.; 10: 2 (2): 120-124.

MAIORANO D, MOREAU J, MECHALI M. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. **Nature.** 2000;404:622–625.

MÄNNIK, A.; RÜNKORG, K.; JAANSON N.; USTAV, M.; USTAV, E. Induction of the bovine papillomavirus origin “onion skin” – type DNA replication at high E1 protein concentrations in vivo. **J Virol.** v. 76, p. 5835-5845, 2002.

MARTIN, C. M. & O'LEARY, J. J. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.** v. 25, n. 5, p. 605-615, 2011.

MASUDA, N.; OHNISHI, T.; KAWAMOTO, S.; MONDEN, M.; OKUBO, K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. **Nucleic Acids Res.** v. 27, n. 22, p. 4436–4443, 1999.

MATTHEWS K, LEONG CM, BAXTER L, INGLIS E, YUN K, BACKSTROM BT, DOORBAR J, HIBMA M. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. **J Virol.** 2003 Aug;77(15):8378-85.

MELNIKOW, J.; NUOVO, J.; WILLAN, A. R.; CHAN, B. K.; HOWELL, L. P. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol.** v. 92, p. 727-35, 1998.

MIRANDA, P. M.; SILVA, N. N. T.; PITOL, B. C. V.; SILVA, I. D. C. G., LIMA-FILHO, J. L., CARVALHO, R. F.; STOCCO, R. C.; BEÇAK, W.; LIMA, A. A. Persistence or Clearance of Human Papillomavirus Infections in Women in Ouro Preto, Brazil. **BioMed Research International.** v. 2013, n. 578276, p. 1- 6, 2013.

MOLANO, M.; POSSO, H.; WEIDERPASS, E.; VAN DEN BRULE, A. J. C.; RONDEROS, M.; FRANCESCHI, S.; MEIJER, C. J. L. M.; ARSLAN, A.; MUÑOZ, N. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. **Br J Cancer.** v. 87, n. 3, p. 324–333, 2002.

MOLIJN A, KLETER B, QUINT W, VAN DOORN LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology.** 2005;32: 43-51

MORGAN, I. M.; DINARDO, L. J.; WINDLE, B. Integration of Human Papillomavirus Genomes in Head and Neck Cancer: Is It Time to Consider a Paradigm Shift?. **Viruses**. v. 9, n. 8, 208, 2017.

MORRISON C, CATANIA, F, WAKELY P, NUOVO, GJ. Highly differentiated keratinizing squamous cell cancer of the cervix: a rare, locally aggressive tumor not associated with human papillomavirus or squamous intraepithelial lesions. **Am J Surg Pathol**. 2001;25(10):1310-1315. doi:10.1097/00000478-200110000-00013.

MORSHED, K.; POLZ-GRUSZKA, D.; SZYMANSKI M., POLZ-DACEWICZ, M. Human Papillomavirus (HPV)—Structure, epidemiology and pathogenesis. **Otolaryngol Polska**. v.68, n. 5, p. 213–219, 2014.

MOSCICKI, A.B.; SCHIFFMAN, M.; BURCHELL, A.; ALBERO, G.; GIULIANO, A. R.; GOODMAN, M. T.; KJAER, S. K.; PALEFSKY, J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine**. v. 30, n. 5, p. 24-33, 2012

MOTEVASELI, E.; SHIRZAD, M.; RAOOFIAN, R.; HASHEMINASAB, S-M.; HATAMI, M.; DIANATPOUR, M.; MODARRESSI, M-H. Differences in Vaginal Lactobacilli Composition of Iranian Healthy and Bacterial Vaginosis Infected Women: A Comparative Analysis of Their Cytotoxic Effects with Commercial Vaginal Probiotics. **Iranian Red Crescent Medical Journal**. v. 15, n.3, p. 199-206, 2013.

MULLER T, BRAUN M, DIETRICH D, *et al*. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**. 2017;8(32):52889-52900. Published 2017 May 2. doi:10.18632/oncotarget.17547.

MUÑOZ, N.; MÉNDEZ, F.; POSSO, H.; MOLANO, M.; VAN DEN BRULE, A. J. C.; RONDEROS, M., MEIJER, C.; MUÑOZ, A. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. **J Infect Dis**. v. 190, n. 12, p. 2077-87, 2004.

NACHAJOVA, M.; BRANY, D.; DVORSKA, D. Telomerase and the process of cervicalcarcinogenesis. **Tumor Biol**. v. 36, p. 7335–7338, 2015.

NEVES, H KWOK HF. In sickness and in health: The many roles of the minichromosome maintenance proteins. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**. 2017;1868(1):295-308. doi:10.1016/j.bbcan.2017.06.001

NISHIHARA, K; SHOMORI, K; FUJIOKA, S; *et al* Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. **Int J Oncol**. 2008; 33: 245–52.

OEHLMANN M, SOCRE AJ, BLOW JJ. The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation. *J. Cell Biol.* 2004;165:181–190.190.

OH, H. Y., SEO, S. S., KIM, M. K., LEE, D. O., CHUNG, Y. K., LIM, M. C., KIM, J.Y.; LEE, C.W.; PARK, S.Y. Synergistic effect of viral load and alcohol consumption on the risk of persistent high-risk human papillomavirus infection. *PLoS one.* v. 9, n. 8, p. e104374, 2014.

OLIVEIRA, M. C.; ANDRADE, M. C.; SOARES, R. C.; COSTA, A. L. L. Aspectos morfológicos que sugerem a presença do papilomavírus humano (HPV) em lesões do epitélio de revestimento da mucosa oral. **Rev. bras. patol. oral.** v. 2, n. 2, p. 34-43, 2003.

OSTÖR, A.G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol.** v. 12, n. 2, p. 186-92, 1993.

PADMANABHAN, V; CALLAS, P; PHILIPS, G; *et al.* DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. **J Clin Pathol.** 2004; 57: 1057–62.

PAN, D.; WEI, K.; LING, Y.; SU, S.; ZHU, M.; CHEN, G. The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in cervical cancer: a systematic review with meta-analysis. **Med Sci Monit.** v. 21, p. 882–889, 2015.

PARK, J. Y.; LEE, K. H.; DONG, S. M.; KANG, S.; PARK, S. Y.; SEO, S. S. The association of preconization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. **Gynecol Oncol.** v. 108, n. 3, p. 549-54, 2008.

PARKER MW, BOTCHAN MR, BERGER, JM. Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** 2017;52(2):107-144. doi:10.1080/10409238.2016.1274717.

PATEL S, CHIPLUNKAR S. Host immune responses to cervical cancer. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 2009 Feb;21(1):54-9.

PAULINO JÚNIOR, E.; PEDROSA, M. S.; CASTRO, L. P. F.; MIRANDA, D. Sistema Genital Feminino. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Blogliolo Patologia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 587 – 626.

PETO J, GILHAM C, DEACON J, TAYLOR C, EVANS C, BINNS W, HAYWOOD M, ELANKO N, COLEMAN D, YULE R, DESAI M. Cervical HPV infection and neoplasia

in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. **Br J Cancer** 91:942–53. 2004.

PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. **1 ed. Springer Science & Business Media**, 2008. p. 344.

PINTO, A. P.; QUEIROZ, C.M.P. Oncogênese cervical. In: GAMBONI, M.; MIZIARA, E.F. **Manual de citopatologia diagnóstica**. São Paulo: Manole, 2013. p. 73 – 77.

PRAKASH, P.; PATNE, S. C. U.; SINGH, A. K.; KUMAR, M.; MISHRA, M. N.; GULATI, A. K. PCR and genotyping for HPV in cervical cancer patients. *J Global Infect Dis.* v. 8, n. 3., p. 100-107, 2016.

QU K, WANG Z, FAN H, *et al.* MCM7 promotes cancer progression through cyclin D1-dependent signaling and serves as a prognostic marker for patients with hepatocellular carcinoma [published correction appears in *Cell Death Dis.* 2018 Jun 7;9(6):681]. **Cell Death Dis.** 2017;8(2):e2603. Published 2017 Feb 9. doi:10.1038/cddis.2016.352.

QUINN CM, WRIGHT NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **J. Pathol.** 1990; 160; 93–102.

RAHMAN, T.; UDDIN, M. S.; SULTANA, R.; MOUE, A.; SETU, M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. **Anwer Khan Modern Medical College Journal.** v. 4, n.1, p. 30 – 36, 2013.

RAJ, K.; BERGUERAND, S.; SOUTHERN, S.; DOORBAR, J.; BEARD, P. E1 Λ E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Associates with Mitochondria. **J. Virol.** v. 78, n. 13, p. 7199-7207, 2004.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; OLIVEIRA, E. Z.; ALDRIGHI, J. M.; NETO, C. M. Detecção sorológica de anti-hpv 16 e 18 e sua associação com os achados do Papanicolaou em adolescentes e mulheres jovens. **Rev assoc med bras.** v. 52, n. 1, p. 43-47, 2006.

REMUS D, BEURON F, TOLUN G, GREIFFITH JD, MORRIS EP, DIFFLEY JFX. Concerted loading of MCM2-7 double hexamers around DNA during DNA replication Origin Licensing. **Cell**, 2009, V.139 (4), p. 719-730.

REN, B; YU, G; TSENG, G.C; *et al.* MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. **Oncogene.** 2006; 25: 1090–8.

RODEN R.B.S.; STERN P.L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. **Nat Rev Cancer**. 2018;18(4):240-254. doi:10.1038/nrc.2018.13

ROMANOWSKI P, MADINE MA. Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: the role of Cdc6 and ORC. **Trend Cell Biol**. 1997; 7; 9–10.

ROSAI, J. Uterus-cervix. Em Rosai (ed.): **Rosai and Ackerman's Surgical Pathology**, ed. 9. Philadelphia, 2004, MOSBY, p. 1523-1568.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIN N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230:1350–1354.1985.

SAND FL, NIELSEN DMB, FREDERIKSEN MH, RASMUSSEN CL, KJAER SK. The prognostic value of p16 and p53 expression for survival after vulvar cancer: A systematic review and meta-analysis. **Gynecol Oncol**. 2019;152(1):208-217. doi:10.1016/j.ygyno.2018.10.015

SCHLECHT,N; PLATT ,R; FRANCO, E.; *et al*. Human Papillomavirus Infection and Time to Progression and Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, 2003: 95 (17): 1336-1343.

SCHMIDT, D; BERGERON, C; DENTON, K.J; *et al*. P16/Ki-67 dual stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology: Results from the European Equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. **Cancer Cytopathol**. 2011 (119): 158-166.

SCHUCK, S.; RUSE, C.; STENLUND, A. CK2 Phosphorylation Inactivates DNA Binding by the Papillomavirus E1 and E2 Proteins. **Journal of Virology**. v. 87, n. 13, p. 7668 –7679, 2013.

SEILER, C.; SHARPE, A.; BARRETT, J. C.; HARRINGTON, E. A.; JONES, E. V.; MARSHALL, G. B. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? **BMC Clinical Pathology**. v. 16, n. 17, p. 1- 13, 2016.

SELLORS, JWR. Colposcopia e Tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes. **Washington, D.C.:** OPAS, 2004.

SERRANO, B.; BROTONS, M.; BOSCH, F. X.; BRUNI, L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. v. 47, p.14-26, 2018.

SHANMUGASUNDARAM, S., & YOU, J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**. v. 9, n. 8, p. E229, 2017

SHIMIZU H, BURNS J C. Extraction of Nucleic Acids: Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. PCR Estrategies. San Diego, CA, **Academic Press, Inc.**, 1995, p 32-38.

SHINCHI Y, KOMOHARA Y, YOMEMITSU K, *et al.* Accurate expression of PD-L1/L2 in lung adenocarcinoma cells: A retrospective study by double immunohistochemistry. **Cancer Sci**. 2019;110(9):2711-2721. doi:10.1111/cas.14128.

SHUKLA, S.; MAHATA, S.; SHISHODIA, G.; PANDE, S.; VERMA, G.; HEDAU, S.; BHAMBHANI, S.; KUMARI, A.; BATRA, S.; BASIR, S. F.; DAS, B. C ; BHARTI, A. C. Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. **The Indian journal of medical researchKIO**. v. 139, n. 4, p. 531–43, 2014.

SCHWACHA A, BELL SP. Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. **Mol. Cell**. 2001;8:1093–1104.

SILVA A.M.T.C, AMARAL M.V.T, CRUZ A.D. HPV e Câncer: o papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 29: 48-54.2002.

SMELTZER, SC; BARE, BG. **Histórico e tratamento dos processos fisiológicos femininos, Tratado de enfermagem médico-cirúrgico** Ed. Guanabara Koogan, Rio de janeiro 101, 1448-86, 2005.

STERN, P.L. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. **J Clin Virology**. v. 32, n.1, p. S72- S81, 2005.

STRIMBU, K.; & TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current opinion in HIV and AIDS**. v. 5, n. 6, p. 463–466, 2010.

SWANSON, E.M. Trato genital feminino. In: GAMBONI, M.; MIZIARA, E.F. **Manual de citopatologia diagnóstica**. São Paulo: Manole, 2013. p. 47-48.

TAINIO, K.; ATHANASIOU, A.; TIKKINEN, K. A. O.; AALTONEN, R.; CÁRDENAS, J.; HERNÁNDES, G-L. S.; JAKOBSSON, M.; JORONEN, K.; KIVIHARJU, M.; LOUVANTO, K.; OKSJOKI, S.; TÄHTINEN, R.; VIRTANEN, S.; NIEMINEN, P.; KYRGIU, M.; KALLIALA, I. Clinical course of untreated cervical intraepithelial

neoplasia grade 2 under active surveillance: systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v. 360, n. k499, 2018.

TAMURA T, SHOMORI K, HARUKI T, NOSAKA K, HAMAMOTO Y, SHIOMI T, RYOKE K, ITO H. Minichromosome maintenance-7 and geminin are reliable prognostic markers in patients with oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical study. **Oral Pathol Med**. 2010, 39: 328–334.

TAN, S. C.; ANKATHIL, R. Genetic susceptibility to cervical cancer: role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. **Tumor Biol**. v. 36, n. 9, p. 6633–6644, 2015.

TORRE, L. A.; BRAY F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT J.; JEMAL, A. **Global Cancer Statistics, 2012**. CA: A Cancer Journal for Clinicians. v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TSOUMPOU, I; ARBYN, M; KYRGIU, M; *et al.* p16INK4A immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix; a systematic review and meta-analysis. **Cancer Treat Rev**. 2009; 35: 210-20.

TULAY, P.; SERAKINCI, N. The role of human papillomaviruses in cancer progression. **J Cancer Metastasis Treat**. v. 2, p. 201-13, 2016.

TYRING SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **Journal Am Academic Dermatology**. J Am Acad Dermatol 43: S18-26. 2000.

VAN DE PUTTE, G.; HOLM, R.; LIE, A.K.; TROPÉ, C. G.; KRISTENSEN, G. B. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. **Gynecol Oncol**. v. 89, n. 1, p. 140-7, 2003.

VON AHLFEN, S.; MISSEL, A.; BENDRAT, K.; SCHLUMPBERGER, M. Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. **PLoS ONE**. v. 2, n. 12, e1261, 2007.

WALBOOMERS, J. M.; M., JACOBS, M. V.; MANOS M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M., MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol**. v. 189, n. 1, p. 12-19, 1999

WANG, S. S.; HILDESHEIM, A. Chapter 5: viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **J Natl Cancer Inst Monogr**. v. 31, p. 35-40, 2003.

WANG, X., HUANG, X., & ZHANG, Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. **Frontiers in microbiology**. v. 9, n. 2896, 2018.

WEELE, P. V.; LOGCHEM, E. V.; WOLFFS, P. F.; BROEK, I. V.; FELTKAMP, M. C.; MELKER, H. E.; MEIJER, C. J.; BOOT, H.; KING, A. J. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. **Journal of Clinical Virology**. v. 83, p. 6-11, 2016.

WILLIAMS GH, ROMANOWSKI P. MORRIS L, MADINE M, MILLS AD, STOEBER K, MARR J, LASKEY RA, COLEMAN N. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. **Proc.Natl Acad. Sci.** 1998. USA 95, 14932–14937.

WRIGHT DK, MANOS MM. Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. In: INNIS *et al.* (eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego, CA, Academic Press, Inc. 153-158.1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Human papillomavirus (HPV)**. Disponível em: <<https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/>>. Acessado em 11 de junho 2020b.

YAMAGUCHI A, HASHIMOTO N, TSUTAE W, SEINO K, EBINA Y, TOKINO T, SATO N, KIKUCHI K. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. **Clin Chim Acta**. 318(1-2):41-9.2002.

YANG J.Y, LI D, ZHANG Y, GUAN B.X, *et al.*, The Expression of MCM7 is a Useful Biomarker in the Early Diagnostic of Gastric Cancer. **Pathol Oncol Res**. 2018 Apr;24(2):367-372. doi: 10.1007/s12253-017-0251-1. Epub 2017 May 25. PMID: 28540486.

ZHANG, J.; LU, C. X. Spontaneous Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2: A Meta-analysis. **Gynecol Obstet Invest**. v. 3, p. 1-6, 2019.

ZHANG J, WANG L, QIU M, *et al.* The protein levels of MCM7 and p63 in evaluating lesion severity of cervical disease. **Int J Gynecol Cancer**. 2013;23(2):318-324. doi:10.1097/IGC.0b013e31827f6f06.

ZHONG X, CHEN X, GUAN X, *et al.* Overexpression of G9a and MCM7 in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with poor prognosis. **Histopathology**. 2015;66(2):192-200. doi:10.1111/his.12456.

ZUMBACH K, KISSELJOV F, SACHAROVA O, SHAICHAEV G, SEMJONOVA L, PAVLOVA,L, PAWLITA M. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human

papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. **Int J Cancer** 85: 313-8.2000.

ZUR HAUSEN H. Human Papillomaviruses and Their Possible Role in Squamous Cell Carcinomas. In: ARBER, W.; HENLE, W.; HOFSCHEIDER, P. H.; HUMPHREY, J. H.; KLEIN, J.; KOLDOVSKÝ, P.; KOPROWSKI, H.; MAALØE, O.; MELCHERS, F.; ROTT, R.; SCHWEIGER, H. G.; SYRUČEK, L.; VOGT, P. K. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 78 ed. Heidelberg: Springer, 1977. p. 1-30.

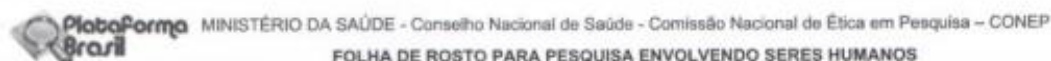
ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses Causing Cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst.** 92(9):690-8. 2000.


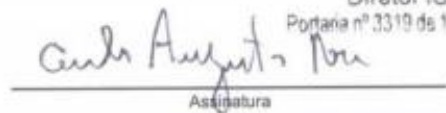
ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2:342-50.2002.

ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**. 2009; 384(2)

9. SEÇÃO DE ANEXOS

Anexo 1 – Folha de rosto para submissão do projeto ao Comitê em Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG



1. Projeto de Pesquisa: Expressão de Proteínas reguladoras do ciclo e de vias de Sinalização celular na patogênese do câncer cervical, e sua correlação com a infecção pelo Papilomavirus humano.			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 280			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: ANNAMARIA RAVARA VAGO			
6. CPF: 874.345.397-04		7. Endereço (Rua, n.º): ESTANISLAU FERNANDES OURO PRETO BELO HORIZONTE MINAS GERAIS 31340130	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (31) 3498-4093	10. Outro Telefone:
		11. Email: arvago@ufmg.br	
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>27</u> / <u>02</u> / <u>2020</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS		13. CNPJ: 17.217.985/0013-48	14. Unidade/Órgão: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
15. Telefone: (31) 3409-5000		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: _____		CPF: <u>292.472.336-10</u>	
Cargo/Função: _____		Proj. Carlos Augusto Rosa Diretor ICB Portaria nº 3319 de 15/05/2018	
Data: ____ / ____ / ____		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

Anexo 2 – Condições de preparo e programa de amplificação do gene de β -globina humana (Nested e Hemi-Nested PCR)

Quadro 1 - Componentes do Mix de PCR para amplificação do gene β -globina (268 pb).

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
Primer GH20	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Primer PC04	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão (QuatroG®)	10X	1X	1 μ l
dNTP Mix (Ludwig)	2,5 mM	200 μ l	0,8 μ l
Taq DNA pol. (QuatroG®)	5 UI/ μ l	1 UI	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	6,0 μ l

Volume final de 12 microlitros: 10 μ l de MIX + 2 μ l de DNA (lisado) da amostra.

Quadro 2 - Componentes do Mix de PCR para amplificação do gene β -globina (110 pb).

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
Primer PC03 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Primer PC04 (IDT ®)	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Tampão (QuatroG®)	10X	1X	1 μ l
dNTP Mix (Ludwig)	2,5 mM	200 μ l	0,8 μ l
Taq DNA pol. (QuatroG®)	5 UI/ μ l	1 UI	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	6,0 μ l

Volume final de 12 microlitros: 10 μ l de MIX + 2 μ l do produto da 1ª reação da amplificação de 268 pb.

Quadro 3 - Programa de amplificação do gene *β -globina* (268 e 110 pb).

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	4 minutos
2	55 °C	1 minuto
3	72 °C	2 minutos
4	95 °C	1 minuto
5	29 vezes ao passo 2	
6	55 °C	1 minuto
7	72 °C	10 minutos
8	4 °C	infinito
9	Fim	

Anexo 3 – Condições da PCR para a detecção da presença do DNA viral

Quadro 4 - Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 450pb do genoma viral.

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
<i>Primer</i> MY09 (IDT ®)	10 pmol/μl	10 pmol	1μl
<i>Primer</i> MY11 (IDT ®)	10 pmol/μl	10 pmol	1μl
Tampão (QuatroG®)	10X	1X	1μl
dNTP Mix (Ludwig)	2,5 mM	200μl	0,8μl
<i>Taq</i> DNA pol. (QuatroG®)	5 UI/μl	1 UI	0,2μl
H ₂ O	-	-	6,0μl

Volume final de 12 microlitros: 10 μl de MIX + 2 μl de DNA (lisado) da amostra.

Quadro 5 - Programa de amplificação do fragmento de 450pb do genoma viral.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	4 minutos
2	55 °C	1 minuto
3	72 °C	1 minuto
4	95 °C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 a 4	
6	55 °C	1 minuto
7	72 °C	10 minutos
8	4 °C	10 minutos
9	Fim	

Quadro 6 - Componentes do Mix de PCR para amplificação de um fragmento de 150pb do genoma viral.

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
<i>Primer GP5+</i> (IDT®)	10 pmol/μl	10 pmol	1μl
<i>Primer GP6+</i> (IDT®)	10 pmol/μl	10 pmol	1μl
Tampão (QuatroG®)	10X	1X	1μl
dNTP Mix (Ludwig)	2,5 mM	200μl	0,8μl
<i>Taq</i> DNA pol. (QuatroG®)	5 UI/μl	1 UI	0,2μl
H ₂ O	-	-	6,0μl

Volume final de 12 microlitros: 10 μl de MIX + 2 μl do produto da 1ª reação de amplificação de 450 pb.

Quadro 7 - Programa de amplificação do fragmento de 150 pb do genoma viral.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	4 minutos
2	95 °C	1 minuto
3	45 °C	1 minuto
4	72 °C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 a 4	
6	72 °C	1 minuto
7	4 °C	10 minutos
8	Fim	

Anexo 4 – Condições da PCR para a detecção do DNA do HPV 16

Quadro 8 - Iniciadores utilizados para Tipagem do HPV 16.

<i>Primers</i>	ALVO	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	HPV	pb
E7CR3 (reverso)	E6/E7	(reverso: 5'- TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC)	Variável	Variável
16SF1(direto)	E6/E7	(5'-TGT ATG TCT TGT TGC AGA TCA TCA)	HPV16	149

Fonte: Yamaguchi *et al.* (2002)

Quadro 9 - Componentes do Mix da PCR para tipagem do HPV 16.

Reagentes	Concentração	Concentração/tubo	Volume/tubo
<i>Primer</i> E7CR3 (IDT®)	10 pmol/µl	10 pmol	1µl
<i>Primer</i> 16SF1 (IDT®)	10 pmol/µl	10 pmol	1µl
Tampão (QuatroG®)	10X	1X	1µl
dNTP Mix (Ludwig)	2,5 mM	200µl	0,8µl
<i>Taq</i> DNA pol. (QuatroG®)	5 UI/µl	1 UI	0,2µl
H ₂ O	-	-	6,0µl

Volume final de 12 microlitros: 10 µl de MIX + 2 µl do produto da 1ª reação de amplificação de 450 pb.

Quadro 10 - Programa de amplificação do fragmento de 149pb do genoma viral do HPV 16.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	5 minutos
2	54 °C	1 minuto
3	72 °C	1 minuto
4	95 °C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 a 4	
6	72 °C	10 minutos
7	4 °C	10 minutos
8	Fim	

Anexo 5 – Correlação entre o número total de células marcadas para MCM7 em Cervicite e CCU

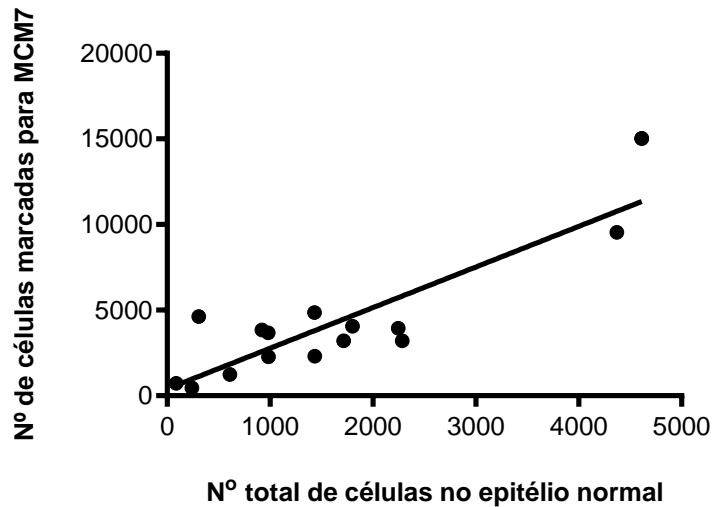


Figura 24A: Correlação do número de células epiteliais marcadas para MCM7 e o número de células epiteliais contadas nas amostras de Cervicite. Verifica-se nas amostras classificadas como Cervicite a presença de correlação entre a quantidade de células marcadas para MCM7 e o número de células contadas em toda a extensão do epitélio normal (teste de *Spearman r* com o valor de $r = 0,6143$ e de $p = 0,0003$).

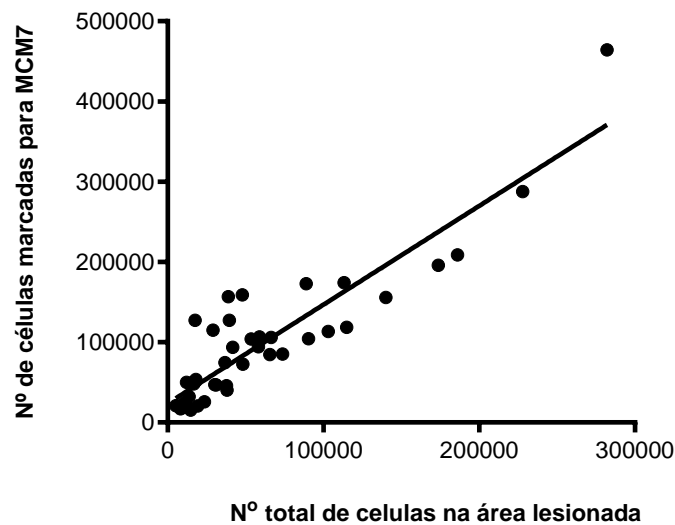


Figura 24B: Correlação do número de células epiteliais alteradas marcadas para MCM7 e o número de células epiteliais contadas nas áreas de lesão nas amostras de Câncer do Colo do Útero. Verifica-se que há correlação entre a quantidade de células marcadas pela proteína MCM7 e o número de células contadas em todas as áreas de Câncer que invadiram o estroma do tecido cervical (teste de *Spearman* com valor de $r = 0,8318$ e de $p < 0,0001$).