

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCM7 E L1 DO HPV
COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO DE ASC-US E
LESÕES ESCAMOSAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS POR MEIO
DE TÉCNICA DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO**



LARA VERONICA DE ARAUJO LOPES

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCM7 E L1 DO HPV
COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO DE ASC-US E LESÕES
ESCAMOSAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS POR MEIO DE
TÉCNICA DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Colegiado do 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 à obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Prof^a Luciana de Oliveira
Andrade**

**Co-Orientadora: Prof^a Annamaria Ravara
Vago**

LARA VERONICA DE ARAUJO LOPES

BELO HORIZONTE

2014

“Eu aprendi que sou mais forte do que imaginava ser, e que posso ir mais longe, depois de pensar que não podia mais. E que realmente cada minuto da vida tem valor e eu tenho valor diante da vida!”

Dedico esse trabalho:

A todos os “guerreiros” que lutam contra o câncer, fragilizados pela doença, mas muito fortes na luta pela cura, e que não desistem da vida mesmo quando tudo parece impossível!

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus... Tempo para nascer e tempo para morrer... Tempo para demolir e tempo para construir... Reconheci que tudo o que Deus fez subsistirá sempre; a isso nada se pode acrescentar, e disso nada se pode tirar!”

(Eclesiastes, 3)

“Que as coisas são inatingíveis? Ora! Isso não é motivo para não querê-las. Que tristes seriam os caminhos sem a presença distante das estrelas.” (Mario Quintana)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu o milagre da vida, por mais de uma vez, e que graças a isso tive a oportunidade de dedicar um pouquinho do meu tempo a esse trabalho. Obrigada por estar sempre comigo e por não me deixar fraquejar diante das dificuldades!

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e que em nenhum momento mediram esforços para que meus sonhos se tornassem realidade, mesmo diante das limitações impostas pela vida, e às minhas irmãs, pelo incentivo e compreensão em todos os momentos.

Ao Leandro, meu marido, pela companhia, pela compreensão, por entender minha ausência e me apoiar sempre. Juntos enfrentamos grandes dificuldades, e vencemos cada uma delas. Obrigada pelo seu amor em todos os momentos!

Aos meus sobrinhos, fonte de renovação de energia em minha vida. Amo muito vocês!

A minha Orientadora, Professora Luciana de Oliveira Andrade, por todo aprendizado, por tornar possível a realização desse trabalho e por contribuir tanto na minha formação acadêmica. Obrigada por acreditar no meu projeto e pela confiança sempre depositada em mim. Você é um exemplo que pretendo seguir em minha vida acadêmica.

A minha Co-Orientadora, Professora Annamaria Ravara Vago. Seu carinho e dedicação foram fundamentais desde o início, quando optei pela realização do Mestrado. Sempre presente em todos os momentos de elaboração e execução desse trabalho, compartilhando conhecimento científico, paciência, serenidade, e por ter sido parte essencial no meu amadurecimento como pesquisadora. Um simples obrigado seria muito pouco a você Anna!

Destaco a importância do Dr. Nivaldo Hartung Toppa, Patologista e Diretor Proprietário do Laboratório Analys Patologia, por tornar possível a realização de parte dessa pesquisa nessa instituição, onde comecei a construir minha vida profissional. Obrigada pelos seus ensinamentos nesses quase 20 anos em que trabalhamos juntos e pelo incentivo em todos os momentos.

Meu sincero agradecimento a Dra. Lucia Porto Fonseca, também Patologista do Laboratório Analys Patologia, por ter acreditado em mim no início da minha vida profissional. Seu apoio e seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional no decorrer desses anos de convivência. Claro que nesse momento não poderia deixar de agradecer-lá por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais como o Dr. Roberto Fonseca e o Dr. Volney Soares. Sem eles provavelmente eu não estaria aqui hoje concretizando esse trabalho. Você com certeza tem um lugar especial no meu coração, Lúcia!

Registro aqui minha gratidão a todos os meus colegas de trabalho do Laboratório Analys, especialmente à turma da Citologia. Vocês fazem os meus dias melhores! Obrigada pelo apoio que sempre me deram e pelo suporte nas execuções das minhas tarefas. Meu obrigado muito especial à Ângela Antunes que realizou o levantamento das pacientes durante todo o período de levantamento de dados, e a Raquel Almeida pela ajuda no processamento das amostras de Citologia em meio líquido. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização desse trabalho.

A todos os alunos de Iniciação científica do Laboratório de Patogênese Molecular do ICB/ UFMG, que participaram desse projeto: Alessandra, Ana Clara, Danilo, Douglas, Eduardo, Érica, Gabriela, Jéssica, Larissa, Lúvia e Yara. A colaboração de vocês foi imprescindível para que esse trabalho fosse terminado dentro do prazo previsto.

Agradeço também a Keila e Zelina, colegas do Laboratório de Patogênese Molecular, e que sempre me ajudaram nos momentos de dificuldade, inclusive me dando o treinamento para a execução de todas as técnicas necessárias para a realização desse estudo.

Agradeço às colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) do ICB/ UFMG, que tanto me ajudaram com a Cultura de células, especialmente a Dina, que me ensinou a técnica com tanto cuidado, à Thalita, à Patricia e à Bárbara. Muito obrigada meninas!

A minha companheira Daniele de Souza Camargos pelo apoio e carinho de sempre, com quem compartilhei vários momentos no decorrer desse caminho. Agradeço também à Soraya Lobato, pela sua atenção em todos os momentos!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e aos colegas e professores das Disciplinas cursadas durante essa trajetória

A todos os meus amigos e familiares obrigada pelo apoio e por compreenderem minhas ausências durante vários momentos. Aqui faço um agradecimento muito especial aos meus tios Flávio Barony e Isabel (Lilica). Vocês estiveram sempre presentes em todos os momentos de minha vida e tenho um carinho muito especial por vocês. Obrigada por tudo!

A todas as pacientes que contribuíram para a realização desse trabalho. Sem elas nada disso seria possível.

A Companhia Kolplast ci Ltda, que patrocinou parte desse projeto, fornecendo kits para a confecção dos esfregaços de Citologia em Meio Líquido do equipamento "Thin Prep", em especial à Consultora da empresa, Fernanda Priori, que sempre me atendeu com muita gentileza nas negociações. O meu Muito Obrigado!

ABSTRACT

World-wide, cervical cancer (CC) is the third most commonly diagnosed cancer in women resulting in 280,000 deaths annually. The frequency of CC has decreased markedly in developed countries which mostly results from early diagnosis through effective screening programs and management of precursor lesions. However, cytological screening remains to be hampered by imperfect sensitivity and less-than-ideal inter-observer reproducibility, especially for some diagnostic categories. Immunocytochemical (ICC) detection of molecular alterations caused by HPV in host cells could potentially be used as an adjunct to cytological screening to improve sensitivity without compromising specificity. The aim of our study was to evaluate the expression of two proteins, MCM7, which is involved in the DNA replication regulation, and the L1-HPV capsid, as possible markers of cervical lesions diagnosis and HPV infection. The expression patterns of both proteins were evaluated by ICC analysis of smears prepared from 213 cervical samples collected by LBC (Liquid-base cytology) from women presenting distinct classes of cytological diagnosis ASCUS (36,1%), LSIL (55,8%) and HSIL (3,3%), or without any cervical abnormalities. It was observed that 39/213 (18.3%) from the cervical samples exhibited nuclear positivity to MCM7, with absence of the protein expression in cases without abnormalities. It was verified an increasing number of positive samples according to the lesion severity (7.3% of the ASCUS cases, 65.3% of LSIL and 100% of HSIL). An interesting association between the MCM7 expression and the DNA/HPV detection was also observed. Concerning the L1-HPV expression, 82/162 (62.6%) from the samples showed immuno-labeling to L1, with an important association among the expression of this protein, and the low-grade lesions and the HPV detection. The analysis of the four distinct expression patterns of MCM7 and L1, among the different cervical lesions categories, clearly showed that the cervical samples were distributed in two main groups, with the majority of them (ASC-US and LSIL) localized within the group whose samples did not express MCM7 (profiles MCM7-/L1- and MCM7-/L1+). In addition, almost 20% from the ASCUS and LSIL samples, and the totality of the HSIL smears, exhibited the MCM7+/L1+ and MCM7+/L1- immuno-labeling patterns, which were possibly more related to more severe cervical lesions. In conclusion, our data suggest that the single or combined analysis of the MCM7 and L1-HPV expression, can be considered as useful biomarkers of cervical lesion progression, in addition to the HPV infectio

RESUMO

O câncer de colo uterino é considerado, entre as mulheres, o segundo tipo de câncer mais comum no mundo. Ao longo dos últimos 30 anos diversos estudos têm mostrado uma íntima associação do câncer cervical (CC) com a infecção persistente pelo Papilomavírus humano (HPV). Programas de rastreamento, baseados em sua maioria no exame de Papanicolaou, têm reduzido bastante a incidência do CC em todo o mundo, principalmente pela detecção precoce das lesões precursoras com benefício ao tratamento e acompanhamento das pacientes. Entretanto, os métodos de diagnóstico citológico apresentam algumas limitações que comprometem a sua sensibilidade e especificidade. Vários estudos já realizados e ainda em desenvolvimento são direcionados à descoberta de biomarcadores, que aumentem a eficácia de detecção das lesões cervicais com maior risco de progressão, e que possam representar um complemento para o exame citológico e o teste do DNA/HPV. No presente estudo avaliou-se o padrão de expressão da proteína MCM7 envolvida na regulação da duplicação do DNA, e da L1, principal proteína do capsídeo do HPV, entre diferentes categorias de lesões cervicais e em relação à infecção pelo HPV. Por meio da técnica de Imunocitoquímica (ICC), avaliou-se a expressão dos dois biomarcadores em esfregaços preparados a partir de 213 amostras cervicais colhidas em CML, e classificadas pela Citologia como ASCUS (36,1%), Lesões de baixo (55,8%) e alto (3,3%) grau, além de amostras sem anormalidades. Observou-se que 39/213 (18,3%) das amostras apresentaram positividade para MCM7, com ausência de expressão da proteína nos casos sem anormalidades, e expressão crescente de MCM7 de acordo com a severidade da lesão (7,3% de ASCUS, 65,3% das LBG e 100% das LAG). Além disso, observou-se uma grande associação entre a expressão de MCM7 a detecção do DNA/HPV. Com relação à expressão da proteína L1 do HPV, verificou-se que 82/162 (62,6%) das amostras testadas apresentaram imuno-marcação para L1, com forte associação entre a expressão dessa proteína e as lesões de baixo grau, e a presença do DNA/HPV. A análise combinada de quatro diferentes perfis de expressão dos dois biomarcadores, em relação às diferentes categorias de lesões estudadas, claramente mostrou que as amostras ficaram divididas em dois grandes grupos, estando a maior parte delas (ASCUS e LBG) dentro do grupo que não expressava MCM7 (os perfis MCM7-/L1- e MCM7-/L1+). Além disso, cerca de 20% das amostras de ASCUS e LBG, e todas as amostras de LAG apresentaram os perfis MCM7+/L1+ e MCM7+/L1-, possivelmente mais relacionados a lesões cervicais mais severas. Conclui-se, portanto, no presente estudo, que a

análise combinada da expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV, as qualificam como excelentes marcadores de severidade das lesões cervicais, associadas à infecção pelo Papilomavírus humano.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACO	Anticoncepcionais Orais
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AIN	Área Iodo Negativa
ASCUS	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
ASC-H	<i>Atypical Squamous Cells that cannot exclude High-grade Lesions</i> (Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau)
ATPase	Adenosina Trifosfatase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica)
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
CC	Citologia Convencional
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CH	Captura Híbrida
CIS	Carcinoma <i>In Situ</i>
CCU	Carcinoma de Colo Uterino
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i> (Quinase dependente de ciclina)
CDKI	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitors</i> (Inibidores de quinase dependente de ciclina)
CML	Citologia em Meio Líquido
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPR	Complexo Pré-replicativo
DAB	3, 3'-Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EAB	Epitélio Aceto Branco
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
EGRF	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
E6AP	<i>E6 Associated Protein</i> (Proteína associada a E6)
FDA	Food and Drug Administration
FN	Falso Negativo

HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humano
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
HSIL	<i>High- Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICQ	Imunocitoquímica
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus)
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamo-colunar
Kb	<i>Kilobase</i> (1Kb = 1000 pares de base)
Kda	<i>Kilodalton</i> (1Kda = 1000 daltons)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle)
LEI	Lesão Escamosa Intraepitelial
LIE	Lesão Intraepitelial Escamosa
LSIL	<i>Low- Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau)
MCM	<i>Minichromosome Maintenance Proteins</i> (Proteínas de Manutenção de Minicromossomas)
µg	Microgramas
µL	Microlitro
mL	Mililitros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
µm	Micrômetro
NaOAc	Acetato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NDN	Nenhum desvio da Normalidade
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
nm	Nanômetro
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico

OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open Reading Frame (Janela Aberta de Leitura)
ORI	Origem de replicação
pb	Pares de Base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Fosfatada)
PCNA	<i>Proliferation Cell Nuclear Antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)
PHT	<i>Phoneutria</i> Biotecnologia e Serviços Ltda.
pmol	Picomol
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
rpm	Rotações por Minuto
RT-PCR	<i>Real Time- Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)
S	Teste de Schiller (S+ positivo; S- negativo)
SC	Teste não realizado por escassez de células na amostra
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial)
SLH	Solução de Lise de Hemácias
SNC	Sinais Não- Clássicos
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TBS	Sistema de Classificação de Bethesda
TGF- α	Transformer Growth Factor (Fator de Crescimento Transformante)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Região Regulatória localizada à 5' do Promotor)
VLP	<i>Virus- Like Particles</i> (Partículas tipo virais)
ZTA	Zona de Transição Atípica
ZTT	Zona de Transição Típica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Modelo de progressão das lesões escamosas precursoras ao Câncer Cervical Invasor.....	21
FIGURA 2:	Fatores envolvidos na progressão das lesões escamosas Intraepiteliais ao Carcinoma Invasor.....	25
FIGURA 3:	Modelo tridimensional do Papiloma vírus Humano.....	26
FIGURA 4:	Organização genômica do Papilomavírus Humano.....	27
FIGURA 5:	Associação das proteínas E6 e E7 com as proteínas de controle do Ciclo celular.....	30
FIGURA 6:	Progressão das Lesões Escamosas Intraepiteliais e a infecção pelo HPV.....	32
FIGURA 7:	Incidência cumulativa da progressão de lesões provocadas por HPV para Displasia acentuada ou Câncer de Colo uterino.....	35
FIGURA 8:	Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas.....	36
FIGURA 9:	Secção de Carcinoma Escamoso Invasor do Colo uterino.....	36
FIGURA 10:	Raspado de células escamosas do Colo uterino.....	38
FIGURA 11:	Células escamosas cervicais com diagnóstico de ASC-US.....	40
FIGURA 12:	Células coilocitóticas em exame citológico.....	44
FIGURA 13:	Montagem do complexo proteico pré-replicativo durante o licenciamento das ORIs.....	52
FIGURA 14:	Organograma ilustrativo do processo de coleta e processamento das amostras de CML.....	61
FIGURA 15:	se diagnóstico citológico apresentadas pelas pacientes analisadas no presente trabalho.....	73
FIGURA 16:	Curva de diluição do anticorpo MCM7 em amostras de citologia em meio líquido.....	74
FIGURA 17:	Curva de diluição do anticorpo anti-MCM7 em esfregaços de células Hela.....	75
FIGURA 18:	Curva de diluição do anticorpo anti-L1 do HPV em amostras de citologia em meio líquido.....	76
FIGURA 19:	Imunocitoquímica para a proteína MCM7 nas amostras cervicais de citologia em meio líquido.....	77
FIGURA 20:	Imunocitoquímica para a proteína L1 do HPV nas amostras cervicais de citologia em meio líquido.....	80

FIGURA 21: Gel representativo da amplificação do fragmento de 110pb do gene de β globina humano.....	84
FIGURA 22: Gel representativo da amplificação dos fragmentos virais de 150pb e 450pb, respectivamente.....	85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1:	Correlação das terminologias utilizadas para descrição das Lesões Escamosas Intraepiteliais e Invasoras do Colo Uterino.....	23
QUADRO 2:	Correspondência entre o resultado histopatológico e as amostras categorizadas como ASCUS pela Citologia.....	42
QUADRO 3:	Análise da evolução e das alterações citológicas em pacientes diagnosticadas como ASCUS, LSIL e HSIL.....	43
QUADRO 4:	Grupos de pacientes selecionadas para estudo.....	58
TABELA 1:	Especificações dos Anticorpos utilizados na técnica de Imunocitoquímica.....	63
TABELA 2:	Componentes do Mix de PCR para o gene de β -globina humano.....	66
TABELA 3:	Programa de Amplificação do gene de β -globina humano.....	66
TABELA 4:	Componentes do Mix de PCR para amplificação do fragmento viral de 450pb.....	68
TABELA 5:	Programa de Amplificação do fragmento viral de 450pb.....	68
TABELA 6:	Componentes do Mix de PCR para amplificação do fragmento viral de 150pb.....	69
TABELA 7:	Programa de Amplificação do fragmento viral de 150pb	69
TABELA 8:	Classificação das amostras de CML de acordo com o diagnóstico citológico.....	72
TABELA 9:	Resultado da análise Imunocitoquímica para a proteína MCM7 em amostras de Citologia em meio líquido.....	78
TABELA 10:	Resultado da análise Imunocitoquímica para a proteína L1 do HPV em amostras de citologia em meio líquido.....	81
TABELA 11:	Relação entre a expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV	82
TABELA 12:	Prevalência do HPV na população estudada.....	86
TABELA 13:	Relação entre a expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV e a presença ou ausência do DNA do HPV	87

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1 O Câncer de Colo Uterino.....	18
1.2 As lesões precursoras do Carcinoma de Colo uterino.....	19
1.3 Sistema de classificação de Bethesda das Lesões Escamosas Intraepiteliais Cervicais.....	21
1.4 A Patogênese do Carcinoma de Células Escamosas.....	23
1.5 O Vírus do Papiloma Humano (HPV)	25
1.5.1 Propriedades Gerais.....	25
1.5.2 O Genoma Viral.....	26
1.5.3 O Ciclo de Vida do HPV.....	30
1.5.4 Classificação dos HPV.....	33
1.5.5 Infecção pelo HPV e o Carcinoma Cervical.....	34
1.6 Métodos Laboratoriais para o Diagnóstico das LEIs e da Infecção pelo HPV	35
1.6.1 Diagnóstico Histológico.....	35
1.6.2 Diagnóstico Citológico.....	37
1.6.3 As Lesões do Tipo ASC-US (Células Escamosas com Atipias de Significado Indeterminado).....	40
1.6.4 Diagnóstico da Infecção pelo HPV.....	43
1.6.5 Detecção de Biomarcadores Específicos.....	45
1.6.5.1 A proteína p16 ^{INK4a}	47
1.6.5.2 O antígeno de Proliferação Ki67.....	48
1.6.5.3 A proteína L1 do HPV.....	49
1.6.5.4 As proteínas MCMs (“ <i>Minichromosome Maintenance Proteins</i> ”) ou Proteínas de Manutenção de Minicromossomos.....	51
2 JUSTIFICATIVA.....	55
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo Geral.....	56
3.2 Objetivos Específicos.....	56

4 METODOLOGIA.....	57
4.1 População Estudada.....	57
4.2 Exame Clínico.....	58
4.3 Coleta e Processamento das Amostras.....	59
4.4 Preparo de esfregaços para a realização das técnicas de Imunocitoquímica.....	60
4.5 Análise Citopatológica.....	62
4.6 Análise Imunocitoquímica.....	62
4.6.1 Interpretação das Marcações para MCM7 e L1 do HPV.....	63
4.7 Análise Molecular.....	64
4.7.1 Amplificação do fragmento do gene de β -globina Humano.....	66
4.7.2 Detecção do DNA do HPV por meio de PCR.....	67
4.7.2.1 Amplificação por PCR dos Fragmentos de 450pb e 150pb do gene L1 do Genoma Viral.....	67
4.8 Cultura de Células Hela.....	70
5 RESULTADOS.....	72
5.1 Estudo morfológico das Amostras Cervicais Coletadas por Citologia Em Meio Líquido (CML).....	72
5.2 Padronização da técnica de Imunocitoquímica para as proteínas MCM7 e L1 do HPV	74
5.3 Detecção Imunocitoquímica da Proteína MCM7 em amostras de citologia em meio líquido.....	76
5.4 Detecção Imunocitoquímica da Proteína L1 do HPV em amostras de citologia em meio líquido.....	79
5.5 Relação entre a expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV.....	82
5.6 Integridade do DNA extraído das amostras.....	83
5.7 Prevalência do HPV na população estudada.....	84
5.8 Relação entre a expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV e a presença do DNA do HPV.....	86
6 DISCUSSÃO.....	87

7 CONCLUSÕES.....	100
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
9 SEÇÃO DE ANEXOS.....	115

1.1- O CÂNCER DO COLO UTERINO

O câncer do colo do útero (CCU), assim como os demais tipos de câncer, é uma doença resultante de alterações que determinam um crescimento celular desordenado pelo organismo.

De forma geral, o câncer do colo do uterino corresponde a cerca de 15% de todos os tipos de câncer femininos, sendo o terceiro tipo mais frequente entre as mulheres, podendo as lesões precursoras iniciarem na faixa etária de 20 a 29 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário entre 50 a 60 anos (INCA, 2011). No Brasil a maior incidência acontece nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Ainda, segundo dados do INCA, estima-se 15.590 novos casos de câncer de colo no Brasil no ano de 2014, sendo 880 em Minas Gerais e 180 em Belo Horizonte (INCA, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a experiência de alguns países desenvolvidos mostra que a incidência do câncer do colo do útero foi reduzida em torno de 80%, mediante a implantação de programas de rastreamento, tratamento e acompanhamento, eficazes e de qualidade (WHO, 2007).

Uma característica desse tipo de câncer é a sua consistente associação em todas as regiões do mundo, com o baixo nível socioeconômico, ou seja, com os grupos que têm maior vulnerabilidade social, apresentando incidência duas vezes maior em países menos desenvolvidos. Esse aumento de incidência está frequentemente relacionado a vários indicadores de menor poder socioeconômico, incluindo o nível de educação, a renda e a falta de ocupação. Alguns fatores relacionados ao comportamento sexual são considerados de risco para o desenvolvimento do CCU, entre eles a multiplicidade de parceiros sexuais, o início precoce da vida sexual, o tabagismo, entre outros, que estariam associados a uma maior probabilidade de aquisição ou cronificação da infecção pelo vírus do Papiloma Humano- o HPV (SCHIFFMAN & BRINTON, 1996; CAVALCANTI *et al.*, 2000; CASTELLSAGUE, *et al.*, 2002; PARIKH, *et al.*, 2003).

Atualmente, a via de transmissão sexual é considerada a de maior importância para o aparecimento do câncer do colo do útero. Desde 1992, a OMS considera que a persistência da infecção pelo HPV associada à presença de altas cargas virais, representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

Após o início da atividade sexual a possibilidade de contato com o HPV aumenta progressivamente: 25% das adolescentes apresentam infecção pelo HPV durante o primeiro ano após iniciação sexual e três anos depois esse percentual sobe para 70%. Dessa forma a aplicação da vacina contra alguns tipos específicos de HPV, considerados os mais comumente encontrados nas lesões cervicais, têm sido indicada em homens e mulheres na faixa etária dos 9 aos 26 anos de idade. Existem duas vacinas profiláticas contra HPV aprovadas e registradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e que estão comercialmente disponíveis: a vacina quadrivalente, da empresa Merck Sharp & Dohme (nome comercial Gardasil), que confere proteção contra HPV 6, 11, 16 e 18; e a vacina bivalente, da empresa GlaxoSmithKline (nome comercial Cervarix), que confere proteção contra HPV 16 e 18 (INCA, 2014).

Os dois principais tipos histológicos de carcinoma cervical são o Carcinoma Invasor de Células Escamosas (CCE) e o Adenocarcinoma, que correspondem a 70% e 25% dos casos, respectivamente (BROWN & TRIMBLE, 2012). Porém esse padrão de distribuição tem se alterado ao longo dos anos. Estudo de meta-análise relata que, em 2003 o Adenocarcinoma representava cerca de 10 a 12% dos casos de carcinoma cervical (BOSCH & SANJOSE, 2002). Destaca-se que lesões glandulares são mais difíceis de serem diagnosticadas na fase inicial através dos programas de rastreamento, de forma que as inovações nas técnicas de exame preventivo como, por exemplo, a implementação da técnica de citologia em meio líquido (CML), poderiam explicar o aumento na porcentagem de detecção dos casos de lesões glandulares (CHEUNG *et al.*, 2003).

A evolução do câncer de colo na maioria dos casos se dá de forma lenta, passando por fases pré-clínicas detectáveis e curáveis, correspondentes às lesões pré-malignas, especialmente lesões escamosas de alto grau, precursoras do câncer do colo uterino. Programas de rastreamento dessas lesões têm diminuído bastante a incidência do câncer cervical (BALDWIN *et al.*, 2003), pois dentre todos os tipos de câncer, é o que apresenta um dos mais altos potenciais de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente (SCHLETCHT *et al.*, 2003).

1.2- AS LESÕES PRECURSORAS DO CARCINOMA DE COLO UTERINO

Historicamente, a definição do conceito de lesões precursoras do colo uterino remonta ao fim do século XIX, quando áreas de alterações atípicas não invasivas, foram visualizadas em amostras teciduais adjacentes às neoplasias invasivas. No final dos anos 50 foi introduzido o termo “displasia,” para designar as atipias intraepiteliais de grau intermediário entre o epitélio normal e o Carcinoma *in situ* (CIS- lesões nas quais as células não diferenciadas alcançavam toda a extensão do epitélio, sem invasão do epitélio adjacente). O termo foi categorizado em três grupos – leve, moderada e acentuada - dependendo do grau de comprometimento na diferenciação do epitélio pelas células pré-neoplásicas (RICHART, 1973).

O termo NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) foi introduzido em 1968, para indicar as atipias celulares limitadas ao epitélio, sendo divididas em NIC I, II e III, que correspondiam à displasia leve, moderada e acentuada/CIS, respectivamente (RICHART, 1968). As NICs são lesões epiteliais que consistem em uma proliferação celular associada à desorganização da estratificação das camadas de células epiteliais pavimentosas, que revestem a ectocérvice (JENKINS, 2007).

Histologicamente, os critérios utilizados para definir a NIC I são o aumento da espessura das camadas basal e parabasal do epitélio e a presença de coilócito na camada superficial do epitélio, característico da infecção produtiva pelo HPV, e considerado o achado patognomônico dessa infecção (JENKINS, 2007). O coilócito pode ser caracterizado como uma célula com cavitação citoplasmática perinuclear nitidamente delineada, apresentado borda citoplasmática de coloração densa, dando à célula um aspecto globoso (SOLOMON & NAYAR, 2005). Quando a lesão é do tipo NIC II, as células imaturas em proliferação persistem até o terço médio do epitélio, e as atipias nucleares são mais proeminentes do que nas lesões do tipo NIC I. As lesões classificadas como NIC III apresentam perda de maturação em quase toda a extensão do epitélio (Figura 1).

Pelo diagnóstico citológico, as lesões do tipo NIC I ou LBG (Lesão de Baixo Grau) apresentam alterações na relação núcleo/citoplasma (N/C), sendo que o núcleo ocupa cerca de 1/3 do citoplasma, além dos efeitos citopáticos do HPV, ou seja, atipia coilocítica (SOLOMON & NAYAR, 2005). As células ocorrem isoladas ou em lençóis e há predomínio das discarióticas do tipo intermediária ou superficial.

As lesões do tipo LAG (Lesões de Alto Grau) compreendem a displasia moderada ou NIC II, e a displasia acentuada ou NIC III / CIS. A relação N/C vai aumentando à medida que ocorre o aumento do grau da lesão, sendo a cromatina granular e distribuída irregularmente. As células vão se tornando cada vez mais arredondadas, com citoplasma de aparência imatura, e podem ocorrer sozinhas, em agregados sinciciais ou em fila indiana (MEISELS & MORIN, 1997; SOLOMON& NAYAR, 2005).

As lesões escamosas intraepiteliais podem regredir, persistir ou progredir, dependendo da resposta imune de cada paciente (GRAVITT, 2011). Nas lesões do tipo NIC I, em cerca de 60% dos casos ocorre regressão espontânea, 30% podem apresentar persistência e menos de 10% podem evoluir para NIC II ou III, sendo a progressão ao câncer invasor estimada em 1%. Nos casos de NIC II, 43% das mulheres podem apresentar regressão espontânea, 35% poderão persistir nessa lesão, 22% poderão progredir à NIC III e 1,5% ao câncer. Com relação à NIC III, a probabilidade de regressão é bem menor (32%), enquanto 56% dessas lesões podem persistir e 12% podem progredir ao câncer (GOMPEL & KOSS, 1997; ZUR HAUSEN, 2002; SCHLETTCHT *et al.*; 2003; GRAVITT, 2011) .

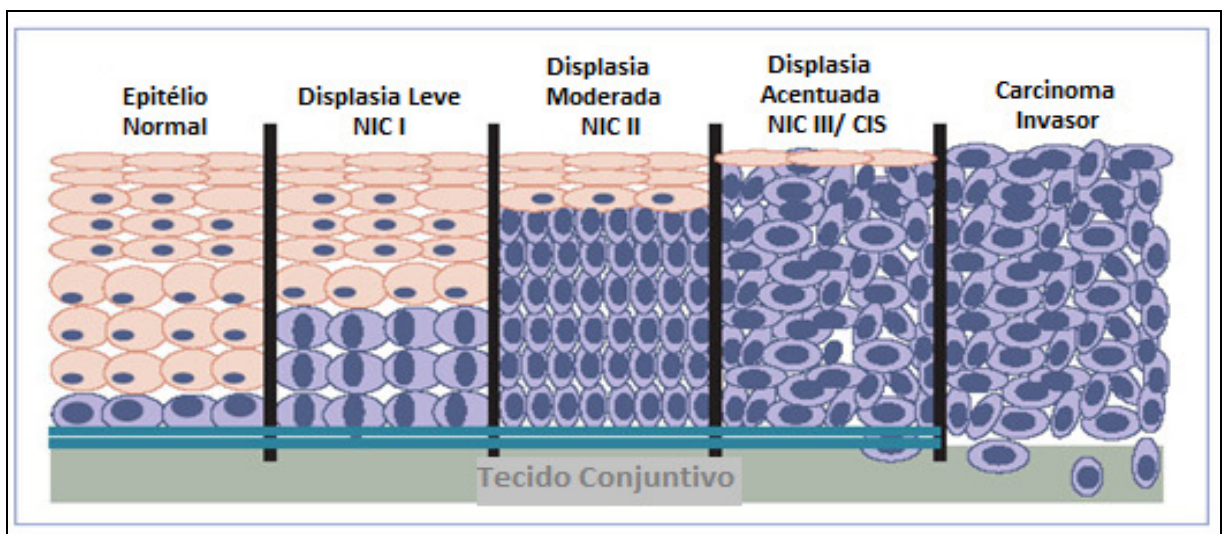


FIGURA 1: Modelo de progressão das lesões escamosas precursoras ao Carcinoma Escamoso Cervical Invasor. As células da camada basal vão perdendo a capacidade de maturação e diferenciação à medida que ocorre o aumento do grau da lesão. Até as lesões do tipo NIC III as alterações estão restritas ao epitélio. Porém quando acontece a invasão há o rompimento da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo adjacente. **Fonte: Colomer, *et al.*, 2008.**

1.3- SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE BETHESDA DAS LESÕES ESCAMOSAS INTRAEPITELIAIS CERVICAIS

Como já citado anteriormente, a nomenclatura de classificação das lesões intraepiteliais cervicais sofreu algumas modificações nos últimos anos (Quadro 1). Em dezembro de 1988 surgiu o Sistema de Classificação de Bethesda (TBS), que foi baseada em dois princípios fundamentais: (i) a terminologia deveria ser capaz de transmitir ao médico informações clinicamente relevantes; (ii) as informações deveriam ser uniformes e razoavelmente reproduzíveis entre diferentes patologistas e laboratórios (SOLOMON & NAYAR, 2005).

A primeira novidade do sistema TBS foi a proposta de divisão das lesões intraepiteliais em dois grandes grupos: A) Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LBG), traduzido do inglês *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions* (LSIL), correspondente a NIC I pela nomenclatura anterior; B) Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau (LAG), do inglês *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions* (HSIL), que corresponderiam às NIC II e III (DENNY *et al.*, 2012). Outra novidade importante desse sistema foi a criação da nomenclatura ASCUS, do inglês *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*. Esse termo se refere às células que apresentam anormalidades mais importantes do que as encontradas em processos reativos, mas que são qualitativamente ou quantitativamente insuficientes para ser diagnosticadas como lesão intraepitelial (CRUM *et al.*; 1997). A interpretação de ASCUS requer que as células apresentem três características essenciais: (i) diferenciação escamosa, (ii) aumento da proporção da área do núcleo em relação ao citoplasma e (iii) hiper Cromasia nuclear mínima, com agrupamento de cromatina e/ou multinucleação (SOLOMON & NAYAR, 2005).

Na revisão do sistema de Bethesda em 2001, o termo ASCUS foi subdividido em ASC-US (do inglês *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) e ASC-H (do inglês *Atypical Squamous Cells that cannot exclude High-grade lesions*). O termo ASC-US se refere às alterações difíceis de distinguir entre os processos intensamente reativos e as Lesões de Baixo Grau. Apesar de a maioria das interpretações de ASC-US serem sugestivas de lesões do tipo LSIL, o uso do termo qualificador “significado indeterminado” é apropriado porque uma expressiva quantidade (10 a 20%) de mulheres com ASC-US, são diagnosticadas posteriormente como portadoras de lesão de alto grau pelo exame histopatológico (BOARDMAN & KENNEDY, 2008; SIDDIQUI *et al.*, 2008). O termo ASC-H é uma

denominação reservada para a minoria dos casos de ASC (menos de 10%), onde as alterações citológicas são de difícil distinção entre metaplasia imatura reativa e HSIL (BARCELOS *et al.*, 2011). Apenas as amostras duvidosas, e especialmente sugestivas de HSIL, devem ser classificadas nessa categoria (SOLOMOM & NAYAR, 2005).

QUADRO 1: Correlação das terminologias utilizadas para descrição das Lesões Escamosas Intraepiteliais e Invasoras do Colo Uterino

Sistema Papanicolaou (1940)	Sistema OMS (1950)	Sistema NIC (1967)	Sistema Bethesda (1988)	Sistema Bethesda Modificado (2001)
Classe I	Normal	Normal	Dentro dos limites de normalidade	Dentro dos limites de normalidade
Classe II	Inflamação	Inflamação	Alterações celulares benignas	Alterações celulares benignas
-	-	-	ASCUS	ASC-US ASC-H
Classe III	Displasia leve Displasia moderada Displasia acentuada	NIC I NIC II NIC III	LSIL (Lesão baixo grau) HSIL (Lesão de alto grau/Displasia moderada) HSIL (Lesão alto grau/Displasia acentuada)	LSIL (Lesão baixo grau) HSIL (Lesão alto grau)
Classe IV	Carcinoma “in situ”	NIC III	HSIL (Carcinoma “in situ”)	HSIL (Lesão alto grau)
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma Invasor

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical; **LSIL** – *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau); **HSIL** – *High Grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau); **ASCUS** - *Atypical Squamous Cells Of Undetermined Significance* (Células Escamosas atípicas de significado indeterminado); **ASC-H** - *Atypical Squamous Cells that cannot exclude High-Grade* (Células Escamosas Atípicas não podendo excluir lesões de Alto Grau).

1.4- A PATOGÊNESE DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Nos últimos anos, muitos estudos foram dedicados à melhor compreensão da patogênese do carcinoma de células escamosas e de suas lesões precursoras. Como mencionado, atualmente a teoria mais aceita para a explicação do aparecimento do câncer do colo do útero repousa na transmissão sexual.

Trabalhos epidemiológicos já demonstraram que o risco de se desenvolver câncer do colo está intimamente relacionado ao comportamento sexual, o que justifica a grande associação com a infecção pelo HPV (SCHIFFMAN & BRINTON, 1996). Desde 1992, a OMS considera que a persistência da infecção pelo Papilomavírus Humano em altas cargas virais, representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença (Figura 2). Sabe-se também que a infecção pelo HPV é essencial, mas não suficiente para determinar a evolução do câncer (BOSCH & MUÑOZ, 2002; BOSCH & de SANJOSÉ, 2002). Dessa forma, a presença de fatores imunológicos (a imunossupressão causada pelo HIV e outras DSTs), virais (a carga viral e os tipos de HPVs) e comportamentais (a existência de múltiplos parceiros, o tabagismo, a multiparidade, o uso de anticoncepcionais orais e o início precoce da vida sexual), poderia contribuir para o aumento da probabilidade de progressão das lesões intraepiteliais cervicais em direção ao carcinoma invasor (HILDESHEIM & WANG, 2002; SANJOSÉ, 2002; BOSCH & SANJOSÉ, 2003; FRANCO, 2004; THOMISON, *et al.*, 2008).

Atualmente o modelo mais aceito para a progressão das lesões cervicais seria a persistência da infecção pelo HPV, principalmente os considerados de alto risco oncogênico. O DNA do HPV tem sido demonstrado em 99,7% dos casos de câncer cervical (BOSCH & SAN JOSÉ, 2002; THOMISON *et al.*, 2008; DOORBAR *et al.*, 2012). Considera-se que a associação da infecção por HPVs de alto risco com fatores mutagênicos e/ou a deficiência imunológica, pode levar a um aumento da expressão dos oncogenes virais E6 e E7 e à consequente progressão das lesões cervicais até o carcinoma uterino (SELLORS *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2002; BOSCH & SANJOSÉ, 2002; ZUR HAUSEN, 2002; SCHILLER & KINES, 2010).

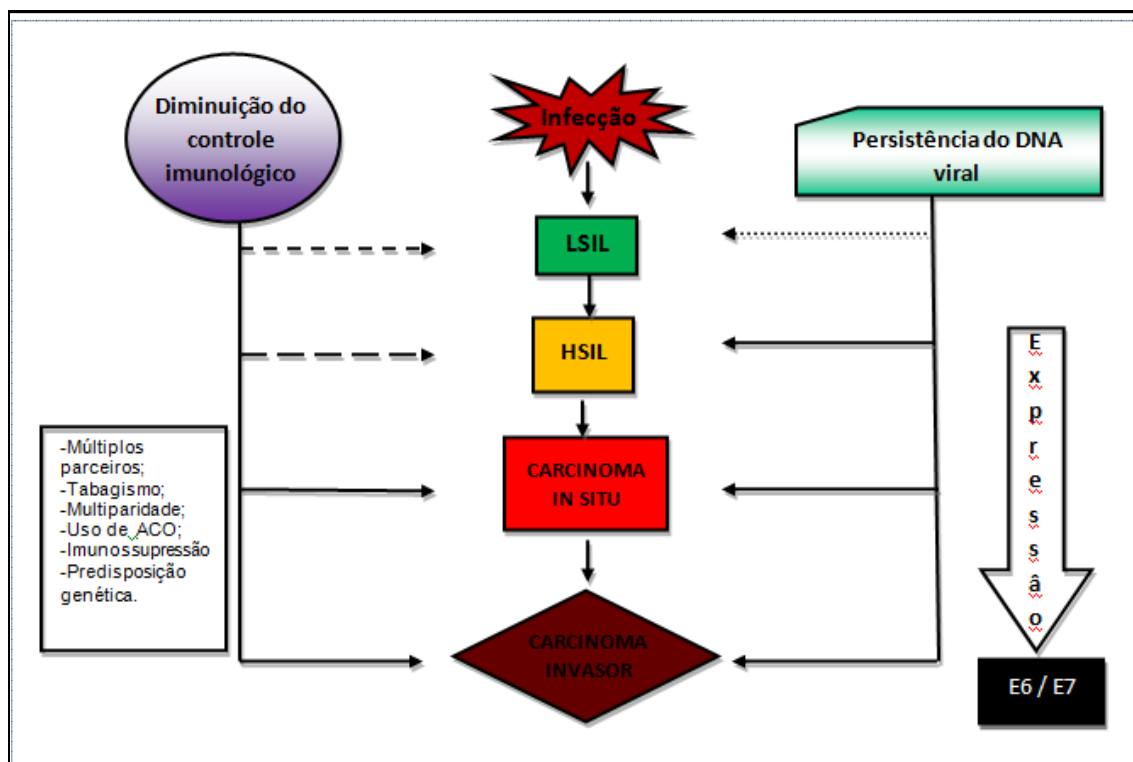


FIGURA 2: Fatores envolvidos na progressão das Lesões Escamosas Intraepiteliais ao Carcinoma Invasor LSIL – *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau), HSIL – *High Grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau) **Fonte: Zur Hausen, 2002 - Modificado.**

1.5- O VIRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

1.5.1- PROPRIEDADES GERAIS

O HPV faz parte do gênero Papilomavírus da família *Papillomaviridae*. Consiste em um vírus de 55nm de diâmetro, apresentando DNA circular em dupla fita, não envelopado e capsídeo icosaédrico composto de 72 pentâmeros (Figura 3). Sua preferência pelo tecido epitelial (epiteliotropismo) induz à formação de lesões na pele (verrugas) e mucosas (condilomas). O nome Papilomavírus foi derivado do latim *papila*, que corresponde ao diminutivo de *papula* ou projeção (CAMARA *et al.*, 2000; VILLIERS *et al.*, 2004; FIELDS, 2007).

Apesar do conhecimento de que outros membros do grupo dos Papilomavírus eram carcinogênicos em coelhos, e também capazes de transformar alguns tipos de células de roedores (ZUR HAUSEN & DE VILLIERS, 1994), até a década de 1970, não havia sido estabelecida uma correlação entre o HPV e o carcinoma cervical humano. A partir do final da

década de 1970, foram identificados diversos tipos de HPV em várias lesões de pele e de mucosas – verrugas, displasias epiteliais e carcinomas da cérvix uterina e de pênis - o que reforçou a importância médica do HPV (DOORBAR & STERLING, 2001). Na década de 1980, o isolamento de tipos específicos de HPV em biópsias de câncer cervical, abriu caminho para estudos detalhados do papel desses vírus nos cânceres genitais (ZUR HAUSEN & de VILLIERS, 1994).

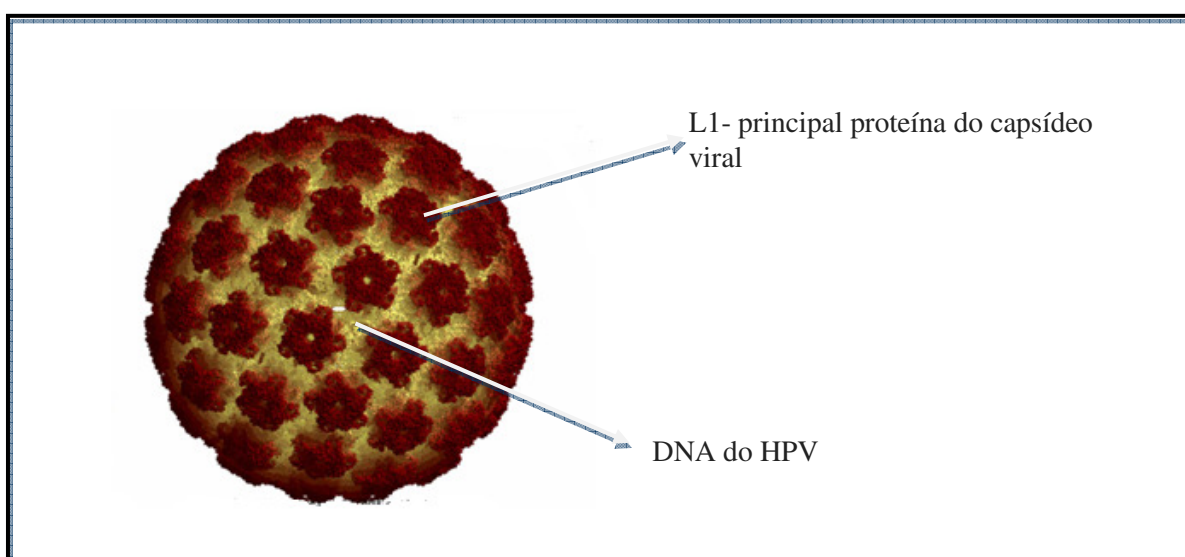


FIGURA 3: Modelo tridimensional do Papilomavírus Humano. As partículas virais consistem em uma única molécula de DNA circular de dupla hélice de aproximadamente 8Kb, circundada por um capsídeo proteico composto por 72 capsômeros. **Fonte:** <http://www.virology.wisc.edu>

1.5.2- O GENOMA VIRAL

O genoma do vírus é formado por duas fitas circulares de DNA, com cerca de 8.000 pares de bases (pb) ou 8Kb, ligadas covalentemente e associadas a histonas de origem celular (Figura 4). Três regiões genômicas no DNA do HPV são reconhecidas: uma região de expressão precoce E (do inglês *Early Coding Region*), uma região expressa tardiamente L (do inglês *Late Coding Region*) e uma região não codificadora LCR (do inglês *Long Control Region*) também denominada URR (do inglês *Upstream Regulatory Region*) (de VILLIERS, *et al.*, 2004; zur HAUSEN, 2002; TYRING, 2000).

A região E, codifica as proteínas necessárias para a replicação viral e a manutenção do grande número de cópias do vírus nas células infectadas. Seis diferentes ORFs designadas E1,

E2, E4, E5, E6 e E7 foram identificadas nessa região do genoma do HPV (TYRING, 2000; KURMAN, 2002; DOORBAR, 2005).

A ORF E1 é a maior de todas e codifica uma proteína que exerce um papel fundamental na regulação extra-cromossômica da replicação do DNA viral. Tem ainda sido mostrado, que a proteína E1 apresenta atividade de ATPase (TYRING, 2000 ; DOORBAR, 2005).

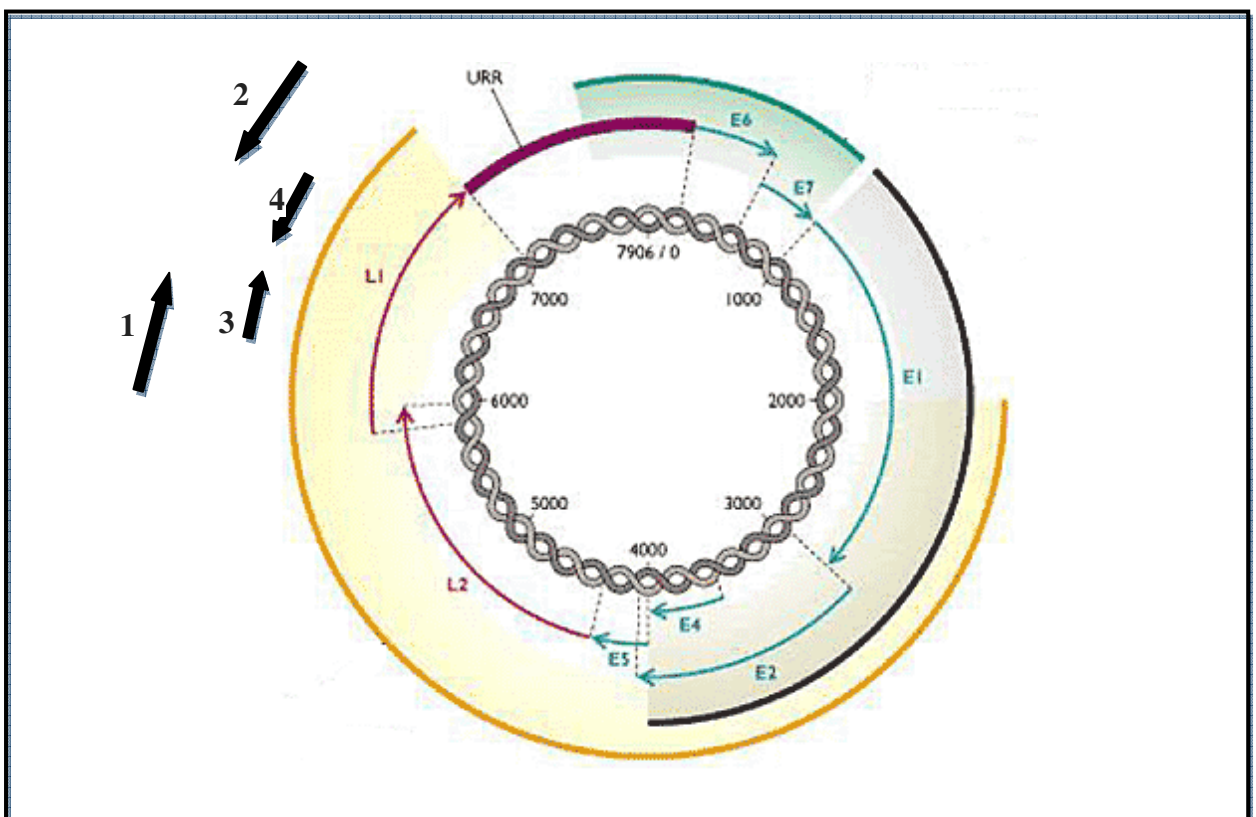


FIGURA 4: Organização genômica do Papilomavírus Humano. O genoma do Vírus do Papiloma Humano contém aproximadamente 8000 pares de bases e é dividido em três regiões: E (*Early* ou precocemente transcrita); L (*Late* ou tardiamente transcrita); URR (*Upstream Regulatory Region* ou região reguladora). A região de alinhamento dos pares de iniciadores MY09/MY11 e GP5/GP6 é mostrada no esquema: 1- MY09; 2- MY11; 3- GP5; 4 GP6.

Fonte: http://www.colon.it/Condilomi_anali.html- modificado

A proteína E2 promove com E1 a montagem de complexos enzimaticamente ativos nas ORIs (Origem de Replicação), sendo o complexo E1-E2-ORI necessário para iniciar a replicação viral. A E2 também participa da regulação da transcrição do DNA viral, com capacidade de ativá-la ou inibi-la. Possui importante papel na regulação da expressão das duas

proteínas chaves da ORF, as oncoproteínas E6 e E7, como será descrito adiante (KURMAN, 2002; DOORBAR, 2005).

O gene E4 codifica uma proteína associada à maturação e à replicação virais. ROBERT e colaboradores (1997) mostraram em estudos *in vitro*, que E4 pode se associar à rede de filamentos intermediários dos queratinócitos, provocando o colapso dessa rede e consequentemente, do citoesqueleto, aumentando assim a fragilidade das células infectadas e a chance de maior liberação das novas cópias virais. A expressão desta proteína é co-localizada com aquela da proteína L1 (DOORBAR *et al.*, 1997; TYRING *et al.*, 2000; KURMAN, 2002; ALVARENGA *et al.*, 2001; BLANCHON & DEMRET, 2003).

A ORF de E5 codifica uma proteína hidrofóbica preferencialmente encontrada no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático e na membrana nuclear das células infectadas. A E5 é capaz de interagir com várias proteínas transmembranas como os receptores do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR- do inglês- *Epidermal Growth Factor Receptor*), e do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF-do inglês-*Platelet Derived Growth Factor Receptor*) (GROSS *et al.*, 1999; MÜNGER *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; BLANCHON & DEMRET, 2003; FEHRMANN *et al.*, 2003; GENTHER *et al.*, 2003; MOTOYAMA *et al.*, 2004).

Porém E6 e E7 são consideradas as duas principais proteínas envolvidas no mecanismo de transformação e imortalização celulares, induzido por HPVs de alto risco oncogênico. As ações de ambas se completam, e são consideradas pouco ativas quando transfectadas isoladamente em experimentos *in vitro*. Os genes E6 e E7 são quase sempre ativos no câncer cervical, o que comprova que a super - expressão desses genes é necessária para a manutenção do fenótipo maligno (ZUR HAUSEN & de VILLIERS, 1994; KURMAN, 2002; LONGWORTH & LAIMINS, 2004; DOORBAR, 2006; ISAACSON *et al.*, 2012).

A proteína E6 se liga a P53, uma proteína supressora de tumor que regula a expressão das proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular, incluindo a P21, um inibidor das CdKs (Quinases dependentes de Ciclinas). Após um dano no DNA, a proteína P53 ativa a super-expressão da proteína P21 resultando na parada do ciclo celular seguida de apoptose. A proteína E6 é capaz de se ligar à P53 via ligação de E6AP (do inglês *E6-Associated Protein*), ubiquitina ligase que leva à degradação de P53 por um mecanismo dependente de E6AP. A perda de função de P53 acarreta na perda de regulação do ciclo celular e na abolição da apoptose (ZUR HAUSEN, 2003; DOORBAR, 2005; JO & KIM, 2005).

A E7 por sua vez, se liga à pRb ou Proteína do Retinoblastoma, uma proteína que exerce regulação negativa sobre o ciclo celular. Na passagem da fase G0 para G1, a proteína pRb se encontra na forma não-fosforilada e se liga ao fator de transcrição E2F, impedindo a passagem do ciclo da fase G1 para a fase S. A inativação de pRb pela oncoproteína E7 induz ao aumento de E2F, desencadeando uma proliferação celular descontrolada (Figura 5) (PARRY *et al.*, 1995; SAKAGUCHI *et al.*, 1996; KURMAN, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2006).

A região L do genoma do HPV codifica duas proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral, denominadas L1 e L2.

L1 é a proteína principal do capsídeo viral e altamente conservada entre todos os tipos de HPV sendo específica para cada gênero, diferente de L2, proteína secundária que é variável entre os tipos de HPV. A transcrição dos genes L1 e L2 ocorre nas células diferenciadas do epitélio escamoso na fase tardia do ciclo celular, no momento da montagem das novas partículas virais nas infecções do tipo produtiva. A expressão de L1 é altamente relacionada com a presença do vírus intacto, sendo esse gene amplamente usado como alvo de identificação viral por métodos de biologia molecular (Figura 4). Além disso, a expressão da proteína pode ser analisada em tecidos ou esfregaços por meio de Imunohistoquímica /Imunocitoquímica. Vários estudos mostram que L1 pode ser detectada em uma grande porcentagem das lesões de baixo grau, que são normalmente consideradas do tipo produtiva, enquanto pequena porcentagem de positividade para L1 é observada em lesões de alto grau e câncer uterino (MELSHEIMER *et al.*, 2003; KURMAN, 2002; UNGUREANU *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2010; SARMADI *et al.*, 2012).

Embora os capsídeos possam ser montados sem a presença de L2, parece que essa proteína contribui para uma formação mais eficiente das partículas virais, além de aumentar a infectividade do vírus (KURMAN, 2002; DOORBAR, 2006; FIELDS, 2007).

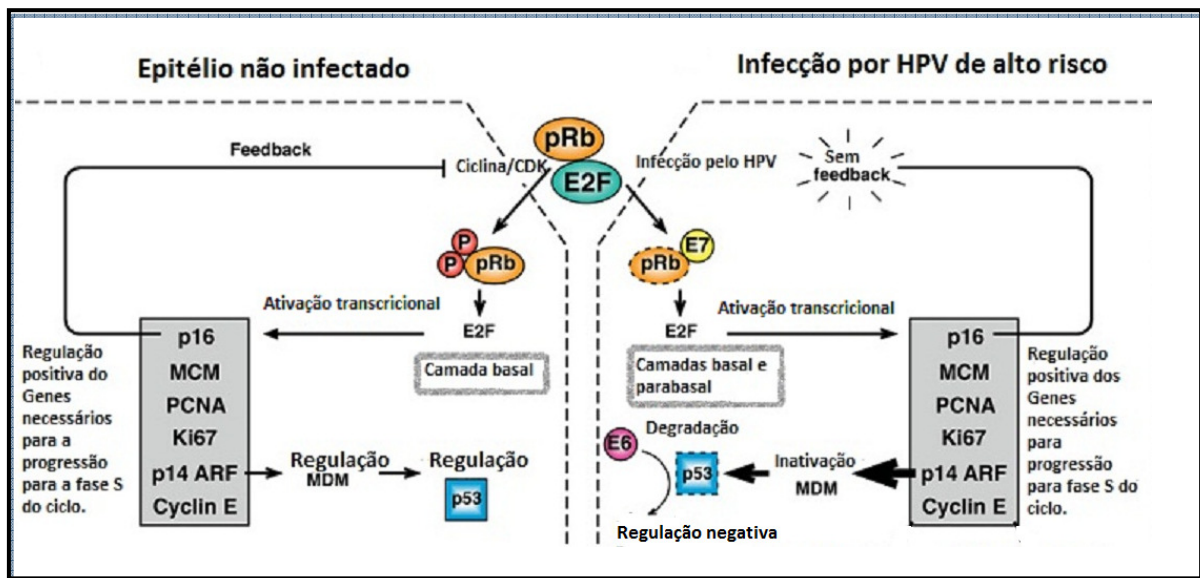


FIGURA 5: Associação das proteínas E6 e E7 com as proteínas de controle do Ciclo celular. Na figura à esquerda a fosforilação sequencial de pRb pelo complexo ciclina/CDK, inibe a atividade repressora de pRb com liberação do fator de transcrição E2F, que induz a transcrição de vários genes e a progressão da fase S. A proteína E7 de HPVs de alto risco (à direita na figura) se liga à forma hipofosforilada de pRb. Esta ligação interrompe o complexo repressor formado por pRb e o fator de transcrição E2F, resultando na liberação de E2F permitindo assim a indução da proliferação celular. Várias proteínas envolvidas no controle do ciclo, incluindo as MCMs tem sua expressão alterada como consequência desse evento. A oncoproteína E6 (na figura, direita/abaixo) é capaz de se associar à proteína reguladora do ciclo celular p53 via E6AP (proteína associada à E6), resultando na ubiquitinação de p53 e subsequente degradação proteolítica. Este efeito anula a ativação transcricional e as propriedades repressoras de p53 e interrompe sua habilidade de bloquear o ciclo celular. **Fonte: Doorbar, 2006 - Modificado.**

1.5.3- CICLO DE VIDA DO HPV

Embora o ciclo de vida do HPV não seja completamente caracterizado, alguns eventos já são bastante conhecidos. O ciclo biológico dos HPVs na pele ou mucosa tem início quando as partículas virais penetram, por meio de fissuras ou de micro-lesões nas células da camada profunda, que são as células menos diferenciadas do epitélio escamoso, e que apresentam atividade mitótica. O vírion parece entrar na célula pela interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da superfície celular, como por exemplo a integrina alfa, apontada em estudos *in vitro* como um receptor celular para os Papilomavírus (EVANDER *et al.*, 1997; MCMILLAN *et al.*, 1999; CULP *et al.*, 2006; SURVILADZE, *et al.*, 2012).

Modelos experimentais sugerem, que a infecção requer o acesso das partículas virais (composta por DNA viral e pelas duas proteínas do capsídeo icosaédrico, L1 e L2) até a lâmina basal, após a interação dessas proteínas com os proteoglicanos heparan- sulfato e,

possivelmente, com a glicoproteína laminina (GIROGLOU *et al.*, 2001; CULP, *et al.*, 2006; JOHNSON *et al.*, 2009; SURVILADZE, *et al.*, 2012). A hipótese sugerida é a de que a ligação da proteína viral L1 ao receptor de heparan-sulfato, presente na superfície celular, poderia induzir a uma alteração conformacional que resultaria na exposição da região amino-terminal da proteína L2. A exposição dessa região permitiria o acesso a uma região de L2 altamente conservada, e reconhecida pela enzima furina- convertase presente na superfície celular. Essa enzima causaria uma quebra na região conservada de L2, com exposição do sítio de ligação a um co-receptor, cuja natureza precisa ainda não foi definida, embora a integrina α seja apontada como um dos prováveis candidatos (DOORBAR, 2006; SAPP *et al.*, 2009; HOVART *et al.*, 2010).

Uma vez internalizada na vesícula endossômica, a partícula viral é desmontada restando a proteína L1 e o complexo L2-genoma viral. Nesse estágio, a atividade catalítica da enzima Υ - sintetase promove o escape do complexo proteína L2-DNA viral da vesícula endossômica, seguindo-se o encaminhamento desse complexo para o núcleo com o auxílio da proteína motora dineína (BERGANT *et al.*, 2012; SCHELHAAS *et al.*, 2012).

Depois de penetrar nas células da camada basal, o vírion perde seu capsídeo expondo o seu DNA à ação de enzimas nucleares, o que favorece a expressão dos genes virais. Após a infecção, acredita-se que o vírus mantenha seu genoma com um baixo número de cópias, 50 a 100 cópias por célula, sob a forma episomal (McMURRY *et al.*, 2001). Nesta fase, há um baixo nível de expressão dos genes E1, E2, E6 e E7, suficiente apenas para a manutenção do genoma do vírus (DOORBAR, 2012).

A expressão dos genes virais é regulada e dependente da diferenciação das células infectadas pelo HPV. Segundo DOORBAR (2005), o ciclo normal da infecção pelo HPV passaria por cinco etapas consecutivas: infecção, manutenção do genoma, fase proliferativa, amplificação genômica e a síntese e liberação de novas partículas virais. Para a produção de novas partículas virais nas camadas médias e superiores do epitélio cervical, é necessária a amplificação do genoma do HPV que é dependente da expressão dos genes E1 e E2. Nesta fase mais tardia, os genes L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral juntamente com a expressão de E4, importante na alteração da matriz intracelular, maturação e replicação do vírus. A formação e a liberação de partículas virais completas caracterizam o ciclo produtivo da infecção pelo HPV (Figura 6), (WOODMAN *et al.*, 2001; DOORBAR, 2005; THOMISON, *et al.*; 2008; DOORBAR, 2012).

Ressalta-se que esta organização da expressão viral no ciclo de uma infecção produtiva é semelhante para os diferentes tipos de HPV. Porém, o desenvolvimento de neoplasias está associado à perda da regulação deste ciclo produtivo do HPV, evento observado em infecções persistentes pelos HPVs de alto risco oncogênico, que tendem a integrar o seu genoma ao da célula hospedeira (Figura 6). Durante o processo de integração o DNA viral é linearizado, o que resulta na perda no genoma viral do gene E4 e parte do gene E2, que como mencionado exerce função de controle da transcrição dos demais genes virais. Como consequência da perda de função de E2, poderia haver um aumento da expressão dos genes E6 e E7 capaz de causar a interrupção da maturação das células hospedeiras (ZUR HAUSEN *et al.*, 2002; IARC, 2005; DOORBAR, 2005; ZHENG & BAKER, 2006).

A alta velocidade de proliferação das células infectadas (que já não é mais restrita às camadas inferiores do epitélio), a perda da polaridade e da maturação das células com comprometimento da arquitetura tecidual, assim como a perda da capacidade de completar o ciclo produtivo do vírus, diferenciam as lesões de baixo grau como a NIC I, das lesões de alto grau (as NICs II e III) e câncer provocados por HPVs de alto risco oncogênico (KURMAN, 2002).

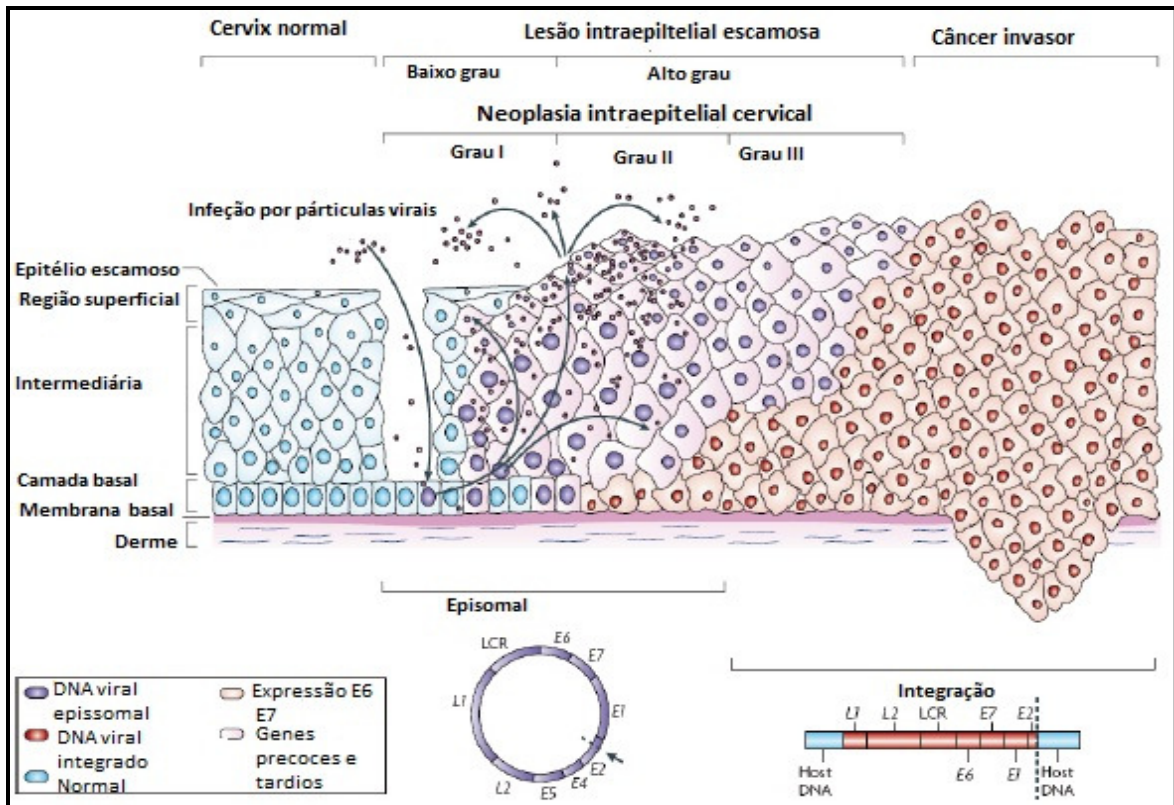


FIGURA 6: Progressão das Lesões Intraepiteliais Escamosas e a infecção pelo HPV.

Através da perda da integridade física do epitélio cervical, as partículas virais infectam as células basais (ou de reserva) da camada mais profunda do epitélio. O DNA viral permanece na célula infectada sob a forma epissomal e as proteínas da região precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são expressas na camada suprabasal. A expressão das proteínas L1 e L2 e a montagem das partículas virais ocorrem na camada superficial. As partículas virais produzidas são liberadas com a descamação do epitélio e podem infectar novas células e iniciar uma nova infecção. Na infecção persistente pode ocorrer a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, com perda do gene E2. Após a integração há o aumento do nível de expressão das oncoproteínas E6 e E7, que podem levar à progressão das lesões até o Carcinoma cervical.

Células com coloração azul= normais; *Células com coloração roxa*= célula com genoma viral na forma epissomal; *Células com coloração vermelha*= células com genoma viral integrado. **Fonte:** Adaptado de Woodman et al. 2007

1.5.4- CLASSIFICAÇÃO DOS HPV'S

Os vírus HPV são classificados de acordo com o seu nicho biológico, potencial oncogênico e filogenia. De acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), as diversas espécies de HPV que infectam o trato genital feminino estão classificadas filogeneticamente dentro do gênero *Alphapapillomavirus* (de VILLIERS et al., 2004).

Mais de 189 tipos virais de HPV já foram identificados e cerca de 40 desses infectam o trato genital feminino (BERNARD et al, 2010). Os tipos de HPV são divididos em

subgrupos que infectam a pele e mucosas, sendo os vírus designados de alto e baixo risco oncogênico, de acordo com a sua capacidade de condução das células infectadas à progressão maligna (de VILLIERS *et al.*, 2004).

A identificação de novos tipos de Papilomavírus é realizada a partir da determinação da sequência nucleotídica da região de L1, gene mais conservado do genoma dos Papilomavírus, como já mencionado. Um novo tipo de papilomavírus é reconhecido, quando apresenta uma sequência de nucleotídeos de L1 que difere acima de 10% da sequência de L1 dos HPVs já conhecidos. Se a divergência na sequência de DNA for entre 2 a 10% um novo subtipo viral foi identificado, e quando essa diferença for menor que 2%, têm-se uma nova variante (de VILLIERS *et al.*, 2004; THOMISON *et al.*, 2008; BERNARD *et al.*, 2010).

Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico, frequentemente associados às NIC de baixo grau e aos condilomas acuminados, são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem frequentemente associados às NIC de alto grau e às neoplasias invasoras são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (STOLER, 2000; MUÑOZ *et al.*, 2003; THOMISON *et al.*, 2008, MELÓN *et al.*, 2013).

1.5.5-INFECÇÃO PELO HPV E O CARCINOMA CERVICAL

Trabalhos desenvolvidos nos últimos 30 anos, confirmam que alguns tipos de HPV têm sido associados ao desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas no colo uterino e outras regiões anatômicas como períneo, vagina, vulva e anus. Nos homens também estão associados ao desenvolvimento de lesões cancerosas no pênis, uretra, bolsa escrotal e região anal. Além das áreas ano-genitais acometidas, comumente descritas na literatura, novas pesquisas vêm demonstrando a presença de HPVs de alto risco oncogênico, e sua possível associação com o desenvolvimento de malignidade na região orofaríngea (KURMAN, 2002; D'SOUZA *et al.*, 2007; SCULLY *et al.*, 2007; AVI, *et al.*, 2012; WHITE & HOWLEY, 2013).

Embora cerca de 80% das mulheres possam ser infectadas pelo HPV durante sua vida sexual, somente uma pequena parcela irá desenvolver o câncer (PEREZ, 2001). A infecção pelo vírus é um fenômeno transitório ou intermitente, sendo que em apenas uma pequena proporção de mulheres se detecta o mesmo subtipo de HPV em exames sequenciais

(HILDESHEIM *et al.*, 1994; FRANCO *et al.*, 1999). Considera-se que o risco de uma mulher infectada desenvolver Neoplasia Intraepitelial, seja proporcional ao número de pesquisas sequenciais positivas para o HPV em material cervical, o que indica que o processo de carcinogênese deva estar relacionado à infecção persistente. A persistência da infecção pode ser definida como a detecção de um mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes em certo período, não havendo consenso do intervalo de tempo a ser considerado negativo. (Figura 7) (HO *et al.*, 1995; SCHIFFMAN & KJAER, 2003; FIELDS, *et al.*, 2007). O longo período de latência existente entre a infecção primária e o desenvolvimento do câncer, sugere que fatores adicionais devam estar envolvidos no processo de desenvolvimento neoplásico.

A infecção genital por HPV pode se apresentar nas formas clínica, subclínica ou latente. A forma clínica é facilmente detectada e tem como principal característica a presença de condilomas (GROSS & PFISTER, 2004). Na forma subclínica, não existe lesão visível macroscopicamente, podendo ser identificada por métodos diagnósticos complementares, como a colposcopia, análise citológica e biópsia, empregados frequentemente em mulheres e raramente em homens (GROSS & PFISTER, 2004). Na forma latente, o HPV somente pode ser identificado por técnicas de biologia molecular (WEAVER *et al.*, 2004).

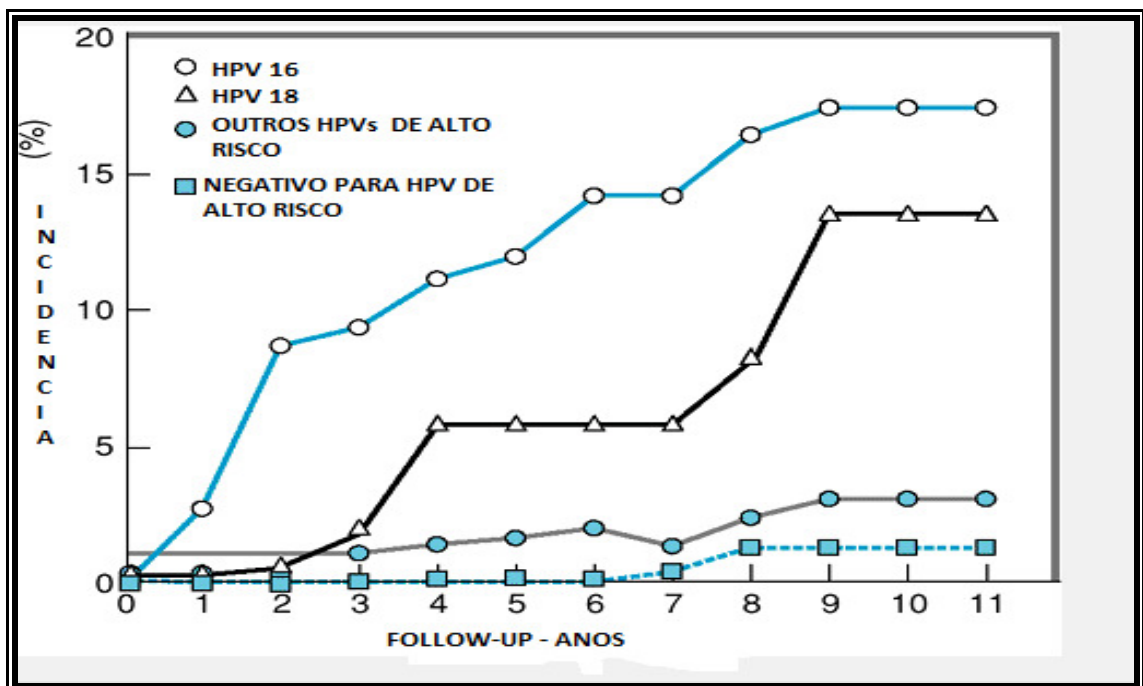


FIGURA 7: Incidência cumulativa da progressão de lesões provocadas por HPV para Displasia acentuada ou Câncer de Colo uterino. O gráfico mostra que a detecção sequencial positiva dos tipos de HPV de alto risco em mulheres acompanhadas por um período de 11 anos está associada ao aumento de incidência de câncer cervical. **Fonte: Fields, 2007**

1.6- MÉTODOS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO DAS LEIS E DA INFECÇÃO PELO HPV

1.6.1-DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

O diagnóstico histológico das lesões cervicais considerado como padrão ouro, é baseado na análise de um pequeno fragmento retirado do colo uterino através de biópsia incisional dirigida ou CAF (Cirurgia de Alta Frequência), fixado e incluído em parafina. Cortes de pequena espessura (em média de 4 μ m), corados pela hematoxilina-eosina (HE) são então examinados ao microscópio ótico, sendo avaliado o grau de comprometimento no processo de diferenciação do epitélio, além da presença de alterações celulares como cromatina grosseira, borda nuclear irregular, núcleos aumentados, entre outras-(Figuras 8 e 9), (GOMPEL & KOSS, 1997; HALBE, 1998; JENKINS, 2007).

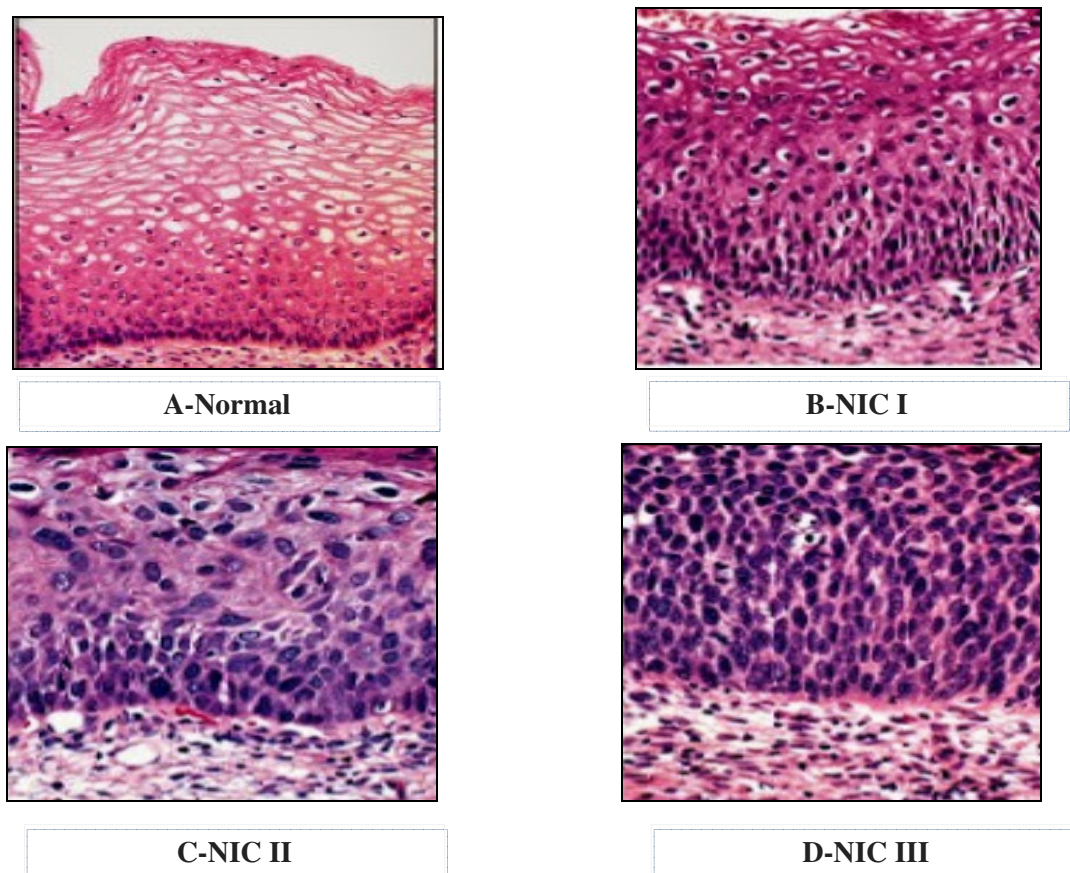
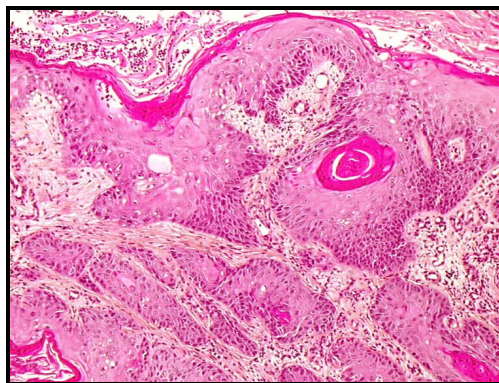


FIGURA 8: Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas A. epitélio escamoso normal com uma única camada de células basais, camadas intermediária e superficial ricas

em glicogênio e apresentando núcleos picnóticos. **B.** NIC I: epitélio com desorganização no terço basal e coilócitos nas camadas superiores. **C.** NIC II: epitélio com desorganização nos dois terços basais, com critério celular de malignidade e infecção viral. **D.** NIC III: epitélio com desorganização em toda a extensão, onde as células apresentam alto grau de anormalidade nuclear e celular, com a presença de mitoses típicas e atípicas. NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical. A-D: Coloração de HE; aumento de 400X. **Fonte: Laboratório Análys Patologia**



Carcinoma Escamoso Invasor

FIGURA 9: Secção de Carcinoma Escamoso Invasor do Colo uterino. A figura representa um carcinoma de células escamosas invasor bem diferenciado. Coloração de HE aumento de 100X. **Fonte: <http://screening.iarc.fr>.**

1.6.2- DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

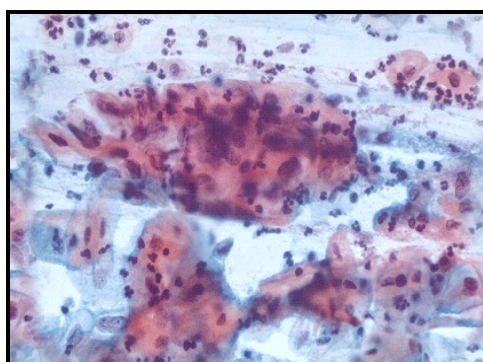
O método de diagnóstico citológico é baseado na análise de amostras obtidas de raspados cervicais da ectocérvice e/ou endocérvice, realizados no consultório ginecológico durante o exame de rotina. A coloração de Papanicolaou, universalmente empregada na citologia oncológica, é policrômica o que permite a diferenciação das células em eosinofílicas e cianofílicas, devido ao processo de Óxido-redução que ocorre na superfície da célula (GOMPEL & KOSS, 1997).

O estudo citológico do esfregaço cervical permite a identificação de um conjunto de alterações, classificadas de acordo com a presença e o grau das atipias celulares. Os principais critérios utilizados para o diagnóstico citológico consistem: (i) na alteração da relação núcleo citoplasma, onde quanto maior essa relação maior o grau da lesão e, (ii) no aspecto da cromatina, cujo padrão é indicativo da lesão e que se torna mais grosseira e hiper cromática com o aumento progressivo do grau da lesão (Figura 10), (SOLOMON & NAYAR, 2005).

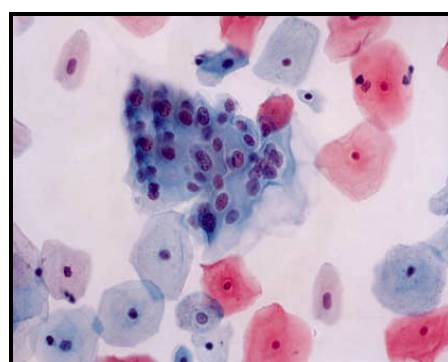
Como mencionado anteriormente, pelo sistema Bethesda (SOLOMON & NAYAR, 2005), essas lesões se dividem em alterações com critérios citológicos definidos

(inflamatórias, Lesão Intraepitelial de Baixo Grau, Lesão Intraepitelial de Alto Grau, Carcinoma Invasor) e alterações indeterminadas, que são aquelas que não apresentam critérios morfológicos suficientes para serem classificadas definitivamente como reativas ou como neoplásicas, denominadas Atipias Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS/ ASC-US).

Considerando a frequência destas alterações dentre os diagnósticos colpocitológicos, justifica-se aprofundar o estudo das lesões tipo ASCUS/ASC-US por se tratar de um problema relevante na detecção das lesões neoplásicas e pré-neoplásicas, como abordado adiante.



A - Citologia Convencional



B - Citologia em Meio Líquido

FIGURA 10: Raspado de células escamosas do Colo uterino- Comparação dos esfregaços obtidos por Citologia convencional e por Citologia em meio líquido. **A:** Citologia convencional, mostrando esfregaço com debris celulares e sobreposição celular; **B:** Citologia em meio líquido, mostrando esfregaço homogêneo de fundo limpo; aumento 200X.

Fonte: <http://screening.iarc.fr>

O método de exame citológico mais antigo, descrito por *George Papanicolaou* em 1940, corresponde à Citologia convencional (CC). A técnica de escolha para coleta de material na citologia cérvico-vaginal é baseada no uso combinado da espátula de Ayre e da escova endocervical ou *Cytobrush* (BOON *et al.* 1988). Após a raspagem das regiões endocervical, JEC e ectocervical o material coletado deve ser transferido para uma lâmina de vidro de maneira delicada e uniforme, evitando-se a formação de artefatos, e imediatamente fixado em álcool 96% ou outros fixadores como, por exemplo, o Colpofix. Posteriormente as lâminas são encaminhadas ao laboratório, coradas pela coloração de Papanicolaou e examinadas ao microscópio óptico (GOMPEL & KOSS, 1997).

A técnica de Citologia em Meio Líquido (CML) surgiu como resultado de mais de uma década de pesquisas, na busca por um único método que permitisse o preparo automatizado de esfregaços citológicos de excelente qualidade em termos de fixação e preservação celular, com menor número possível de artefatos e sobreposições celulares e também que fosse adequado para estudo biomolecular, além de permitir uma análise automatizada (MCGOOGAN, 1998; VELASCO, 2001).

Existem algumas metodologias comercialmente disponíveis para o preparo de esfregaços por CML, como a *Thin Prep*® (Cytoc Corporation, USA), e a *Autocyte*® (Tripath, USA). Essas duas metodologias, as quais diferem quanto ao tipo de reagente preservativo e protocolos de preparação utilizados, foram respectivamente aprovadas pelo órgão FDA- USA em 1996 e 1998 como alternativas ao exame de Papanicolaou (FERENCZY & FRANCO, 2001; GRUPTA *et al.*, 2001).

Uma série de vantagens do método de CML é descrita em relação à citologia convencional, como (i) a redução do número de esfregaços insatisfatórios; (ii) a obtenção de esfregaços mais limpos, já que a técnica elimina boa parte do infiltrado inflamatório, sangue e muco presentes; (iii) a elaboração de esfregaço com uma área menor, mas com melhor preservação da morfologia celular, o que gera uma diminuição do tempo de análise e (iv) a possibilidade de confecção de vários esfregaços, sem a necessidade da paciente retornar ao consultório para nova coleta. Além disso, por meio dessa técnica é possível o aproveitamento máximo das amostras para a realização de exames adicionais, como testes de Biologia Molecular para detecção do HPV e testes de Imunocitoquímica para se verificar a expressão de proteínas específicas, entre outros (HANSEN *et al.*, 2010; JURIE, 2010; SMITH, 2011).

Diversos trabalhos têm comparado a eficácia da CML com a CC. Alguns autores demonstram que têm-se obtido menores índices de resultados falso-negativos pelo uso desta metodologia em relação à convencional (FALHEY *et al.*, 1995; RENSHAW *et al.*, 2006; JURIE *et al.*, 2010). Durante a coleta do material cervical, obtém-se entre 600.000 a 1,2 milhões de células epiteliais, mas apenas 20% das células coletadas serão transferidas para a superfície da lâmina de microscopia pelo método convencional, ficando o restante, aderido à espátula/escova e posteriormente descartado. Pela técnica de CML toda a celularidade do material colhido das pacientes fica armazenada de forma homogênea e randômica, possibilitando o preparo de várias lâminas (HUTCHINSON *et al.*, 1994; CIBAS & DUCATMAN, 1996 ; RENSHAW *et al.*, 2006. HODA *et al.*, 2012).

Além disso, a detecção de ASCUS, de lesão de baixo grau ou de lesão mais avançada é maior na CML, resultando em maior precisão no diagnóstico das lesões epiteliais precursoras e neoplásicas do colo uterino (TEZUKA *et al.*, 1996; LINDER & ZAHNISER, 1997; BOLICK & HELLMAN, 1998). WEINTRAUB & MORABIA (2000) encontraram uma chance 2,2 vezes maior de diagnóstico de lesões pela CML, quando comparada com a CC. Por outro lado, a eficácia no diagnóstico de alterações inflamatórias é reduzida na CML, uma vez que a área de leitura na lâmina é menor, com menor número de leucócitos, hemácias e de microorganismos patogênicos (TEZUKA *et al.*, 1996). Por meio da comparação de 10.694 amostras de células em suspensão com 39.408 esfregaços convencionais, BOLICK & HELLMAN (1998) demonstraram que a utilização do método de CML, aumentou em mais de duas vezes o número de casos corretamente diagnosticados como NIC, e que a relação de diagnósticos ASCUS/NIC foi reduzida em 55 %.

Em um estudo de metanálise realizado por ABULAFIA e colaboradores (2003), foram avaliados dez trabalhos desenvolvidos entre 1995 e 2001 que compararam a CC com a CML em termos de sensibilidade e especificidade, considerando o resultado da biópsia como padrão-ouro. Foi observada uma grande variação de sensibilidade (de 50 a 90%) entre os estudos para ambos os métodos, com uma sensibilidade total maior alcançada pela CML (76%) em comparação com a técnica de CC (68%). A CML também foi mais específica (86%) do que a CC (79%).

1.6.3- AS LESÕES DO TIPO ASC-US (CÉLULAS ESCAMOSAS COM ATIPIAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO)

Os critérios para o diagnóstico citológico de ASC-US foram propostos por KURMAN & SOLOMON (1994) sendo: (i) núcleo celular 2,5 a 3 vezes maior do que o núcleo de uma célula normal da camada intermediária do epitélio escamoso estratificado, na presença de citoplasma maduro; (ii) aumento discreto da relação núcleo-citoplasma; (iii) cromatina com padrão de distribuição regular, sem granuloses e ausência de hipercromasia significativa; (iv) envelope nuclear regular e fino, podendo também ser observadas alterações na forma e no tamanho do núcleo, além de binucleação (Figura 11).

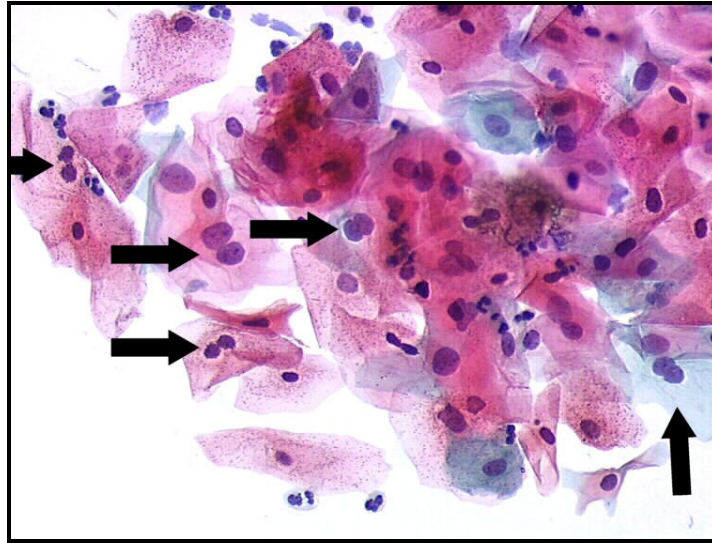


FIGURA 11: Células escamosas cervicais com diagnóstico de ASC-US. Observa-se presença de aumento discreto na relação núcleo-citoplasma, cromatina com distribuição regular e não se observa hipercromasia. Células binucleadas frequentes (setas), critérios insuficientes para um diagnóstico de LSIL; Aumento de 200x. **Fonte:** <http://screening.iarc.fr>

Na revisão da classificação de Bethesda em 2001, foi recomendada pelo fórum de ASCUS, a qualificação das “Células escamosas atípicas” em ASC-US ou ASC- H, quando favorecesse lesão de alto grau.

Existe consenso que esforços são necessários para se restringir a proporção de casos de ASCUS/ASC-US dentre os diagnósticos colpocitológicos. Em 1992, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos concluiu que o diagnóstico de ASCUS é esperado em cerca de 5% dos exames de citologia cervical, e que uma frequência superior deste diagnóstico poderia resultar de classificação citológica inadequada (KURMAN *et al.*, 1994). DAVEY e colaboradores (2000) encontraram uma razão de diagnósticos citológicos de ASCUS / LIE menor que 4 em 90% dos Laboratórios associados ao Colégio Americano de Patologia, e definiram que a razão aproximada de diagnósticos de ASCUS / LIE em um Laboratório de citopatologia não deve ser superior a 2-3 vezes.

É importante ressaltar que um dos principais aspectos envolvendo o diagnóstico de lesões do tipo ASC-US, é a possibilidade de progressão dessas lesões para aquelas de maior severidade. Assim, desde a descrição inicial da categoria ASCUS, muitos pesquisadores têm tentado avaliar o risco de detecção subsequente de Neoplasia Intraepitelial Cervical neste grupo, por meio da correspondência entre os achados citológicos e os resultados histopatológicos (Quadro 2).

QUADRO 2- Correspondência entre o resultado histopatológico e as amostras categorizadas como ASCUS pela Citologia.

Referências	Correspondência histológica das citologias com ASCUS N	Mulheres biopsiadas			
		Total	%	LBG (%)	LAG (%)
Takezawa <i>et al.</i> , 1997	753	753	100	39,2	15,0
Alanen <i>et al.</i> , 1998	231	16	7	6,5	3,9
Genest <i>et al.</i> , 1998	452	452	100	11,0	13,0
Willians <i>et al.</i> , 1998	668	273	41	50,0	8,0
Lachman <i>et al.</i> , 1998	560	560	100	19,5	16,8
Lonky <i>et al.</i> , 1999	782	782	100	15,3	8,4
Vlahos, 2000	316	233	73	44,8	18,5

N= Número de mulheres com ASCUS; LBG=lesão de baixo grau (infecção pelo HPV ou NIC I); LAG= lesão de alto grau (NIC II ou NIC III). **Fonte: Adaptado de Vlahos *et al.*, 2000**

Um estudo de meta-análise sobre a história natural das Lesões intraepiteliais foi desenvolvido por MELNIKOW e colaboradores (1998), no qual foram analisados 15 estudos, totalizando 27.929 mulheres com diagnóstico de Citologia cervical de atipias escamosas ou atipias celulares mais severas, e que haviam sido acompanhadas por no mínimo 6 meses antes do início do tratamento, por meio de exames citológicos sequenciais ou exame histopatológico. Foram estimados para os períodos de 6 e 24 meses os percentuais de regressão espontânea, de progressão para Displasia de alto grau e de progressão para Carcinoma invasor nas mulheres cuja citologia inicial apresentava ASCUS, LBG, e HSIL. Observou-se baixo risco de progressão das lesões nos casos de ASC-US e LBG, após um período de 24 (Quadro 3).

QUADRO 3: Análise da evolução das alterações citológicas em pacientes diagnosticadas como ASCUS, LSIL e HSIL.

Citologia inicial	Identificação de HSIL (%)		Progressão para carcinoma invasor (%)		Regressão para normal (%)
	6 meses	24 meses	6 meses	24 meses	
ASCUS	1,9	7,2	0,06	0,25	68,2
LSIL	6,6	20,8	0,04	0,15	47,4
HSIL	6,8	23,4	0,15	1,44	35,0

ASCUS= Atípias escamosas de significado indeterminado

LSIL= Lesão intraepitelial de baixo grau

HSIL= Lesão intraepitelial de alto grau.

Fonte: Melnikow *et al.*, 1998

A pesquisa da presença da infecção pelo HPV, além da identificação e quantificação do subtipo viral através de técnicas de biologia molecular, vem sendo consideradas como condutas alternativas ao exame citológico para o acompanhamento das pacientes diagnosticadas como ASCUS/ASC-US. Esta abordagem possibilitaria a detecção das mulheres portadoras de subtipos de alto risco oncogênico, cujo percentual varia entre 30 e 50%, e que constitui o grupo que deveria ser avaliado por colposcopia imediata, já que apresentaria maior risco de desenvolver Carcinoma invasor (MANOS *et al.*, 1999; SHLAY *et al.*, 2000; SOLOMON & NAYAR, 2005).

1.6.4- DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV

O diagnóstico citológico da infecção por HPV é feito quando no esfregaço cérvico-vaginal, são encontrados efeitos citopáticos produzidos por esse vírus. Dentre estes efeitos destaca-se a coilocitose, a qual caracteriza-se pela presença de cavidade citoplasmática perinuclear clara com borda citoplasmática periférica densa, associada a alterações nucleares (Figura 12). As alterações nucleares são representadas por aumento do volume nuclear, presença de irregularidades da membrana nuclear, e de cromatina grosseira e mal distribuída. Outra alteração consiste na disqueratose, caracterizada por células que apresentam ceratinização nem sempre acompanhada de características nucleares de malignidade (KURMAN & SOLOMON, 1994).

A associação de coilócitos e disqueratose tem sido considerada como critério citológico patognomônico para o diagnóstico da infecção pelo HPV. Entretanto, mesmo com o uso desses sinais, a frequência do diagnóstico é de apenas 1 a 2% em pacientes assintomáticas (SCHNEIDER *et al.*,1987). Dessa forma, devido ao grande número de resultados falso negativos (FN), a utilização de sinais não-clássicos tem sido proposta para ampliar o número de casos de infecção pelo HPV diagnosticados pela citologia (SCHNEIDER *et al.*, 1987). Um estudo realizado por JORDÃO e colaboradores (2003), avaliou os critérios morfológicos para a identificação do HPV. A frequência do diagnóstico citológico de HPV encontrada por esses autores, após a inclusão dos critérios não-clássicos, aumentou de 23,1% para 52,3%.

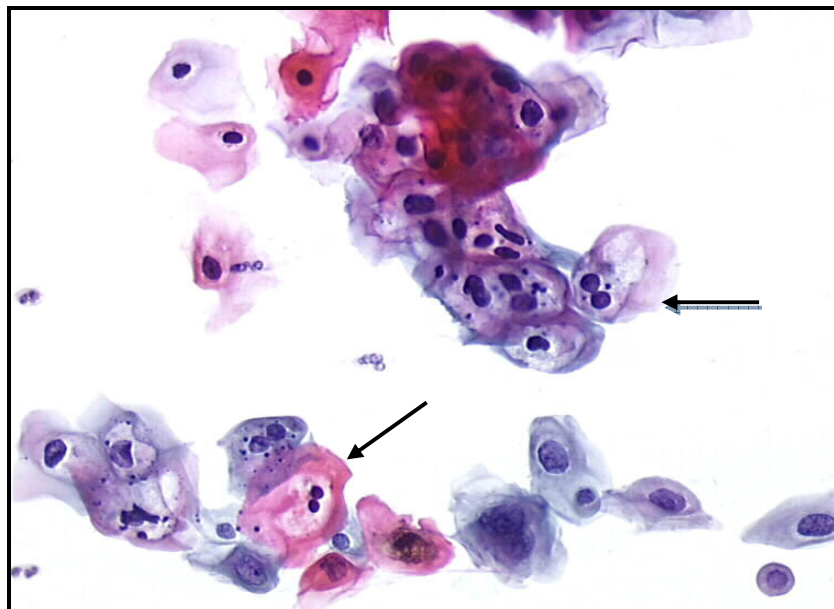


FIGURA 12: Células coilocíticas em exame citológico (CML): Observa-se a presença de grande halo perinuclear, por vezes de binucleação e de borda citoplasmática espessa, dando aspecto “globoso” à célula.

Embora os métodos de diagnóstico citológico apresentem grande especificidade na detecção da infecção pelo HPV, sua sensibilidade é baixa (valor estimado de 51%), sendo preconizada a utilização complementar de testes de Biologia molecular, especialmente nos casos de ASC-US (RUNOWICZ, 2007). Estima-se que cerca de 10% das mulheres com diagnóstico negativo da infecção por HPV na citologia, apresentam infecção pelos tipos 16/18 por meio de análise por PCR (ARORA *et al.*, 2005).

Diferentes técnicas podem ser usadas para a detecção da presença do DNA ou RNA do HPV nas amostras citológicas. Entre os métodos de detecção do DNA/HPV podem ser citado a Hibridização *in situ*, os testes de hibridização com sondas (Captura Híbrida, *Southern Blot* e *Dot Blot*) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O teste de Captura Híbrida tem sido considerado o exame mais prático e comercial para a detecção do HPV, com alta sensibilidade e especificidade (PASSOS *et al.*, 2008). O uso deste teste é indicado atualmente na prática clínica, a fim de monitorar as pacientes diagnosticadas com ASC-US, e detectar a presença ou ausência dos tipos de HPV de alto risco, para se determinar a necessidade de colposcopia ou outros procedimentos de acompanhamento (BARCELOS, *et al.*, 2011).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) descoberta na metade dos anos 80, como metodologia no diagnóstico molecular do Papilomavírus Humano (HPV), tem se mostrado como a mais sensível na identificação do DNA viral em diferentes tipos de amostras, podendo ser utilizada na análise de amostras de pacientes com lesões neoplásicas ou pré-malignas, assim como de pacientes assintomáticas ou com infecção subclínica. É inclusive indicada para a confirmação de resultados conflitantes entre a colposcopia e a citologia (MANOS *et al.*, 1989; BAUER *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 1996; IWASAWA *et al.*, 1997; GRAVITT *et al.*, 1998; CHOW *et al.*, 2000; NELSON *et al.*, 2000; RÓLON *et al.*, 2000).

1.6.5- DETECÇÃO DE BIOMARCADORES ESPECÍFICOS

Como destacado anteriormente, o emprego do exame citológico (Papanicolaou) tem conseguido reduzir substancialmente a incidência de câncer do colo cervical, em países onde existem programas de triagem bem estabelecidos (BALDWIN *et al.*, 2003). Porém, devido à subjetividade das análises morfológicas, as taxas de resultados falso- negativo e falso-positivo têm variado bastante, ficando entre 20-30% e 5-70%, respectivamente (FAHEY *et al.*, 1995). Os resultados falso – negativos são principalmente gerados por erros de amostragem e pela incorreta interpretação de células cervicais anormais, o que pode resultar na ausência de identificação de mulheres portadoras de lesões precursoras ou invasivas, e em erros de diagnóstico (CUZICK *et al.*, 1998; SPITZER, 1998). Além disso, os testes citológicos não permitem verificar do risco de progressão das lesões cervicais associadas ao

HPV (PINTO *et al.*, 2012; TERMINI & VILLA, 2008). Dessa forma, é de extrema importância o desenvolvimento e a introdução nesses testes, de biomarcadores específicos que aumentem a especificidade e a sensibilidade de detecção das lesões cervicais com maior risco de progressão, e que possam representar um complemento para o exame citológico e o teste DNA/HPV.

A detecção de alterações celulares originadas pela expressão desregulada das oncoproteínas virais pode vir a caracterizar importantes Biomarcadores de progressão tumoral e contribuir desta forma, para a identificação de populações celulares com maior risco de progredir para o câncer do colo uterino. As principais linhas de investigação associadas aos aspectos anteriormente mencionados focam, sobretudo, a identificação de proteínas celulares/teciduais ou circulantes, cuja expressão se encontre alterada em resposta à expressão das oncoproteínas virais (DOEBERITZ & SYRJANEN, 2006; TERMINI & VILLA, 2008; PINTO *et al.*, 2012).

As técnicas de imunocitoquímica e/ou imunohistoquímica são baseadas na detecção da expressão de proteínas, por meio da ligação altamente específica de anticorpos em células ou tecidos, e posteriormente examinados ao microscópio (BURRY, 2010).

A detecção imunocitoquímica das alterações moleculares causadas pelo HPV nas células hospedeiras poderia ser potencialmente usada como um teste adjunto ao exame citológico (PINTO *et al.*, 2012), especialmente em amostras colhidas por CML, que permite que esses biomarcadores sejam facilmente testados utilizando-se a mesma amostra coletada para a realização do exame preventivo de rotina.

A detecção imunocitoquímica de biomarcadores no rastreamento do câncer de colo pode aumentar a precisão na detecção de LAG. Além disso, também pode funcionar como ferramenta para identificar os casos diagnosticados como ASC-US ou LSIL com maior probabilidade de progredir para LAG ou carcinomas (PINTO *et al.*, 2012). A grande maioria dos estudos que avaliaram a expressão de proteínas como biomarcadores do exame citopatológico, foram baseados na proteína p16^{INK4a}, proteína relacionada ao controle do ciclo celular e no antígeno Ki67 associado à proliferação celular (SAHEBALI *et al.*, 2003; TSOUMPOU *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2012).

1.6.5.1- A PROTEÍNA p16^{INK4a}

Como mencionado, o potencial oncogênico do HPV está relacionado aos produtos dos genes E6 e E7, que interagem com uma variedade de proteínas reguladoras do ciclo celular, geralmente codificadas por genes supressores de tumor. A proteína E7 inibe a atividade da pRb, que tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, exercendo sua função por formar complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. O E2F quando livre, desencadeia o processo de replicação do DNA (STOREY *et al.*, 1998).

A p16^{INK4a} é uma proteína supressora de tumor que age inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDKs) através do bloqueio de CDK4 e CDK6, e que regula a transição das fases G1 para S do ciclo celular. A p16^{INK4a}, inibe a fosforilação da pRb, mantendo-a ativa e ligada a E2F e tem sua expressão controlada por feedback negativo exercido pela pRb. A inativação da pRb pela proteína E7 do HPV resulta em um aumento da expressão de p16^{INK4a} nas células infectadas. A proteína E7 do HPV também é capaz de se ligar à p21 e p27, ambas CDKI, ou inibidoras de CDKs, o que impede o controle do ciclo celular em diversos pontos de checagem (AGOFF *et al.*, 2003).

Segundo YOSHIDA e colaboradores, (2004) a detecção de p16^{INK4a} em espécimes citológicos, como um marcador de Displasia cervical e ao Carcinoma, está diretamente associado à gravidade dos diagnósticos citológicos, com uma baixa proporção de casos positivos em citologia normal (0% a 18%) e uma elevada proporção de testes positivos para p16^{INK4a} nos resultados de HSIL (81% a 100%) e de CCE (97% a 100%).

Num estudo de meta-análise, THOMPSON e colaboradores (2008) mostraram que com relação às LSIL e ASC-US, os resultados de positividade para p16^{INK4a} foram bastante heterogêneos variando de 10% a 100% nos casos de ASC-US e de 10% a 86% nos casos de LSIL. Nesse mesmo estudo, foi demonstrada uma proporção média de esfregaços p16^{INK4a} positivos em casos diagnosticados como Normais (12%), ASC-US (45%), LSIL (45%) e HSIL (85%).

Em estudo no qual a expressão de p16^{INK4a} foi analisada por Imunocitoquímica em esfregaços de CML (*Thin Prep*), DUCAN e colaboradores (2007) concluíram que a expressão de p16^{INK4a} isoladamente, em casos de pacientes com diagnóstico de ASC-US, não apresenta sensibilidade e especificidade suficientes para ser usada como biomarcador eficaz nas pacientes com maior probabilidade de desenvolver LAG. Os autores mostraram ainda, que a associação da expressão de p16^{INK4a} com o teste para HPV (Captura Híbrida), poderia

umentar significativamente a sensibilidade e a especificidade do sistema para a identificação de pacientes mais propensas a apresentar progressão das lesões cervicais.

Em outro estudo realizado por YUAN-YING e colaboradores (2011), no qual a expressão da proteína também foi avaliada por Imunocitoquímica em amostras de CML, observou-se que em comparação aos resultados positivos do teste de HPV, a positividade para p16^{INK4a} foi significativamente menor, tanto em ASC-US (61,6% vs 32,6%) quanto em LSIL (77,8% vs 42,2%), confirmando as baixas taxas de positividade para p16^{INK4a} nessas duas categorias de diagnóstico.

Em estudo recente de revisão, relatou-se que a falta de uniformidade para a avaliação dos casos positivos seria uma limitação importante para o uso da expressão da proteína p16^{INK4a} como biomarcador de progressão, tanto por meio da Imunocitoquímica como da Imunohistoquímica (LOUIS-JACQUES, 2012). Vários autores observaram que a expressão de p16^{INK4a} pode estar fortemente correlacionada com a infecção pelo HPV (LORENZATO, 2002; AGOFF *et al.*, 2003; MURPHY, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2004; UNGUREANU *et al.*, 2010).

1.6.5.2- O ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO Ki67

Também conhecido como MIB-1, esse antígeno indica células em proliferação, sendo expresso durante todas as fases do ciclo celular (G₁, S, G₂ e M). A imunomarcagem ocorre no núcleo das células e apresenta um padrão de localização nuclear complexo e específico, que sofre mudanças durante as fases do ciclo celular (ENDL & GERDES, 2000).

Ao contrário da vasta informação disponível sobre a estrutura, o padrão de localização e a regulação de Ki-67, pouco se sabe sobre a exata função desta proteína. Diversos pesquisadores têm especulado sobre suas possíveis funções. A proteína parece ser essencial para a proliferação celular, pois estudos de inativação de Ki-67 por meio de experimentos de *knock-down* resultaram na supressão da proliferação celular (SCHLÜTER *et al.*, 1993; SCHOLZEN & GERDES, 2000; BROWN & GATTER, 2002). Em relação à patogênese do câncer cervical, a expressão de Ki-67 em esfregaços cervicais ou em tecidos obtidos por biópsias, tem sido sugerida como um marcador alternativo e específico de progressão. A imunopositividade para Ki-67 parece refletir a relação entre a ação proliferativa, o grau da NIC e a expressão de proteínas do HPV (ANDERSON *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006; LOBATO, 2012). Entretanto a especificidade de Ki-67 em avaliar a proliferação celular é

considerada baixa, já que a proteína é também super-expressa em processos inflamatórios (AGOFF *et al.*, 2003).

1.6.5.3- A PROTEÍNA L1 DO HPV

Como descrito anteriormente, o genoma do HPV é dividido em 8 janelas abertas de leitura ou ORFs e uma região controle *LCR*, cujos genes são denominados *E* ou *L*, de acordo com a sua expressão, mais precoce (*E*) ou mais tardia (*L*) nos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro (TYRING, 1997; DOORBAR, 2006; SCHIFFMAM *et al.*, 2007).

O capsídeo dos Papilomavírus é constituído por duas proteínas estruturais. A primeira, denominada L1, é a proteína principal do capsídeo viral, que tem um peso molecular de aproximadamente 55 Kda e representa cerca de 80% do total das proteínas do vírus. A proteína secundária L2, tem um peso molecular de aproximadamente 50 Kda e sua presença contribui para a eficiente encapsulação do genoma viral e para a intensificação da infectividade viral, além de apresentar função adicional de interação com várias proteínas do hospedeiro durante o ciclo de vida do vírus (RODEN *et al.*, 2001). O capsídeo é formado por 72 homopêntameros da proteína L1 e 12 cópias da proteína L2 presentes no centro de cada pentâmero, mantendo uma proporção de 30:1 de cada proteína (KIRNBAUER *et al.*, 1993).

Alguns autores especulam, que a expressão do antígeno L1 é dependente da expressão de fatores de transcrição expressos somente durante o processo de maturação das células da camada basal, para a camada superficial do epitélio estratificado (MCMURRAY *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2010). Após a internalização das partículas virais iniciada por L1 e L2, ocorre o desnudamento do capsídeo viral e exposição do genoma, e posteriormente a transferência do DNA viral para o núcleo da célula hospedeira, onde tem início a replicação viral (FLORIN *et al.*, 2002; HOVARTH *et al.*; 2010; DOORBAR, 2012). A encapsidação do genoma envolve o recrutamento de L2 para regiões de replicação através da proteína E2, evento que ocorre antes da expressão de L1 e da montagem do capsídeo icosaédrico no núcleo da célula hospedeira (DAY *et al.*, 1998).

A proteína L1 também participa dos processos imunológicos relacionados aos Papilomavírus. Na maioria dos casos o sistema imune é capaz de estabelecer uma resposta efetiva contra a infecção pelo HPV, caracterizada por uma forte resposta celular local, na qual

as lesões regredem e os anticorpos são produzidos. A resposta celular é baseada na intensa formação de infiltrados de células T CD4⁺ e CD8⁺ e macrófagos, além da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF α e INF γ (STANLEY, 2012). Como mencionado, além da resposta celular, anticorpos neutralizantes também podem ser gerados. Estes são direcionados contra epitopos conformacionais da proteína L1, expostos no capsídeo viral. A produção desses anticorpos é lenta contra os tipos de HPVs de alto risco, podendo levar de seis meses a um ano, e ocorre logo após a infecção por tipos de HPVs de baixo risco (STANLEY, 2012).

As vacinas profiláticas empregadas atualmente contra a infecção pelo HPV são baseadas na utilização de proteínas do capsídeo viral como antígenos alvo, os quais induzem a produção de anticorpos neutralizantes e previnem a entrada do vírus nas células (KWAK *et al.*, 2005). As vacinas comercialmente disponíveis são obtidas a partir da proteína L1, que possui a capacidade de autoassociação quando produzidas em sistemas heterólogos de expressão, em partículas semelhantes ao vírus, as VLPs (*Virus-Like Particles*). De forma semelhante ao vírus, as VLPs induzem a produção de anticorpos neutralizantes (DAY *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, muitos estudos baseados na análise da expressão da proteína L1 do HPV como biomarcador da infecção vêm sendo realizados (MELSHEIMER *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2008; NEGRI *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2010; SARMADI, 2010; LI YU *et al.*, 2010; BYUN, *et al.*, 2013).

Um dos principais problemas relacionados à infecção pelo HPV é identificar quais as pacientes infectadas pelo vírus que apresentam maior risco de progressão das lesões. Sabe-se que a expressão imunocitoquímica da proteína L1 do capsídeo viral está bastante associada à fase produtiva da infecção, e é um sinal de que o ciclo produtivo do HPV foi completado (YOSHIDA *et al.*, 2008). Nos casos em que a marcação para a proteína L1 foi negativa, considera-se que houve a perda da capacidade de produção dos vírions, que depende da diferenciação das células epiteliais escamosas. Dessa forma, os estudos mostram uma maior positividade para a proteína L1 nos casos de lesões de baixo grau quando comparadas à expressão em lesões de alto grau e câncer (YOSHIDA, *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2010; SARMADI *et al.*, 2012; BYUN, *et al.*, 2013).

Dessa forma, a detecção da expressão da proteína L1 do capsídeo viral tem sido considerada um bom biomarcador de progressão das lesões cervicais. Como a proteína é expressa na fase produtiva da infecção pelo HPV, e vai progressivamente perdendo sua

expressão na fase de transformação, a presença de positividade das reações imunocitoquímicas indicam uma maior tendência de regressão das lesões, ao contrário das reações negativas (LI YU *et al.*, 2010). Justifica-se então, a análise da expressão dessa proteína em amostras cervicais apresentando LBG ou atípicas de significado indeterminado, do tipo ASC-US e LBG.

1.6.5.4- AS PROTEÍNAS MCMS (“MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEINS”) OU PROTEÍNAS DE MANUTENÇÃO DE MINICROMOSSOMOS

A replicação completa e precisa do DNA é essencial para a manutenção da integridade genética de todos os organismos. Em células eucarióticas, esse evento é iniciado em centenas, senão milhares de elementos cromossômicos denominados “*Origens de Replicação*” (ORI). Estudos sobre a montagem e ativação desses complexos têm fornecido importantes informações sobre a replicação do DNA eucariótico, e como ela é coordenada com outros eventos do ciclo celular (ROWLES, *et al.*, 1999; GILLESPIE & BLOW, 2001; YANAGI *et al.*, 2002; BLOW, 2005).

Proteínas de Manutenção de Minicromossomos (MCM) são um grupo complexo de proteínas, membros da Super Família (SF6) de helicases, essenciais para o licenciamento da replicação do DNA e o controle do ciclo celular (Figura 13), (LUO, 2011). As seis proteínas MCMs formam um anel em volta do DNA, que funciona como a principal *DNA-helicase* que desenrola a dupla fita de DNA quando a síntese começa, ao mesmo tempo em que as forquilhas de replicação se afastam da origem. Cada MCM é altamente relacionada às outras, mas apresenta sequência única que a distingue das demais subunidades (MCM 2 -7) (ALBERTS, 2010).

Os genes que codificam as proteínas do complexo MCM2-7, foram originalmente identificados em experimentos destinados à procura de proteínas envolvidas no controle da manutenção e em defeitos de segregação de Mini-cromossomos em leveduras, assim como na progressão do ciclo celular (DUTTA & BELL, 1997).

Sub-complexos contendo diferentes combinações de MCMs já foram purificados, principalmente hexâmeros formados por duas subunidades de cada uma das MCMs 4-6-7, indicando que essas subunidades atuam independentemente ou em conjunto com as subunidades 2, 3 e 5 na função de DNA helicase (revisão em BELL & DUTTA, 2005;

ISHIMI, 1997; REMUS *et al.*, 2009, LOBATO, 2012). De fato, estudos demonstram que o subcomplexo formado pelas subunidades 4, 6 e 7 apresenta a função de DNA helicase, enquanto que o conjunto das subunidades 2, 3 e 5, possivelmente exerça uma função de regulação do complexo MCM4-6-7 (REMUS *et al.*, 2009).

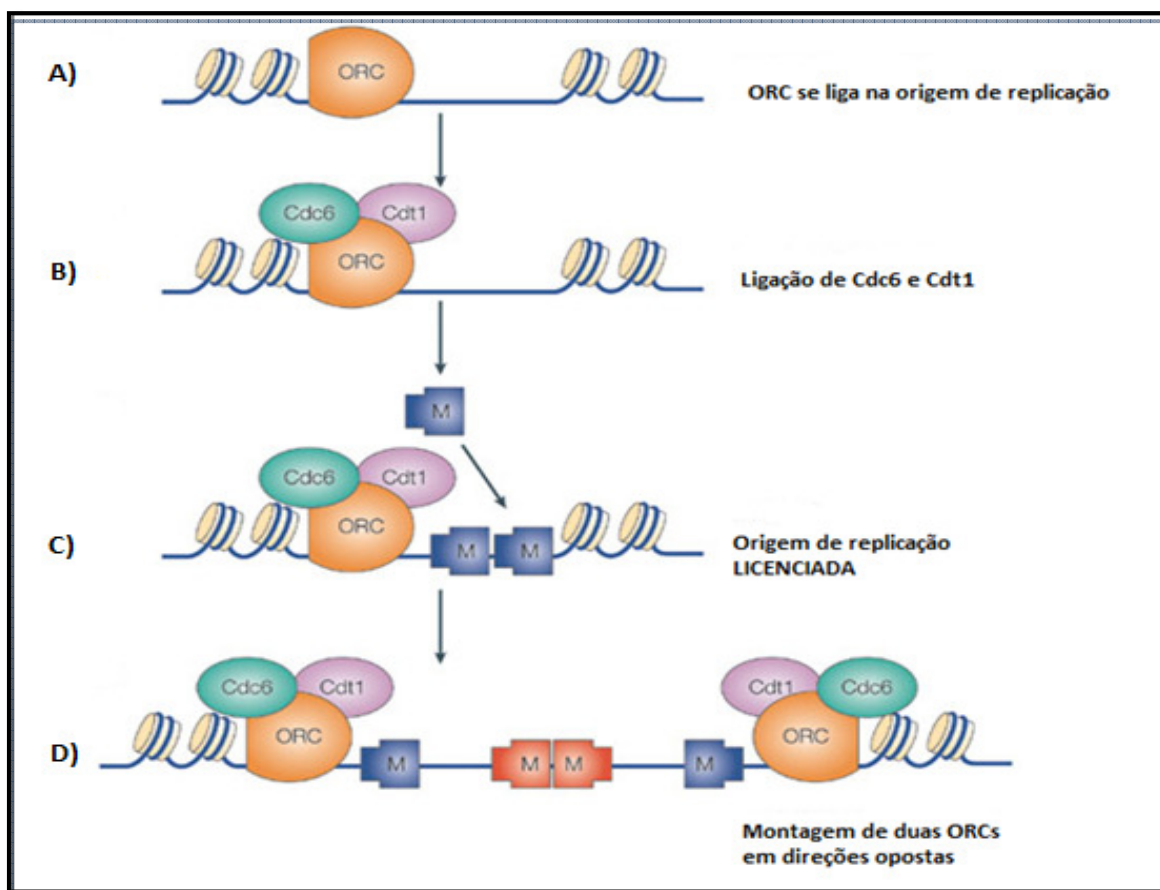


FIGURA 13: Montagem do complexo proteico pré-replicativo durante o licenciamento das ORIs. A) O Complexo de Reconhecimento de Origem (ORC) é o primeiro recrutado à origem de replicação. B) ORC recruta as proteínas Cdc6 e CDT1. C) O subcomplexo formado por ORC, Cdc6 e CDT1 age em conjunto para transportar o hexâmero de Proteínas de Manutenção dos Microssomos (MCM 2-7) para a origem, o que licencia o DNA ao início da replicação. D) Complexos de iniciação competentes são provavelmente, formados pela montagem de dois conjuntos MCM 2-7 em direções opostas. **Fonte: Blow & Dutta, 2005.**

Está bem estabelecido que a capacidade proliferativa das células neoplásicas constitui uma característica essencial do crescimento dos tumores, característica que muitas vezes torna o diagnóstico clínico e / ou prognóstico mais objetivo, informativo e relevante (GIAGINIS *et al.*, 2007). Assim, biomarcadores capazes de detectar células anormais, com sensibilidade e

especificidade clínica adequada, representariam um avanço diagnóstico significativo, proporcionando melhora na precisão, na reprodutibilidade e o potencial para automatização, levando a benefícios clínicos e econômicos.

É importante ressaltar que as MCMs não são proteínas especificamente expressas no câncer, sendo essenciais para a replicação de células normais, bem como neoplásicas. O seu valor como biomarcadores do câncer se origina das diferenças na sua distribuição micro-anatômica. Em epitélios estratificados normais, a expressão das proteínas MCMs está restrita à camada basal (proliferativa), não sendo expressa nas células em diferenciação (ALBERTS, 2010).

As proteínas MCM oferecem vantagens teóricas e práticas em relação a outros marcadores de proliferação de células, como por exemplo, Ki67 e PCNA (*Antígeno Nuclear de Proliferação Celular*) (DEPAMPHILIS, 2005). O Ki67 apresenta baixa especificidade em avaliar a proliferação celular, já que a proteína é também superexpressa em processos inflamatórios (AGOFF *et al.*, 2003). O PCNA está envolvido em eventos de reparo do DNA, proporcionando assim menor especificidade na detecção de câncer, além de mostrar flutuações marcantes em sua expressão entre as células, tornando a interpretação de sua marcação em amostras de citologia muito difícil (COLEMAN & LASKEY, 2009).

A presença de células coradas por MCM pode ser detectada utilizando-se uma variedade de estratégias, sendo a Imunocitoquímica um método bastante utilizado. As células anormais apresentam marcação nuclear de MCMs sendo facilmente identificáveis, mesmo em amostras com pequena celularidade, que poderiam passar despercebidas pela análise citológica convencional (BALDWIN & COLEMAN, 2003; COLEMAN & LASKEY, 2009).

Estudo realizado por MUKHERJEE e colaboradores (2007) na Índia, demonstrou que o uso da Imunocitoquímica para a detecção da expressão de proteínas MCM (MCM2 e MCM5) em esfregaços cervicais convencionais, aumentou a precisão diagnóstica e a concordância interobservador, demonstrando que o uso da biomarcação de MCMs em amostras de esfregaços convencionais pode ser uma ferramenta adicional de diagnóstico, em países ou regiões com recursos escassos.

As proteínas MCMs têm sido amplamente estudadas e correlacionadas a vários tipos de câncer. Vários trabalhos foram dedicados à avaliação de proteínas MCMs em tecidos obtidos de tumores humanos, com destaque à análise de MCM2 (WILLIAMS *et al.*, 1998; SHROYER *et al.*, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2007), MCM5 (WILLIAMS *et al.*, 1998;

MUKHERJEE *et al.*, 2007) e MCM7 (HIRAIWA *et al.*, 1997; FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003).

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 câncer de cólon (NISHIHARA *et al.*, 2008), próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; LAITINEN *et al.*, 2008), endometrial (LI *et al.*, 2005) e cervical (BRAKE *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por FREEMAN e colaboradores (1999) analisou a expressão de três proteínas MCM, 2, 5 e 7 e procurou verificar o *status* proliferativo de 204 amostras de tecido humano incluindo 48 amostras da cérvix uterina; 13 amostras de tecido normal, 08 de NIC I, 21 de NIC III e 06 de câncer. Uma maior expressão das MCMs 2 e 5 foi observada em lesões de alto grau em comparação às de baixo grau e tecido normal. Porém a análise de MCM7 na progressão de lesões cervicais não foi avaliada nesse trabalho.

Recentemente foi desenvolvido um estudo em nosso grupo dedicado à análise da expressão de MCM7 como Biomarcador de progressão das lesões cervicais, sendo verificado em amostras histológicas cervicais, que MCM7 é um Biomarcador mais eficiente para se verificar a progressão de lesões cervicais do que as proteínas P16 e Ki67 (LOBATO *et al.*, 2012). Porém até a presente data, nenhum estudo foi ainda realizado avaliando a expressão de MCM7 em amostras cervicais obtidas por Citologia em Meio Líquido. Da mesma forma, a expressão da proteína MCM7 em associação com a proteína L1 do HPV ainda não foi avaliada em amostras de CML que apresentam Atipias de Significado Indeterminado (ASC-US) e/ou Lesões Escamosas Intraepiteliais cervicais (LEIs).

Justifica-se então, a análise da expressão dessa proteína em amostras cervicais apresentando LBG ou Atipias de Significado Indeterminado, do tipo ASC-US, como possível marcador diagnóstico dessas lesões.

O Carcinoma de colo uterino é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, estando associado à infecções pelo HPV em 99 % dos casos. Considerando que é uma doença que apresenta uma evolução progressiva, a necessidade do diagnóstico precoce é de grande importância para a saúde pública. As lesões precursoras do colo uterino conhecidas como NIC antecedem o carcinoma, e a detecção precoce dessas lesões favorece as chances de sucesso nos métodos de intervenção, evitando a progressão e a evolução da doença.

Nos últimos anos, as taxas de diagnóstico por câncer de colo têm reduzido consideravelmente, graças aos programas de rastreamento das lesões precursoras e ao acompanhamento clínico de pacientes por meio do diagnóstico citológico. O exame de Papanicolaou é o mais usado para esses fins, mas por se tratar de uma técnica de análise morfológica, baseada em alterações presentes nas células epiteliais, pode acarretar resultados falsos -negativos ou falsos- positivos, além de laudos inconclusivos.

Vários marcadores celulares, detectados por Imunohistoquímica ou Imunocitoquímica, têm sido avaliados com respeito à sua sensibilidade, especificidade e capacidade de detecção de células displásicas. Esses incluem antígenos de proliferação celular, proteínas regulatórias do ciclo celular, proteínas envolvidas na duplicação do DNA celular e proteínas associadas às vias de sinalização.

Com relação à proteína L1, estudos têm demonstrado sua relação com as lesões de baixo grau, principalmente com aquelas associadas à infecção pelo HPV de baixo risco, onde observa-se maior produtividade de capsídeos virais.

A avaliação de proteínas MCMs como marcadores de proliferação em células e tecidos humanos também tem sido realizada em diversos estudos, sugerindo que as MCMs poderiam ser moléculas úteis como marcadores de proliferação, baseado no fato de que a expressão dessas proteínas é frequentemente demonstrada em células em proliferação, mas não em células em estado de quiescência, senescência ou diferenciação.

O presente estudo tem por finalidade analisar: (i) a expressão desses dois biomarcadores (MCM7 e L1 do HPV) em amostras cervicais obtidas por CML através da técnica de Imunocitoquímica, e (ii) a sua correlação com a severidade das lesões precursoras e com a infecção pelo HPV, procurando avaliar a possibilidade do uso desses biomarcadores na rotina laboratorial.

3.1 - OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão da proteína envolvida no controle da duplicação do DNA – MCM7 (*Minichromosome Maintenance Protein 7*) e da proteína L1 do HPV, como marcadores de AS-CUS (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) e Lesões Escamosas Intraepiteliais (LEIs) cervicais obtidas por Citologia em Meio Líquido.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Analisar, por meio da técnica de Imunocitoquímica, a expressão de MCM7 em amostras cervicais colhidas em Citologia em Meio Líquido (CML) de pacientes portadoras de AS-CUS, LEIs de baixo e alto grau, e de pacientes sem alterações cervicais;

2- Analisar, por meio da técnica de Imunocitoquímica, a expressão da proteína L1 do capsídeo do HPV nas amostras de CML acima descritas;

3-Verificar, por meio da reação de PCR, a presença do DNA do HPV em amostras de DNA extraídas das amostras cervicais de CML;

4-Avaliar a possível correlação existente entre a expressão das proteínas MCM7 e L1-HPV, o grau de lesão cervical e a presença da infecção viral, visando determinar se a expressão dessas moléculas pode ser utilizada como biomarcadores do diagnóstico citopatológico das alterações celulares investigadas.

4.1- POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste trabalho foram estudadas 213 amostras selecionadas entre outubro de 2011 e dezembro de 2012, e coletadas de pacientes que compareceram a consultórios médicos na cidade de Belo Horizonte, para realização de exame ginecológico preventivo de rotina, através da técnica de Citologia em Meio Líquido (CML). A idade das pacientes variou de 15 a 83 anos, sendo que 86,3% (184) delas apresentavam menos de 40 anos. Na Tabela de relação das amostras analisadas (Seção de Anexos- Anexo 2) é apresentada a relação completa das pacientes analisadas nesse estudo, além da idade e informes clínicos de cada paciente. O material coletado foi enviado ao Laboratório Analys Patologia, localizado à Rua Pouso Alegre Nº 110, Bairro Colégio Batista, em Belo Horizonte, Minas Gerais e processado para estudo citopatológico. Foram selecionados para esse estudo os casos que, após análise morfológica, apresentavam diagnóstico de ASC-US ou Lesão de baixo grau segundo critérios estabelecidos pela Nomenclatura de Bethesda. Amostras de Lesão de alto grau e aquelas que não apresentavam alterações cervicais (negativas), também foram incluídas no estudo. A presença de alterações celulares compatíveis ou sugestivas da infecção pelo HPV, também foi considerada na determinação do diagnóstico.

Destaca-se que após a realização do estudo morfológico, o material coletado, que seria normalmente descartado após 30 dias, foi gentilmente cedido pelo Dr. Nivaldo Hartung Toppa e Dra. Lúcia Porto Fonseca de Castro, Médicos patologistas e Diretores do Laboratório Analys Patologia, para a realização das análises por Imunocitoquímica e por Biologia molecular no desenvolvimento do presente Projeto de pesquisa.

As pacientes foram classificadas em grupos de acordo com o Quadro 4 .

A utilização destas amostras humanas para fins de pesquisa havia sido aprovada pelo COEP (Comitê em Ética e Pesquisa) da UFMG, em dois outros estudos anteriores. O Termo de Consentimento se encontra no Anexo 1 (Seção de Anexos).

QUADRO 4: Grupos de pacientes selecionados para o estudo

Diagnóstico Citopatológico	Quantidade
ASC-US	55
ASC-US / sugestivo da infecção pelo HPV	22
LSIL	16
LSIL / compatível com a infecção pelo HPV	71
LSIL/ sugestivo da infecção pelo HPV	32
HSIL	07
NEGATIVA (sem alterações morfológicas)	10
TOTAL	213

4.2- EXAME CLÍNICO

Como mencionado, as amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas de pacientes que se dirigiram aos consultórios ginecológicos para realização de exames preventivos de rotina. A partir do exame colposcópico do colo do útero, os achados clínicos foram anotados no pedido médico enviado ao Laboratório juntamente com a amostra. Para a realização da colposcopia dois métodos distintos são utilizados, descritos a seguir com os principais achados clínicos macroscópicos identificados por cada teste:

I) TESTE DE SCHILLER: Esse teste consiste na aplicação do Lugol (Solução de Iodo a 1%) no colo uterino. Devido à grande concentração de glicogênio, as células pavimentosas do epitélio uterino apresentam a capacidade de fixar o iodo, com desenvolvimento de uma coloração marrom escura do colo, de acordo com a concentração de glicogênio sintetizada pelas células. O teste é considerado negativo quando ocorre o aparecimento da coloração marrom. Quando após a aplicação do lugol há o aparecimento de áreas claras ou não coradas, devido à baixa impregnação do iodo pelas células escamosas imaturas o teste é considerado positivo e as áreas claras denominadas área Iodo-negativa (AIN).

II) TESTE BASEADO NO USO DO ÁCIDO ACÉTICO: Consiste na aplicação de ácido acético a 2% no colo uterino, após a qual o epitélio se torna esbranquiçado devido à alta densidade nuclear. Quanto maior a quantidade de núcleos mais esbranquiçada fica a área do epitélio, denominada de área Aceto-branca. Outra alteração macroscópica detectada pelo

método é o pontilhado, aspecto colposcópico focal no qual os capilares aparecem sob um padrão pontilhado. Quanto mais fino e regular é a aparência do pontilhado, maior é a probabilidade de que a lesão presente seja de baixo grau ou metaplasia. Porém, quanto mais grosseiro for o pontilhado maior é a probabilidade que ele represente uma lesão de alto grau.

O mosaico consiste em uma alteração colposcópica aparentemente focal, no qual a neoformação vascular tem um padrão retangular como um mosaico. Como observado na alteração macroscópica anterior, aspectos mais finos/regulares ou mais grosseiros da lesão estão relacionados à presença de lesão de baixo ou alto grau, respectivamente.

Os vasos atípicos consistem em lesão de aspecto colposcópico focal anormal, no qual o padrão vascular se apresenta com vasos irregulares com trajeto interrompido abruptamente e com aparência de vírgulas, grampos ou formas variadas.

4.3 - COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Após o estudo colposcópico, as células foram removidas do colo uterino das pacientes por Médicos ginecologistas, utilizando-se *Cytobrush* ou espátula, e depositadas num frasco contendo 10mL do líquido conservante do kit *Thin Prep®*, sendo em seguida o material enviado ao Laboratório de Anatomia Patológica. A coordenação do setor de Citologia Ginecológica do referido laboratório está sob a responsabilidade da Bioquímica Lara Verônica de Araujo Lopes. Para a realização do exame citopatológico, os esfregaços das amostras cervicais foram confeccionados de forma automatizada no processador eletrônico de lâminas T2000 (*Thin Prep®*). Após a determinação do diagnóstico citopatológico, foram selecionados os casos de interesse que apresentavam alterações morfológicas (Quadro 4). As amostras eram então mantidas a 4°C no Laboratório, para a realização posterior da análise da expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV e para a detecção do DNA viral (Figura 14).

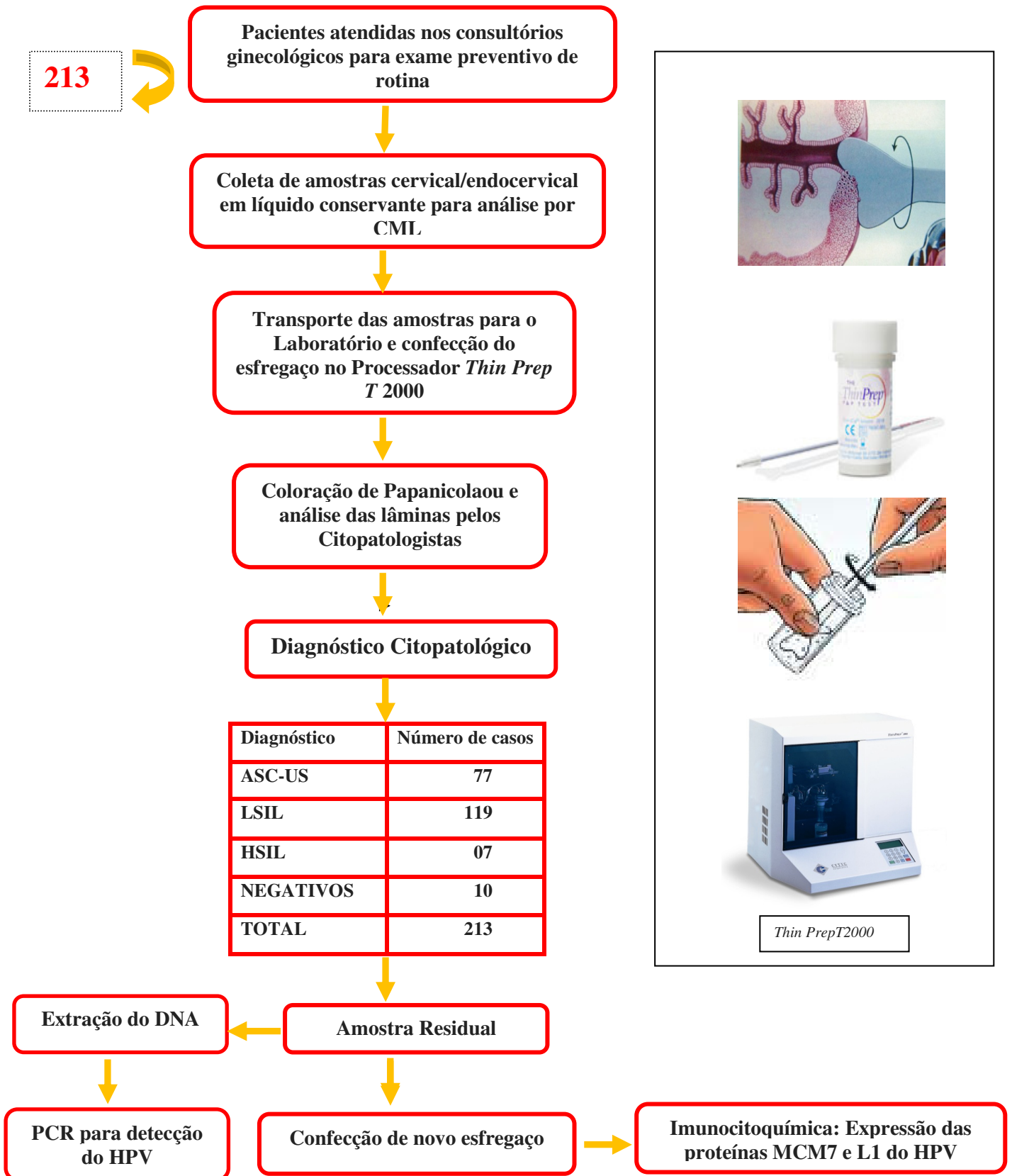
Segundo informações do fabricante, as amostras celulares coletadas na solução conservante do Kit coletor (*Thin Prep®*), podem ser utilizadas posteriormente para a detecção dos HPVs de alto e baixo Risco pelo método de Captura Híbrida, para o diagnóstico por PCR de *Chlamydia sp* e *Neisseria Gonorrhoea*, para a detecção por RT-PCR das proteínas E6 e E7 do HPV, para o diagnóstico por RT-PCR de vários agentes (*Mycoplasma sp*, *Ureaplasma sp*, entre outros), e para o teste de detecção indireta do HPV por meio da técnica de Imunocitoquímica para P16 *Cintec Plus*.

4.4 - PREPARO DE ESFREGAÇOS PARA A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA

Para a realização da técnica de ICC foi necessário a obtenção de esfregaços sobre lâminas previamente silanizadas, utilizando-se solução de Silano a 2%. Para a análise por ICC de MCM7 foram preparados esfregaços cervicais no Processador *Thin Prep T 2000*, utilizando-se kits (lâminas + filtro) adquiridos do fabricante. Para a análise por ICC de L1, os esfregaços cervicais foram preparados em lâminas de vidro convencionais silanizadas, a partir de um volume de células em suspensão no líquido coletor. Para a obtenção de um esfregaço contendo um número de células adequado, três diferentes volumes da amostra coletada foram testados (500 µl, 800 µl e 1000 µl), sendo escolhido o volume final de 1000 µl.

As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, sendo a maior parte do sobrenadante descartado e o volume reduzido até 30µl. Em seguida as células eram transferidas para as lâminas silanizadas por pipetagem, sendo o esfregaço homogeneizado e seco à temperatura ambiente, para posterior fixação em álcool 95% por no mínimo 24 horas.

FIGURA 14 - Fluxograma ilustrativo do processo de coleta e processamento das amostras de CML.



4.5- ANÁLISE CITOPATOLÓGICA

Para a realização do exame citopatológico, após a fixação em álcool etílico os esfregaços foram corados pelo método de Papanicolaou, de acordo com protocolo descrito no Anexo 01.

Cada esfregaço foi analisado por três profissionais especializados e devidamente treinados para o estudo de esfregaços de Citologia em Meio Líquido, e havendo concordância diagnóstica entre os mesmos, o laudo citopatológico era emitido de acordo com a Nomenclatura de Bethesda (SOLOMON, *et al.*, 2002), relatando ainda a presença de alterações sugestivas ou compatíveis com a infecção pelo HPV.

Como citado anteriormente, a utilização de sinais não-clássicos (SNC) tem sido proposta para aumentar a sensibilidade do exame citológico no diagnóstico de casos de infecção pelo HPV. SCHNEIDER e colaboradores (1987) descreveram em seu trabalho, nove sinais não-clássicos (SNC): disqueratose leve, coilocitose leve (ou esboço de coilocitose), citoplasma claro, grânulos de querato-hialina, condensação dos filamentos citoplasmáticos, núcleo hiper Cromático, bi ou multinucleação e halo perinuclear. A disqueratose leve pode ser distinguida de sua forma clássica pelo tamanho e forma do núcleo, enquanto a coilocitose leve pela ausência de atipias nucleares e presença de borda menos definida entre a cavidade central e o citoplasma periférico.

A presença de disqueratose leve, coilocitose leve e bi ou multinucleação, foram os três dos nove SNC utilizados nesse projeto, para a classificação dos casos categorizados como portadores de alterações sugestivas da infecção pelo HPV. Já naqueles casos considerados compatíveis com a infecção pelo HPV, a presença de coilocitose clássica foi usada com critério diagnóstico.

4.6- ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

Empregou-se a técnica de Imunocitoquímica (ICC) para a análise da expressão da proteína MCM7 e da proteína L1 do HPV pela utilização do Kit Vector (VEC-STAIN. Elite ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA- *Mouse e Rabbit*), cujas especificações se encontram na Tabela 1. Após a confecção e a fixação dos esfregaços em etanol 96% por aproximadamente 24 horas, estes foram armazenados à temperatura ambiente até a sua

utilização nos testes de ICC. Em seguida foi realizada a etapa da reativação antigênica, através do aquecimento das lâminas em tampão Tris pH 7,0 em banho-maria entre 95-99°C durante 1 hora. Posteriormente foi realizada a etapa de incubação com os anticorpos primários a 4°C *overnight*, utilizando-se as diluições que foram determinadas em experimentos de Padronização. Foram em seguida realizadas à temperatura ambiente, as etapas de bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ (30 minutos), de incubação com o anticorpo secundário do Kit (30 minutos), de incubação com o reagente de visualização (30 minutos), e de revelação com solução cromógena de 3,3'-diaminobenzidina DAB (*Peroxidase Substrat Kit DAB-Vector SK 4100*) por 10 minutos. Para a contra-coloração utilizou-se a Hematoxilina de Harris.

Para análise da expressão das proteínas nucleares (MCM7 e L1 do HPV) foram utilizados os seguintes anticorpos, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, como descrito na Tabela 1.

TABELA 1- Especificações dos Anticorpos utilizados na técnica de Imunocitoquímica

Anticorpo	Especificações	Hospedeiro/Tipo	Marca	Diluição	Código
<i>Primário</i>	Anticorpo Anti-MCM7; clone DCS-141	<i>Mouse</i> monoclonal	ABCAM	1:800	AB 2360
	Anticorpo Anti -L1 do HPV	<i>Rabbit</i> monoclonal	ABCAM	1:300	AB 11777
<i>Secundário</i>	VEC-STAIN. Elite ABC Kit Catálogo Number pk6102	<i>Anti-Mouse</i> (IgG) para MCM7	Vector	1:500	PK 6102
		<i>Anti-Rabbit</i> (IgG) para L1			PK 6101

4.6.1- INTERPRETAÇÃO DAS MARCAÇÕES PARA MCM7 E L1 DO HPV

A imunoreatividade para MCM7 foi avaliada em cada esfregaço, sendo a marcação para a proteína exclusivamente nuclear.

Foi utilizada uma sequência de 3 passos para se considerar a positividade das amostras, da seguinte maneira: (i) avaliação da adequação da amostra de acordo com os critérios de citologia cervical determinados na classificação de Bethesda 2001 (SOLOMON, *et al.*, 2002); (ii) avaliação da ocorrência de coloração na tonalidade marrom no núcleo das células epiteliais; (iii) verificação da presença de anormalidades nas células escamosas, de acordo com os critérios citológicos de diagnóstico, já citados anteriormente. Se todos os 3 passos foram classificados como positivos, o esfregaço foi considerado imunorreativo para o anticorpo testado. Um mínimo de 3 células escamosas marcadas, apresentando alterações atípicas, foi considerado para que a amostra fosse classificada como positiva.

A imunoreatividade para a proteína L1 do HPV também foi analisada em cada esfregaço, sendo avaliados 2 critérios: (i) adequação da amostra de acordo com os critérios de citologia cervical determinados na classificação de Bethesda 2001 (SOLOMON, *et al.*, 2002); (ii) a ocorrência de coloração na tonalidade marrom no núcleo das células epiteliais, com ou sem alterações morfológicas. Eventualmente, marcação citoplásmica também foi observada concomitantemente com a marcação nuclear.

Como controle positivo para as reações com MCM7, inicialmente foram utilizados esfregaços confeccionados a partir de amostra de CML obtida de uma paciente que apresentava diagnóstico de Lesão de alto grau (NIC III), comprovada pelo exame histopatológico. Como essa amostra não foi suficiente para a confecção de esfregaços para a realização de todos os testes de Imunocitoquímica, foi realizada a cultura de células Hela para confecção de lâminas de controle positivo, como descrito mais adiante.

Para as reações de ICC para a proteína L1 do HPV, foram utilizados como controle positivo esfregaços confeccionados a partir de amostras de pacientes que apresentavam diagnóstico de HPV pelo exame de Papanicolaou, e que apresentavam grande concentração de células com coilócitos.

Como controle negativo, em ambos os testes, foram realizadas as reações de ICC substituindo-se os anticorpos primários, Anti-MCM7 e Anti-L1 do HPV, por solução de PBS/BSA a 2%, conforme protocolo já descrito.

Destaca-se que a análise estatística dos resultados apresentados nesse estudo encontra-se em andamento.

4.7- ANÁLISE MOLECULAR

Uma alíquota de 4,5mL foi retirada de cada amostra cervical armazenada em meio líquido, e submetida à extração do DNA das células para posterior realização da técnica do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o objetivo de se investigar a presença do DNA/HPV.

Para a realização da extração de DNA das amostras cervicais foi utilizado um protocolo adaptado de VILLA *et al.*, 1995 e de YAMAGUCHI *et al.*, 2002.

Após agitação do frasco contendo as células conservadas em meio líquido, foi retirada uma alíquota de 1,5mL e transferida para um tubo *Eppendorf* (1,5 mL). Em seguida os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por cinco minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado, sendo esse processo repetido por mais duas vezes. O *pellet* de células obtido foi ressuspensionado em 300 µl de solução tampão de lise, contendo 100 µg/mL de proteinase K (30 µg). Os tubos foram vortexados e incubados a 55° C *overnight* ou por 48 horas, até a digestão completa do material. Quando verificava-se a presença de sangue residual na amostra, as células eram ressuspensionadas em 400µl de solução lise de hemácias (SLH). Os tubos eram centrifugados a 10.000 rpm por cinco minutos para a remoção da hemoglobina. Verificou-se se o lisado se encontrava límpido para prosseguir a extração. Nos casos onde se verificava a presença de material não digerido, foram adicionados mais 30 µg de proteinase K e a etapa de digestão repetida. Os tubos foram, então, guardados a -20° C até a próxima etapa.

Em seguida, foi realizada a extração proteica pela adição de um volume (1Vol = 300 µl) de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram vortexados e centrifugados a 5.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, sendo adicionado um volume de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A centrifugação foi repetida e seguida por transferência do sobrenadante para outro microtubo, e adição de três volumes (3Vol = 1,2 mL) de etanol absoluto gelado e um décimo do volume (1/10 = 30 µl) de solução de Acetato de Sódio (NaOAc) a 3M. Os tubos foram deixados a -20 °C *overnight* para precipitação do DNA, e então, foram colocados no gelo e centrifugados a 4° C, a 13.000 rpm, durante 20 minutos, sendo posteriormente o *pellet* de DNA ressuspensionado em 100 µl de H₂O estéril. O DNA foi estocado em freezer -20 °C até o momento de uso.

4.7.1- AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DE β -GLOBINA HUMANO

Para verificação da integridade do DNA extraído de cada amostra, foi utilizada amplificação do gene de β -globina humano, através do uso dos iniciadores PC03 (CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA TA GC) e PC04 (TCA CCA CAA CTT CAT CCA CGT TCA) (SAIKI *et al.*, 1988), capazes de amplificar um fragmento de 110 pb do gene de β -globina. As condições de preparo da reação e o programa de amplificação utilizado estão listados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2- Componentes do Mix de PCR para o gene de β -globina humano

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
Iniciador <i>PC03(Alpha DNA)</i>	10pmol/ μ l	5pmol	0,5 μ l
Iniciador <i>PC04(Alpha DNA)</i>	10pmol/ μ l	5pmol	0,5 μ l
dNTP's (<i>Invitrogen</i>)	2,5mM	200 μ M	0,8 μ l
TAMPÃO PHT IB (<i>Phoneutria</i>)	10x	1x	1,0 μ l
Taq DNA polimerase (<i>Phoneutria</i>)	5UI / μ l	1UI	0,2 μ l
H ₂ O	-	-	6,0 μ l

Volume final de 10 microlitros: 9 μ l de Mix e 1 μ l de DNA da amostra.

TABELA 3- Programa de Amplificação do gene de β -globina humano

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	-

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida a 6% por aproximadamente uma hora, em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, a uma voltagem

constante de 100V. As amostras foram aplicadas utilizando-se 5 µl dos produtos de PCR homogeneizados com 5 µl de tampão de amostra 2X (TBE 5X / Azul de bromofenol a 0,25% / Xilenocianol a 0,25% / Ficol 400 a 15%). Após o término da eletroforese, os géis foram submersos em solução fixadora (contendo 5mL de ácido acético, 100mL de etanol absoluto e H₂O destilada para um volume final de 1000mL) por 10 minutos. Em seguida os géis foram expostos à solução de coloração, contendo 0,15 g de Nitrato de prata (AgNO₃) em 50 mL de solução fixadora e 100 mL água, por 15 minutos. Os géis foram então lavados com água destilada por 30 segundos, e revelados com solução reveladora (contendo 15 g de hidróxido de sódio, NaOH, 5 mL de formaldeído e H₂O até o volume final de 1000 mL) até o aparecimento das bandas de interesse.

Como controle positivo da amplificação do gene de β-globina humano, foram utilizadas amostras de DNA extraídas de sangue, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. Como controle negativo da reação de PCR, foi utilizado o branco do MIX da reação, que consiste em uma mistura de todos componentes da reação (dNTP's, Tampão, iniciadores e *Taq* DNA polimerase) sem adição de qualquer amostra de DNA.

4.7.2 - DETEÇÃO DO DNA DO HPV POR MEIO DE PCR

4.7.2.1- AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS FRAGMENTOS DE 450 pb e 150pb DO GENE L1 DO GENOMA VIRAL.

Todas as amostras de DNA extraídas no presente trabalho foram submetidas à pesquisa do DNA do HPV, utilizando-se um sensível protocolo de “*Nested-PCR*”. O DNA extraído foi submetido à amplificação do fragmento de 450pb da região de L1/HPV, sendo os produtos dessa reação utilizados em uma segunda reação para amplificação de um fragmento de 110pb, internamente localizado ao fragmento de 450pb descrito.

As condições utilizadas no Mix da reação assim como o programa de amplificação do PCR específico estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 4 - Componentes do Mix de PCR para amplificação do fragmento viral de 450pb

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME PORTUBO
Iniciador MY09(<i>Alpha DNA</i>)	5pmol/μl	5pmol	1,0 μl
Iniciador MY11(<i>Alpha DNA</i>)	5pmol/ μl	5pmol	1,0 μl
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200μM	0,8 μl
Mg	25mM	2,5mM	0,4 μl
TAMPÃO PHT IB(<i>Phoneutria</i>)	10X	1X	1,0 μl
Taq DNA polimerase (<i>Phoneutria</i>)	5UI / μl	0,625UI	0,125 μl
H ₂ O	-	-	4,675 μl

Volume final de 10 microlitros: 9 μl de Mix e 1 μl de DNA da amostra.

TABELA 5 - Programa de Amplificação do fragmento viral de 450pb

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO
1	95°C	4 minutos
2	95°C	1 minuto
3	72°C	2 minuto
4	95°C	1 minuto
5	29 vezes ao passo = 40 ciclos	-
6	55°C	1 minuto
7	72°C	5 minutos
8	4°C	Infinito
9	Fim	

Após a realização da 1ª etapa de amplificação os produtos da 1ª reação foram submetidos à reação de PCR utilizando os iniciadores consenso GP5/GP6+, cujas sequências de bases são 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3' e 5' GAAAATAAACTGTAAATCATATTC3', respectivamente. Este par de oligonucleotídeos amplifica uma sequência de aproximadamente 150 pares de bases (pb) da região de L1 do genoma do HPV, interna ao fragmento de 450 pb anteriormente descrito (HUSMAN et al., 1995). As condições de preparo da reação e o programa de amplificação utilizado estão listados nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6 - Componentes do Mix de PCR para amplificação do fragmento viral de 150pb

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME PORTUBO
Iniciador <i>GP5(Alpha DNA)</i>	10pmol/μl	10pmol	1,0 μl
Iniciador <i>GP6(Alpha DNA)</i>	10pmol/ μl	10pmol	1,0 μl
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	250μM	0,8 μl
TAMPÃO PHT IB (<i>Phoneutria</i>)	10X	1X	1,0 μl
Taq DNA polimerase(<i>Phoneutria</i>)	5UI/ μl	1UI	0,2 μl
H ₂ O	-	-	5,0 μl

Volume final de 10 microlitros: 9 μl de Mix e 1 μl de DNA da amostra.

TABELA 7- Programa de Amplificação do fragmento viral de 150pb

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 2 a 4	-
6	72°C	1 minuto
7	4°C	Infinito
8	Fim	-

Como controle positivo da reação de PCR para HPV foram utilizadas amostras de DNA extraídas de células Hela, que possuem o DNA do HPV 18 integrado ao seu genoma. A cultura de células Hela foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Como controle negativo da reação de PCR foi confeccionado o branco do MIX da reação. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, de acordo com o protocolo descrito para o gene da β-globina humano.

Destaca-se que a análise estatística dos resultados apresentados nesse estudo encontra-se em andamento.

4.8 – CULTURA DE CÉLULAS HELA

Para o controle positivo da reação de ICC para MCM7, foram utilizados esfregaços preparados de cultura de Células Hela. Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Morfologia sob a orientação da Professora Luciana de Oliveira Andrade. Para a cultura de células de linhagem Hela, foi inicialmente realizado o descongelamento da amostra que estava armazenada em nitrogênio líquido. Retirou-se a ampola (*vial*) com células do tanque de nitrogênio, e esta foi imediatamente mergulhada num banho-maria a 37°C. O volume de 1,5mL presente na ampola foi utilizado para o cultivo de 3 garrafas contendo 5 mL de meio DMEM 10%, (enriquecido com 10% de soro fetal bovino), sendo adicionados a cada garrafa 0,5 mL de suspensão de células (diluição de 1:10). As células foram então mantidas em incubadora à 37°C e sob atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias até alcançar-se a estabilização da cultura. A partir dessa etapa foi mantida apenas uma garrafa de cultura, com confluência de 70 a 90%, sendo as demais células congeladas novamente.

Para a manutenção das células em cultura, foram realizados repiques a cada dois dias seguindo o seguinte protocolo:

- 1- Antes de iniciar o repique, foi observada a morfologia das células ao microscópio e verificada a confluência que deveria estar entre 70 a 90%;
- 2- O meio de crescimento DMEM 10% foi descartado, lavou-se duas vezes as células com PBS-/- (sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺) e descartou-se o PBS completamente com auxílio de uma pipeta. Esta etapa garante que sejam eliminados qualquer inibidor e /ou competidor que possam se ligar à Tripsina impedindo-a de agir sobre as ligações intercelulares;
- 3- Adicionou-se então à garrafa, 0,5mL de Tripsina a 0,05% e incubou-se por cerca de 2 minutos a 37°C. Retirou-se a garrafa da estufa, procedeu-se pequena movimentação do líquido, sem deixar que o conteúdo tocasse a borda da garrafa. Essa etapa garante a dissociação mecânica das células;
- 4- Observou-se ao microscópio se as células haviam se soltado e então adicionou-se 4,5mL de meio DMEM 10%;
- 5- Retirou-se 4mL dessa suspensão e retornou-se a garrafa para a incubadora a 37°C sob 5% de CO₂ por 48 horas até o próximo repique.

A suspensão de células retirada da garrafa na última etapa do repique foi centrifugada, teve o seu sobrenadante descartado e com a suspensão de células confeccionou-se esfregaços em lâminas de vidro sinalizadas, que foram utilizados como controle positivo nas reações de Imunocitoquímica.

Para o controle negativo, foram utilizados esfregaços confeccionados a partir de amostras coletadas por CML que não apresentavam nenhum tipo de lesão intraepitelial, nem qualquer tipo de alteração do tipo reacional.

5.1- ESTUDO MORFOLÓGICO DAS AMOSTRAS CERVICAIS COLETADAS POR CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO (CML)

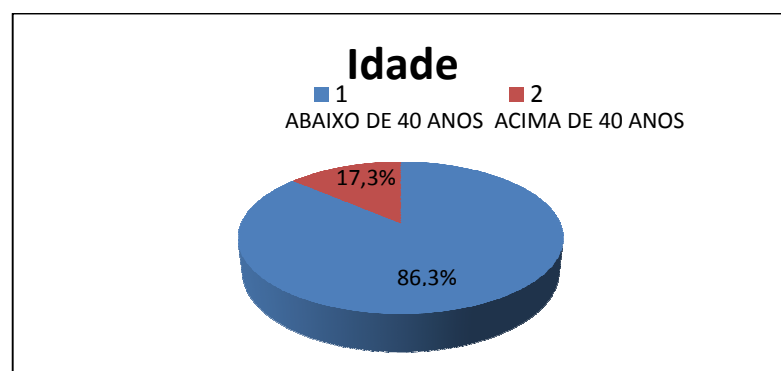
Após a confecção dos esfregaços e coloração pela técnica de Papanicolaou (descrita no Anexo 3, Seção de Anexos), as amostras de CML foram analisadas de acordo com os critérios estabelecidos pela nomenclatura de Bethesda. Considerou-se também nessa análise a presença dos “sinais não-clássicos” da infecção pelo HPV descritos anteriormente, como critérios sugestivos da infecção pelo vírus (Figura 8). As amostras foram categorizadas em 7 grupos diagnósticos diferentes de acordo com a tabela abaixo:

TABELA 8: Classificação das amostras de CML de acordo com o diagnóstico citológico

DIAGNÓSTICO	NÚMERO DE CASOS
ASC-US	55
ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV	22
LSIL	16
LSIL sugestivo da infecção pelo HPV	32
LSIL compatível com a infecção pelo HPV	71
HSIL	7
CONTROLE NEGATIVO (*)	10
TOTAL	213

* Amostras sem anormalidades morfológicas

De acordo com informação presente no formulário de encaminhamento do exame de cada paciente, constatou-se que a idade das pacientes variou de 15 a 83 anos, sendo que 86,3% (184) delas apresentavam abaixo de 40 anos (Gráfico 1).



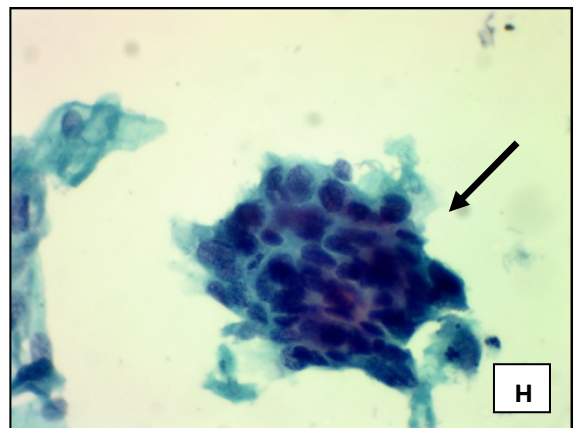
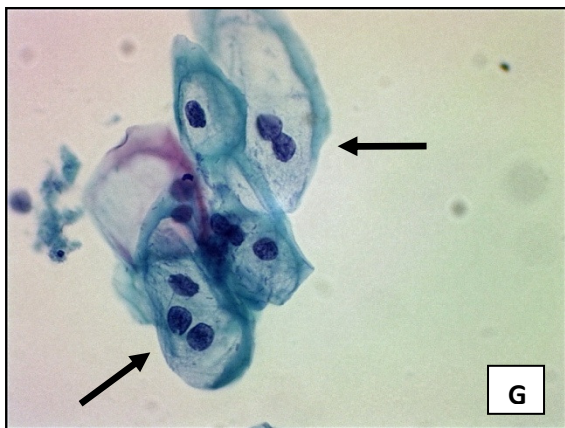
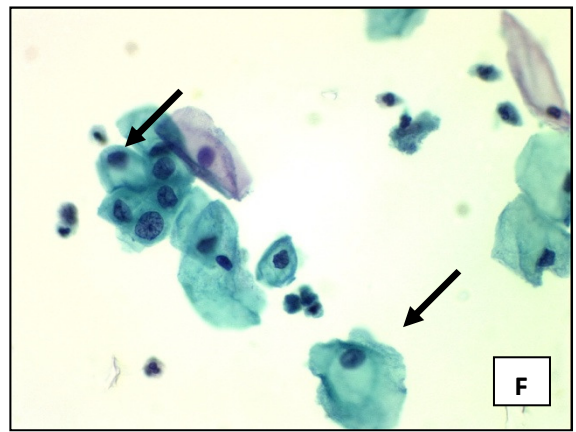
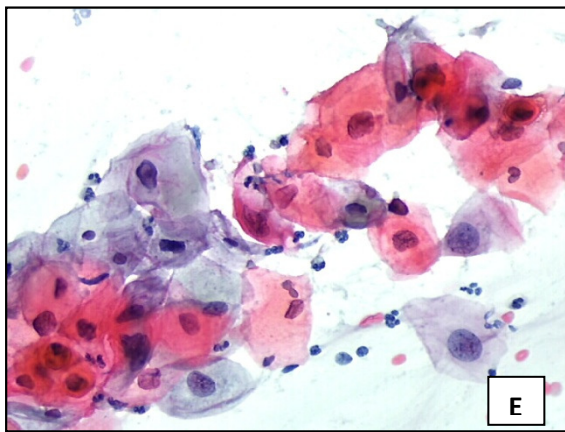
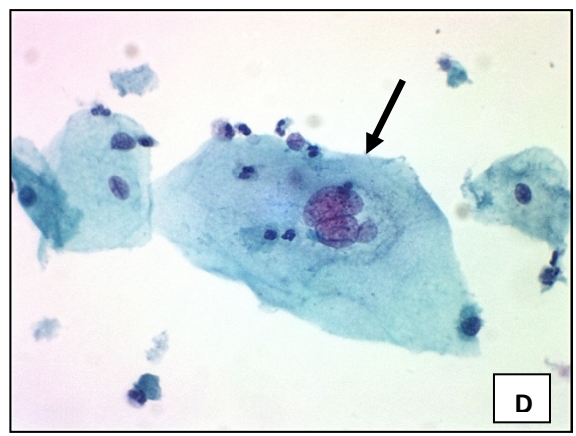
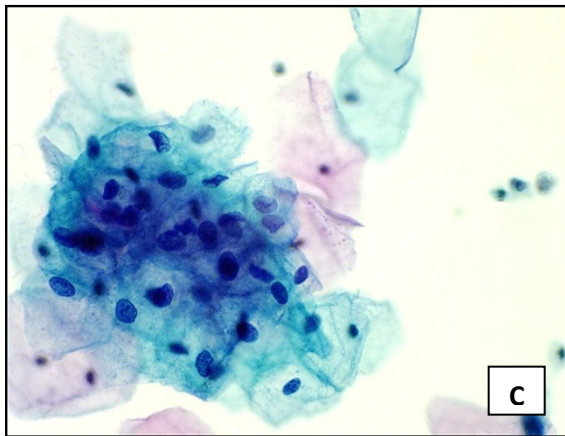
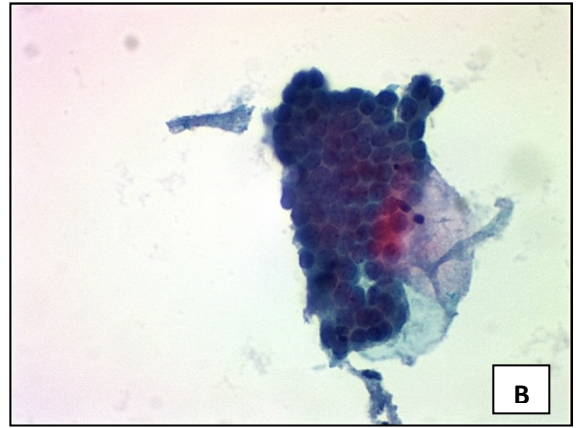
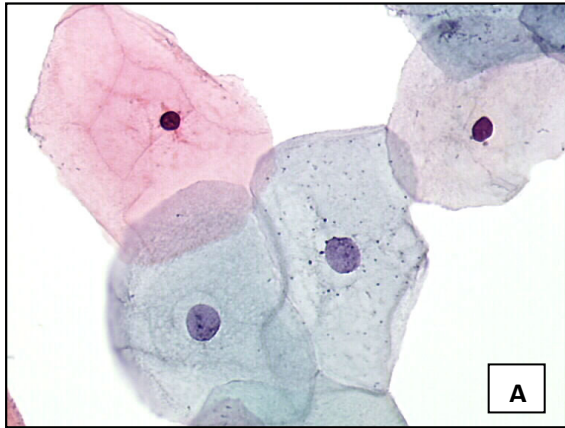


FIGURA 15: Classe de diagnóstico citológico apresentadas pelas pacientes analisadas no presente trabalho (Aumento de 400X). Esfregaços cervicais obtidos por CML e corados pela técnica de Papanicolaou. **A-** Esfregaço citológico sem anormalidades; **B-** Grupo de células endocervicais normais; **C-** ASC-US: Observa-se núcleo celular 2,5 a 3 vezes maior do que o núcleo de uma célula normal da camada intermediária do epitélio escamoso estratificado, com presença de citoplasma maduro, de aumento discreto da relação núcleo-citoplasma (N/C) e de cromatina com padrão de distribuição regular; **D-** ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV: observa-se célula binucleada (seta) correspondendo a um dos sinais não-clássicos da infecção pelo HPV; **E-** LSIL: observam-se células apresentando relação N/C mais alterada com núcleo ocupando cerca de 1/3 a 1/2 do citoplasma, cromatina com padrão mais grosseiro e irregularidade da membrana nuclear; **F-** LSIL sugestivo da infecção pelo HPV: as células apresentam as alterações descritas na foto anterior, porém as setas mostram o esboço de coilocitose, também considerada sinal não-clássico da infecção pelo HPV; **G-** LSIL compatível com a infecção pelo HPV: as setas mostram coilocitose típica; **H-** HSIL: observa-se células com relação N/C muito alterada, com o núcleo ocupando quase todo o citoplasma, apresentando cromatina grosseira e hiper cromática; as células se agrupam formando sincícios (seta).

5.2- PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA PARA AS PROTEINAS MCM7 e L1 do HPV

Com o objetivo de padronizar a técnica de Imunocitoquímica para análise da expressão de MCM7 e L1 do HPV em amostras de raspado cervical colhidas por CML, foram realizados experimentos da curva de diluição dos anticorpos primários, buscando a otimização do uso dos anticorpos anti - MCM7 e anti- L1 do HPV.

Para a otimização do uso do anticorpo primário anti-MCM7 foram testadas as diluições de 1:200, 1:400 e 1:800, com o tempo de incubação “overnight” a 4°C, conforme recomendações do fabricante. Considerando-se que pouca diferença na intensidade de marcação foi observada entre essas 3 distintas diluições, e que ainda havia preservação das características morfológicas das células pelo uso de uma maior diluição do anticorpo primário, optou-se pela utilização desse anticorpo a 1:800 (Figura 16).

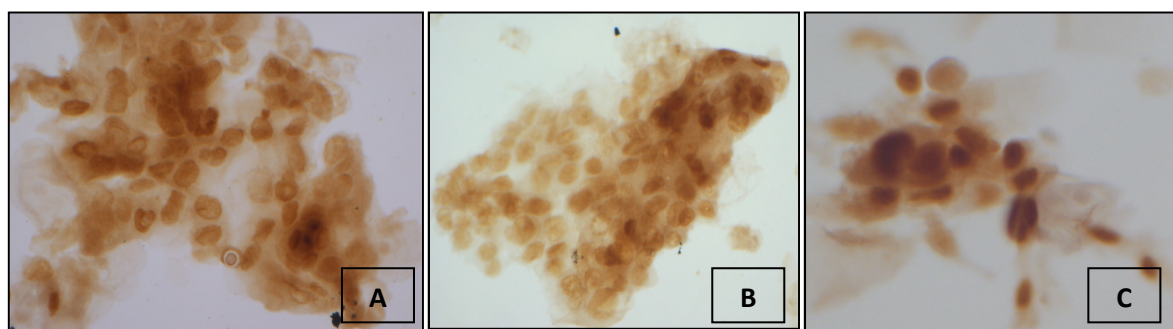


FIGURA 16: Curva de diluição do anticorpo MCM7 em amostras de Citologia em Meio Líquido. (Aumento 400X). A amostra utilizada no experimento apresentava diagnóstico de HSIL pela

Citologia com confirmação de NIC III pelo diagnóstico histológico - **A**: diluição 1:200; **B**: diluição 1:400; **C**: diluição 1:800.

Para verificar-se a existência de uma possível reação inespecífica desenvolvida pelo anticorpo secundário, realizou-se um experimento no qual o anticorpo primário anti-MCM7 foi substituído pela solução de bloqueio (PBS/BSA 2%). Destaca-se que nenhuma marcação inespecífica foi observada. Assim, adotou-se esse procedimento em cada experimento como controle negativo da reação. Da mesma forma, como controle positivo da reação, a cada experimento também era utilizada uma lâmina de lesão do tipo NIC III que havia sido processada normalmente, utilizando-se o anticorpo anti-MCM7 na diluição de 1:800.

Como citado anteriormente (Seção 4.6.1- Materiais e Métodos), o volume das amostras de CML com diagnóstico de HSIL que seriam utilizadas como controle positivo da reação, foi insuficiente para a finalização dos testes de Imunocitoquímica (ICC), sendo necessária a obtenção de cultura de Células Hela. Com o objetivo de otimizar o uso dos esfregaços de células Hela, como controle positivo da reação de ICC para o anticorpo anti-MCM7, também foi realizada a curva de diluição do anticorpo em esfregaços preparados com essas células, de modo a se verificar a melhor diluição. Essa curva de diluição foi realizada da forma já descrita anteriormente, sendo testadas as diluições de 1:200, 1:400 e 1:800. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles obtidos com as amostras de NICIII (Figura 17).

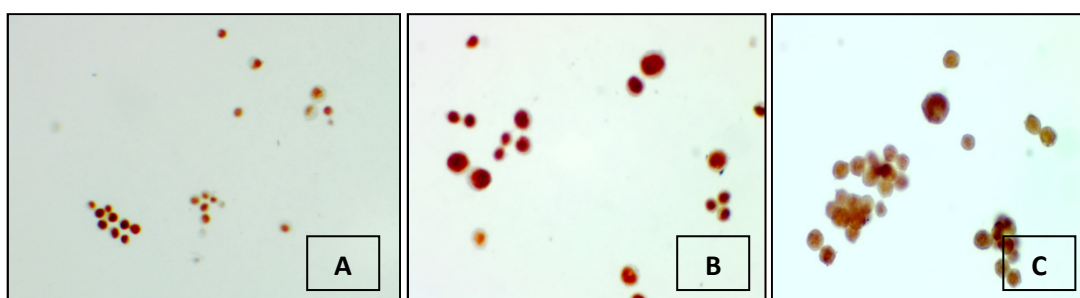


FIGURA 17: Curva de diluição do anticorpo anti-MCM7 em esfregaços de células Hela (Aumento 400X). A- diluição de 1:200 (Aumento 100X); **B-** diluição de 1:400 (Aumento 400X) ; **C-** diluição de 1:800 (Aumento 400X)

Numa segunda fase do trabalho foi realizada a padronização do anticorpo anti-L1 do HPV. Buscando otimizar o uso desse anticorpo também foi realizada uma curva de diluição, sendo testadas as diluições de 1:100, 1:300 e 1:500, com o tempo de incubação “*overnight*” a 4°C. Observou-se uma boa intensidade de marcação na diluição de 1:300.

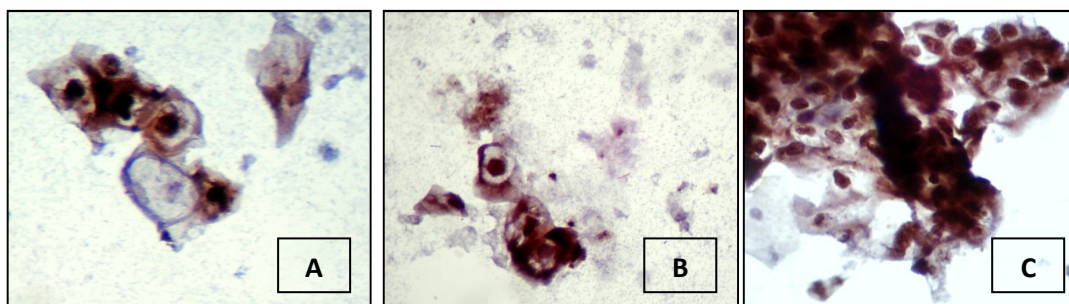


FIGURA 18: Curva de diluição do anticorpo anti-L1 do HPV em amostras de Citologia em Meio Líquido (Aumento 400X). A amostra utilizada no experimento apresentava diagnóstico de NIC I com alterações compatíveis com a infecção pelo HPV. A- A diluição de 1:100, mostrou marcação muito forte, a diluição de B- 1:300 apresentou marcação ideal. C- 1:500 mostrou uma intensidade de marcação mais fraca no núcleo das células.

Em relação ao uso dos anticorpos secundários, a utilização desses anticorpos diluídos a 1:500 durante o período de incubação de 1 hora à temperatura ambiente, mostrou os melhores resultados para a revelação dos anticorpos primários, como já havia sido padronizado no Laboratório em trabalhos anteriores.

5.3- DETECÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA MCM7 EM AMOSTRAS DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO

Após a etapa de padronização da técnica de ICC para MCM7, procedemos à análise das amostras que seriam avaliadas no presente estudo. Um total de 213 amostras foram testadas quanto à imunoreatividade para a proteína MCM7. Dessas, 203 apresentavam alterações morfológicas sendo assim distribuídas: 55 ASC-US, 22 ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV, 16 LSIL, 32 LSIL sugestivo da infecção pelo HPV, 71 LSIL compatível com a infecção pelo HPV, 7 no grupo de HSIL e 10 negativas para alteração epitelial. A marcação para a proteína foi observada no núcleo das células, como uma forte coloração marrom (Figura 19).

Foram considerados como positivos apenas aqueles casos, onde as células marcadas apresentavam alterações morfológicas. Também foram observadas em alguns casos, marcação inespecífica no núcleo de células endocervicais. Porém essas não mostravam nenhum tipo de alteração morfológica, sendo, portanto, consideradas marcações inespecíficas. Destaca-se que nenhum tipo de marcação para a proteína MCM7, foi observada nas amostras controle negativo.

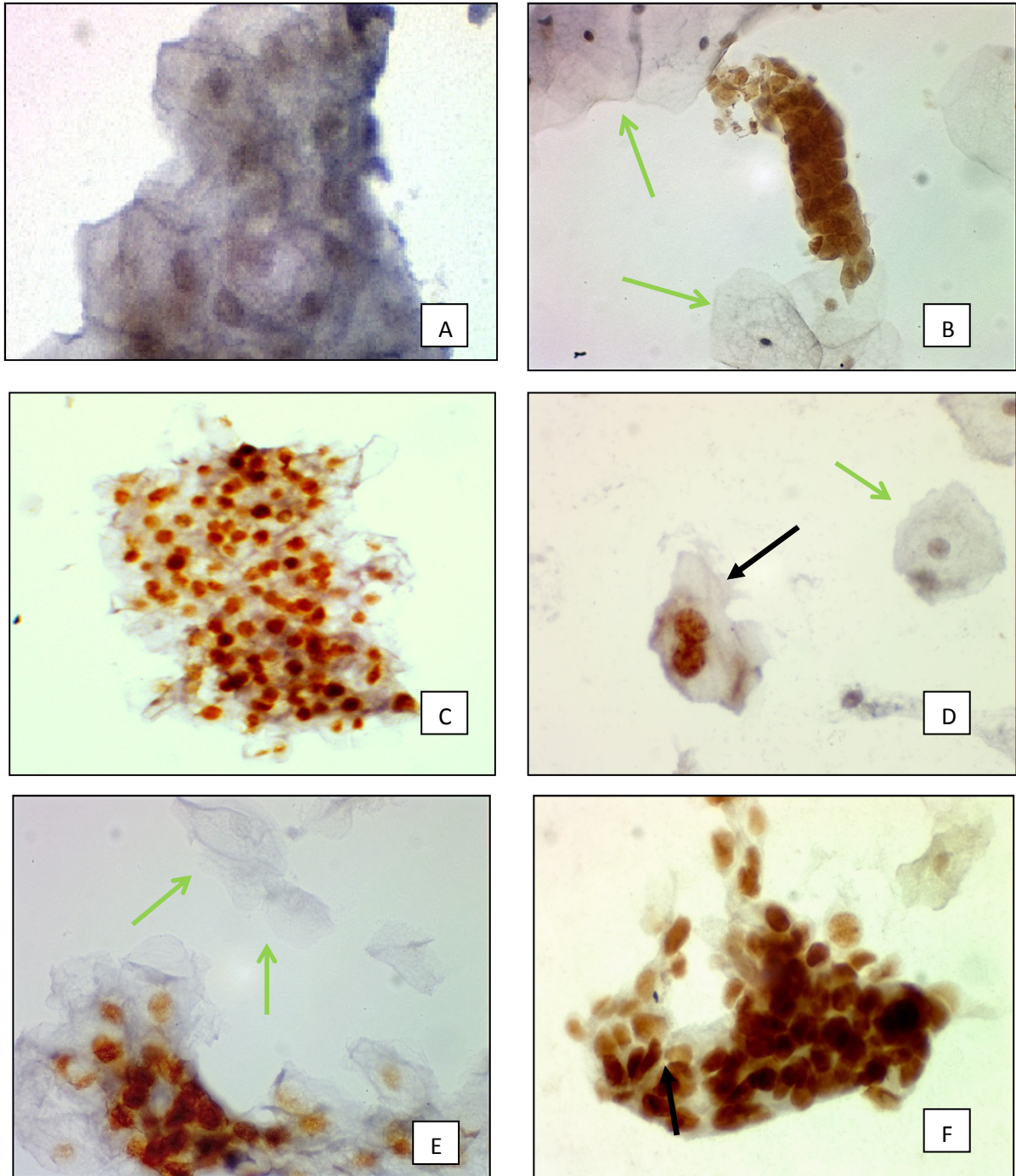


FIGURA 19: Imunocitoquímica para a proteína MCM7 nas amostras cervicais de Citologia em Meio Líquido (A, B, D, E, F, G- Aumento de 400X; C - Aumento de 100X). A- Amostra negativa: grupo de células escamosas sem marcação nuclear; B- Marcação inespecífica em grupo de células endocervicais; C- ASC-US: núcleos de células escamosas marcados, mas com discreta alteração morfológica; D- LSIL com alterações compatíveis com a infecção pelo HPV: observa-se a presença de marcação nuclear, em célula coilocitótica (seta). E- LSIL: os núcleos marcados ocupam 1/3 a 1/2 da área do citoplasma, correspondendo à lesão de baixo grau e F- HSIL: Forte marcação nos núcleos das células escamosas que apresentam grande alteração na relação N/C. As setas verdes indicam células sem marcação, negativas para o anticorpo Anti-MCM7.

Com relação à imunoreatividade das amostras, podemos observar que no total das 213 amostras analisadas, 39 (18,3%) casos apresentaram marcação nuclear pelo uso do anticorpo anti- MCM7, sendo positivos 7 (12,7%) casos de ASC-US, 2 (9 %) casos de ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV, 3 (18,8%) casos de LSIL, 9 (28,1%) casos de LSIL sugestivo da infecção pelo HPV, 11 (15,4%) casos de LSIL compatível com a infecção pelo HPV, 7 (100%) casos de HSIL . Ressalta-se que nenhuma das amostras negativas para Lesão intraepitelial apresentou marcação para esse anticorpo (Tabela 9).

Destaca-se que tanto nos casos de ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV, como nas amostras de LSIL sugestivo da infecção pelo HPV, observou-se uma maior porcentagem de marcação para MCM7 quando comparados com aquela observada no grupo das amostras de ASC-US e LSIL.

TABELA 9: Resultado da análise Imunocitoquímica para a proteína MCM7 em amostras de Citologia em Meio Líquido.

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	Número de casos analisados	MCM7 Negativo	MCM7 Positivo
ASC-US	55	48 (87,3%)	7 (12,7%)
ASC-US sugestivo de infecção pelo HPV	22	20 (91%)	2 (9%)
LSIL	16	13 (81,3%)	3 (18,8%)
LSIL sugestivo da infecção pelo HPV	32	23 (71,8%)	9 (28,1%)
LSIL compatível com a infecção pelo HPV	71	60 (84,6%)	11(15,4%)
HSIL	7	0 (0%)	7 (100%)
CONTROLE NEGATIVO	10	10 (100%)	0 (0%)
TOTAL	213	174 (81,6%)	39 (18,3%)

5.4- DETECÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA L1 do HPV EM AMOSTRAS DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO

No presente estudo, para a detecção da expressão da proteína L1 do HPV foram selecionadas em 180 amostras. Todas as pacientes, cujas amostras foram suficientes para realização da ICC, que apresentavam diagnóstico de ASC-US ou LSIL com alterações sugestivas ou compatíveis com a infecção pelo HPV foram testadas. O número de casos testados para esse anticorpo foi menor devido aos fatores: (i) o esgotamento de algumas amostras, o que tornou impossível a realização do teste para o anticorpo anti-L1, (ii) a realização da ICC para a proteína L1 do HPV nos casos com diagnóstico de LSIL e ASC-US foi realizado apenas naqueles que, embora não tivessem apresentado pela Citologia qualquer indicativo da infecção pelo HPV, mostraram resultado positivo para o DNA/HPV por PCR, (iii) realização da ICC para L1 em pacientes que apresentavam em seus prontuários relato clínico de controle de lesões anteriores e /ou infecção pelo HPV.

Foram considerados positivos aqueles casos cujas células apresentaram marcação nuclear e citoplasmática, na presença ou não de alterações morfológicas.

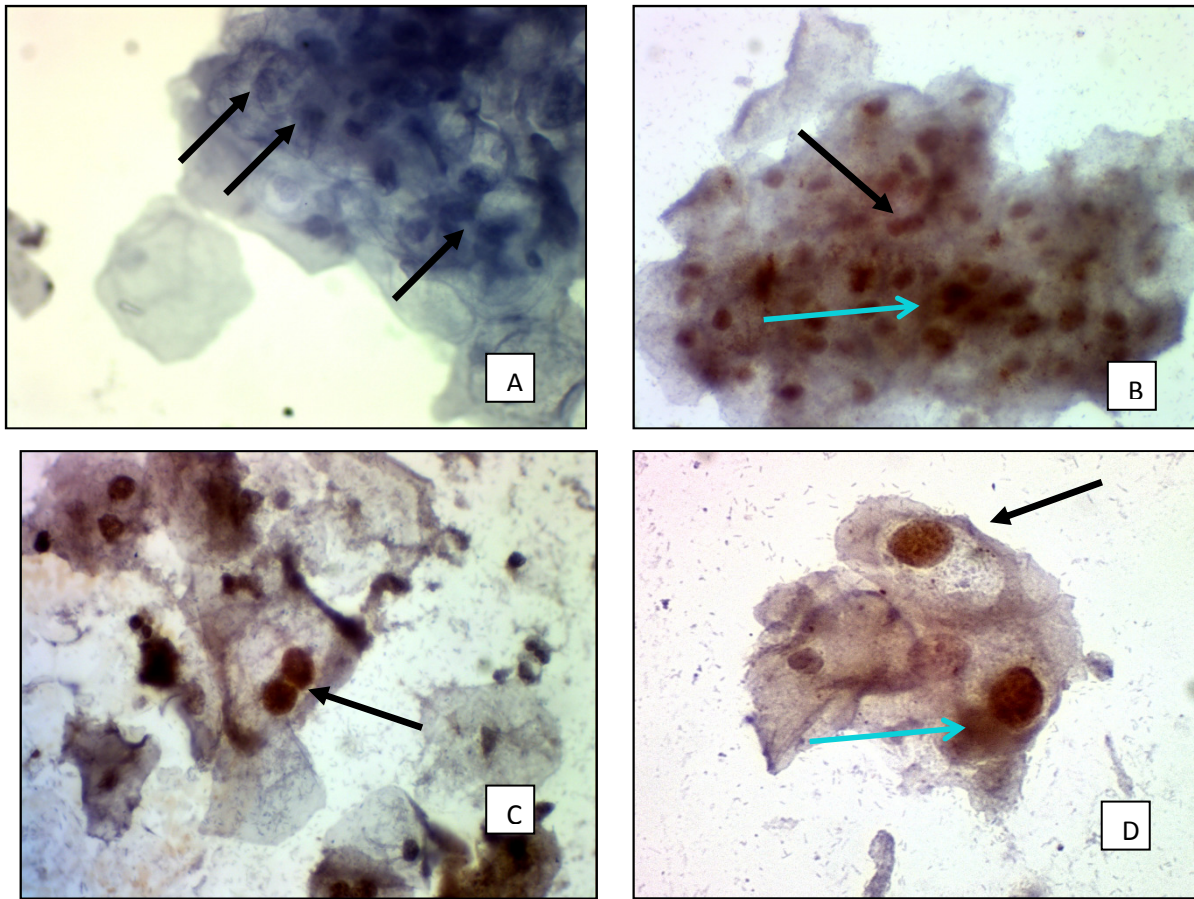


FIGURA 20: Imunocitoquímica para a proteína L1 do HPV em amostras cervicais de Citologia em Meio Líquido (Aumento de 400X). A- Controle negativo por omissão do anticorpo primário: observa-se a presença de coilócitos sem marcação; B- ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV: observa-se a presença de binucleação, sinal não-clássico da infecção pelo HPV (seta); C e D- LSIL compatível com a infecção pelo HPV: observa-se coilocitose (setas pretas). Seta azul indica presença de marcação citoplasmática.

Dentre as 180 amostras selecionadas para estudo com o anticorpo anti-L1 do HPV, 36 não apresentaram material suficiente para análise. Dessa forma, foram avaliadas no total 144 amostras de CML com a seguinte distribuição por diagnóstico morfológico: 43 casos de ASC-US, sendo que 17 eram sugestivos da infecção pelo HPV; 87 casos de LSIL, sendo 26 sugestivos da infecção pelo HPV e 55 apresentavam alterações compatíveis com a infecção pelo vírus e 6 casos de LSIL. Também foram avaliados 4 casos de HSIL e 10 casos negativo para Lesão Intraepitelial.

Com relação à imunoreatividade das amostras, observou-se que das 144 amostras analisadas 86 (59,7%) casos apresentaram marcação nuclear pelo uso do anticorpo anti-L1 do

HPV, sendo as amostras positivas assim distribuídas por categoria de diagnóstico: 16 (61,5%) casos de ASC-US, 12 (70,5%) casos de ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV, 4 (67%) casos de LSIL, 16 (61,5%) casos de LSIL sugestivo da infecção pelo HPV, 37 (67%) casos de LSIL compatível com a infecção pelo HPV e 1 (25,0%) caso de HSIL (Tabela 10).

TABELA 10: Resultado da análise Imunocitoquímica para a proteína L1 do HPV em amostras de citologia em Meio Líquido

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	Número de casos selecionados	Número de casos insuficientes para análise entre os selecionados	Número de casos analisados	L1 Negativo	L1 Positivo
ASC-US	32	6	26	10 (38,5%)	16 (61,5%)
ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV	22	5	17	5 (29,5%)	12 (70,5%)
LSIL	7	1	6	2 (33%)	4 (67%)
LSIL sugestivo da infecção pelo HPV	31	5	26	10 (38,5%)	16 (61,5%)
LSIL compatível com a infecção pelo HPV	71	16	55	18 (33%)	37 (67%)
HSIL	7	3	4	3 (75,0%)	1 (25,0%)
NEGATIVA	10	0	10	10 (100%)	0 (0%)
TOTAL	180	36	144	58 (41%)	86 (59,7%)

5.5- RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCM7 E L1 DO HPV

A expressão da proteína MCM7 foi analisada em relação àquela da proteína L1 do HPV em 131 amostras. Foram utilizados para essa correlação, somente aqueles casos que apresentaram a detecção positiva do DNA do HPV pela técnica de PCR, e que haviam sido simultaneamente testadas quanto à expressão das duas proteínas. Para essa análise, amostras foram categorizadas em quatro grupos: MCM7 (-) / L1(-); MCM7 (-) / L1 (+); MCM7 (+) / L1 (+) e MCM7 (+) / L1(-).

TABELA 11 : Relação entre a expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	MCM7-/ L1-	MCM7-/ L1 +	MCM7+/ L1+	MCM7+ / L1-	TOTAL
ASC-US	9	12	3	2	26
ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV	3	11	1	0	15
LSIL	1	3	1	1	6
LSIL sugestivo da infecção pelo HPV	9	8	7	1	25
LSIL compatível com a infecção pelo HPV	18	24	11	0	53
HSIL	0	0	2	4	6
TOTAL	40 (30,8%)	58 (44%)	25 (19,2%)	8 (6,2%)	131

A análise dos resultados apresentados na Tabela 11 mostra que os casos onde houve ausência da expressão das duas proteínas corresponderam a 31% de todas as lesões, o padrão de marcação MCM7(-) / L1(+) representaram 44% das lesões, o padrão de marcação MCM7(+) / L1(+) representaram 19% de todas as lesões, e o padrão MCM7 (+) / L1(-) representou 7% das lesões.

Porém uma análise mais minuciosa desses dados nos permite verificar que a maior parte das amostras de ASC-US (21=81% de 26) e ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV (14=93% de 15) apresentaram os padrões MCM7- / L1- e MCM7- /L1 +. Resultados similares foram encontrados para o grupo de amostras de LSIL, que apresentaram, em sua maioria, os padrões combinados de marcação MCM7- /L1- e MCM7- / L1 +. Assim, 4 (67% de 6) amostras de LSIL, 17 (68% de 25) amostras de LSIL sugestivo da infecção pelo HPV e 42 (70% de 53) amostras de LSIL compatível com a infecção pelo HPV, apresentaram esses dois perfis de marcação.

Por outro lado, 100% das 6 amostras de HSIL apresentaram os padrões de marcação MCM7+ / L1 + e MCM7 + / L1 -.

Esses dados sugerem que a análise conjunta da expressão das duas proteínas, pode constituir um relevante parâmetro de determinação de severidade das lesões cervicais. Nesse contexto, o grupo das amostras de ASC-US ou ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV, ou de LSIL com ou sem indícios da infecção pelo vírus, que apresentaram o padrão de marcação

MCM7+ / L1+ e MCM7+ / L1-, poderiam ter uma tendência à progressão para lesões cervicais mais severas.

5.6- INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS

Nesse estudo, foram coletadas por Citologia em meio líquido 213 amostras cervicais, sendo que 203 amostras apresentavam alterações morfológicas por meio da análise citológica e 10 foram consideradas amostras controle negativo, sem alterações celulares visíveis à microscopia óptica. Das amostras que apresentavam alguma atipia celular pela Citologia, foi possível realizar a extração do DNA em 192, já que 11 dessas amostras não apresentaram celularidade suficiente para realizar a extração. Porém todas as amostras negativas tiveram o DNA extraído.

Para se avaliar a integridade do DNA obtido das amostras após extração, foi utilizada a amplificação do fragmento de 110 pb do gene de β - globina, sendo observada amplificação em 100% dos casos.

A Figura 21 ilustra os produtos obtidos pela reação de PCR do fragmento de 110bp do gene de β - globina humano, pela amplificação das amostras cervicais analisadas no presente estudo.

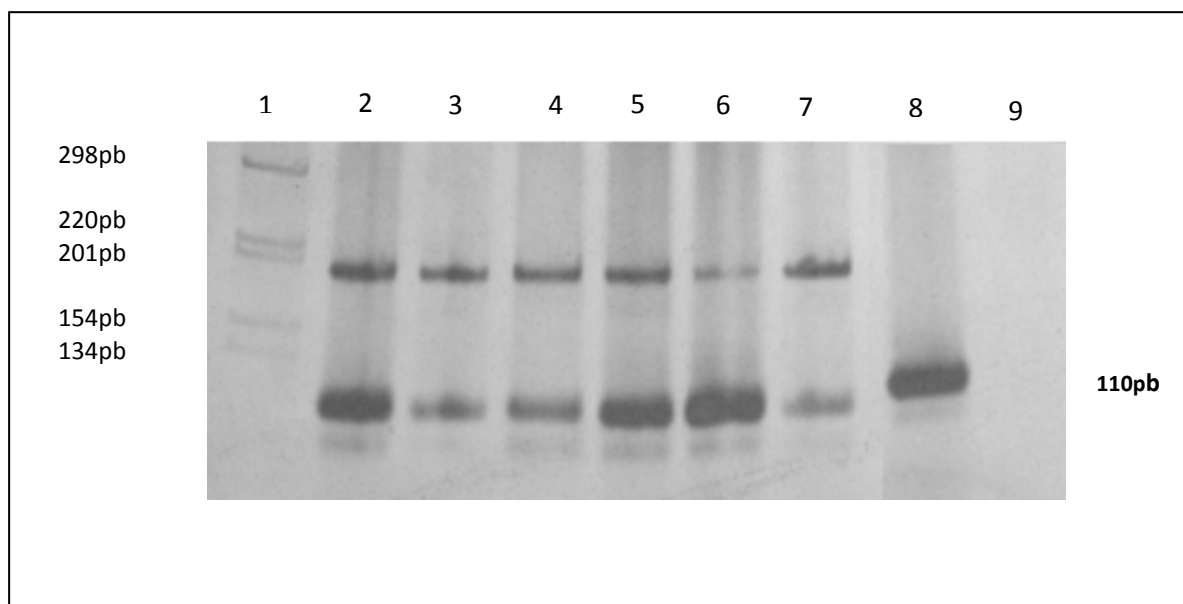


FIGURA 21: Gel representativo da amplificação do fragmento de 110pb do gene de β globina humano: Canaleta 1: Padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); canaletas 2 a 7: Produtos de PCR obtidos das amostras positivas; canaleta 8: Controle positivo da reação (amostra de DNA extraída de sangue); canaleta 9: Controle negativo da reação (componentes da PCR sem DNA adicionado).

Observa-se a presença de um fragmento de aproximadamente 110pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva, assim como naquela contendo o controle positivo da reação. Verifica-se ausência do fragmento alvo na canaleta correspondentes ao controle negativo da reação .

5.7 PREVALÊNCIA DO HPV NA POPULAÇÃO ESTUDADA

Todas as amostras de DNA extraídas no presente trabalho foram submetidas à pesquisa do DNA do HPV, utilizando-se um sensível protocolo de “*Nested-PCR*”.

Em relação às 192 amostras portadoras de alterações citológicas, 163 foram positivas para a amplificação do fragmento viral de 150pb, utilizando-se os *primers* GP5 / GP6⁺, totalizando uma prevalência geral de 85% do DNA do HPV na população analisada.

Todas as 10 amostras usadas como controle negativo no estudo, apresentaram amplificação do fragmento de 110pb do gene da β - *globina* humano, mas não do fragmento de 150pb do gene de L1/HPV.

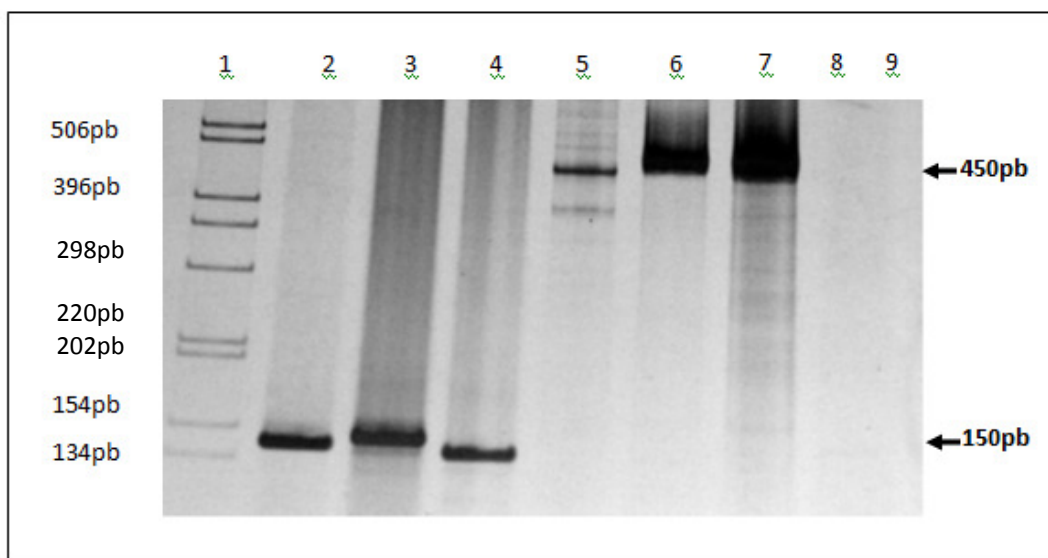


FIGURA 22: Gel representativo da amplificação dos fragmentos virais de 150 pb e 450 pb, respectivamente. Canaleta 1: Padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); canaletas 2 a 4: Produtos de PCR obtidos das amostras que apresentaram amplificação positiva com os iniciadores GP5 / GP6⁺ ; canaletas 5 a 7: Produtos de PCR obtidos das amostras que apresentaram amplificação positiva com os iniciadores MY09 / MY11; canaleta 8: Controle negativo da reação utilizando os iniciadores GP5 / GP6⁺ (componentes da PCR sem DNA adicionado); canaleta 9: Controle negativo da reação utilizando os iniciadores MY09 / MY11 (componentes da PCR sem DNA adicionado).

A Tabela 12 mostra a distribuição por diagnóstico citológico dos resultados dos testes de PCR para o DNA do HPV na população estudada.

TABELA 12: “Prevalência” do HPV na população estudada

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	Número de casos Selecionados	Número de casos insuficientes para análise	Número de casos analisados	GP5 /GP6 Negativo	GP5/ GP6 Positivo
ASC-US	55	8	47	9 (19%)	38 (81%)
ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV	22	2	20	2 (10%)	18 (90%)
LSIL	15	-	15	3 (13%)	13 (87%)
LSIL sugestivo da infecção pelo HPV	32	-	32	2 (6%)	30 (94%)
LSIL compatível com a infecção pelo HPV	70	2	68	5 (7%)	63 (93%)
HSIL	7	-	7	0	7 (100%)
Controle negativo	10	-	10	10 (100%)	-
TOTAL	211	12	199	31	169 (85%)

A maior “prevalência” de detecção do DNA do HPV, foi observada nos casos de LSIL com alterações sugestivas e compatíveis com a infecção pelo HPV, correspondendo a 94% e 93%, respectivamente. Nos casos de ASC-US observou-se a presença do DNA/HPV em 81% das amostras. Porém, na categoria dos casos classificados como ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV, nos quais considerou-se a presença dos sinais não clássicos da infecção, a porcentagem de detecção do DNA viral aumentou para 90%. Nos casos de HSIL analisados, o DNA viral foi encontrado em 100% dos casos.

5.8- RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCM7 E L1 DO HPV E A PRESENÇA DO DNA DO HPV

A expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV foi analisada em relação à presença ou ausência do DNA do HPV, sendo analisados os casos submetidos à detecção do DNA/HPV e à realização da Imunocitoquímica para os dois marcadores (Tabela 13).

TABELA 13: Relação entre a expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV e a presença ou ausência do DNA do HPV

Imunocitoquímica	Total	DNA/HPV (+)	%	DNA/HPV (-)	%
MCM7 (-) / L1 (-)	40	36	90%	4	10%
MCM7 (-) / L1 (+)	58	55	95%	3	5%
MCM7 (+) / L1 (+)	25	22	88%	3	12%
MCM7 (+) / L1 (-)	8	8	100%	0	0%
TOTAL	131	121	92%	10	8%

O DNA do HPV foi observado em 92% dos casos onde avaliou-se a expressão conjunta das duas proteínas, sendo que os casos com o padrão de marcação MCM7 (-) / L1 (+) apresentaram maior porcentagem de positividade para a presença do DNA do HPV (95%). Quando os grupos MCM7(+) / L1(+) e MCM7(-) / L1(+) foram analisados em conjunto, observou-se que das amostras que expressaram L1, 93% também eram portadoras do DNA/HPV, mostrando a íntima associação entre a presença do DNA do HPV e a expressão da proteína L1. Nossos dados também mostraram que a expressão de MCM7 foi intimamente associada à presença do DNA do HPV, uma vez que 91% (30 de 33) das amostras MCM7 (+) apresentaram amplificação positiva do DNA viral.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2013), o câncer do colo do útero é a terceira causa de câncer mais comum entre as mulheres, em todo o mundo. A infecção pelo Papilomavírus humano é atualmente considerada uma condição necessária para o desenvolvimento desse tipo de câncer. Contudo, fatores socioambientais, genéticos, biológicos e moleculares estão intimamente relacionados com o curso da doença.

A detecção precoce do câncer possibilita um tratamento mais eficaz, e aumenta consideravelmente a sobrevivência dos pacientes. Por essa razão, o diagnóstico citológico do câncer cervical, mas especialmente de suas lesões precursoras através do exame de Papanicolaou, têm sido altamente eficientes na redução da mortalidade e da morbidade dessa neoplasia (PARKIN, *et al.*; 2002; van HAMONT *et al.*, 2007; DENNY *et al.*, 2012; HODA *et al.*, 2012). Segundo a OMS, a experiência de alguns países desenvolvidos mostra que a incidência do câncer do colo do útero foi reduzida em torno de 80%, mediante a implantação de programas de rastreamento, tratamento e seguimento de mulheres, eficazes e de qualidade. (BALDWIN, 2003; WHO, 2008).

Na tentativa de melhorar o desempenho do exame citológico, foi introduzido no mercado, em 1990, o método de Citologia em Meio Líquido, técnica que permitiu a confecção de esfregaços mais límpidos, mais homogêneos e com menor sobreposição celular, tornando ainda possível a realização de testes moleculares com a amostra residual (FALHEY *et al.*, 1995; RENSHAW *et al.*, 2006; JURIE *et al.*, 2010).

No entanto, tanto o método convencional quanto o baseado na CML, apresentam algumas limitações na identificação de células malignas ou pré-malignas. Entre elas destacam-se os resultados falso-negativos, em sua maioria decorrentes de falhas durante a coleta das células, a fixação inadequada do material, e principalmente, as variações intra ou interobservador (PAIRWUTI, 1991; GUIMARÃES & SILVA, 1995; WANG *et al.*, 1997). Além disso, células anormais podem mostrar alterações morfológicas sutis, difíceis de distinguir de características reativas benignas, e que podem passar despercebidas, especialmente se estiverem presentes em pequena quantidade, como por exemplo, aquelas classificadas na categoria diagnóstica de ASC-US (BARCELOS *et al.*, 2001; BOARDMAN & KENEDDY, 2008; SIDDIQUI *et al.*, 2008).

A expressão de biomarcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros (KRAMER *et al.*, 2001; TERMINI & VILLA, 2008; PINTO *et al.*, 2012). A identificação de novos biomarcadores, que permitam monitorar eventos moleculares associados à progressão tumoral, em amostras histológicas ou citológicas, tem sido proposta como ferramenta diagnóstica para melhorar a detecção de lesões cervicais, principalmente aquelas com maior risco de progressão.

Assim, investigou-se no presente estudo, a partir de amostras de Citologia em meio líquido coletadas de pacientes portadoras de ASC-US, LSIL e outras lesões epiteliais, o padrão de expressão da proteína MCM7, envolvida no controle do ciclo celular, sendo responsável pelo licenciamento das células para a replicação do DNA.

Vale ressaltar que até o momento nenhum estudo foi realizado na literatura, no qual tenha sido avaliada a expressão de MCM7 em células cervicais colhidas em Citologia em meio líquido, por meio da técnica de Imunocitoquímica, sendo, portanto, esse trabalho inédito. Todos os estudos previamente desenvolvidos com mucosas cervicais avaliaram a expressão de MCM7 por técnicas de Imunohistoquímica (BRAKE *et al.*, 2003; MIDDLETON *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006) ou Imunofluorescência (LOBATO *et al.*, 2012).

A expressão aumentada de proteínas MCMs já foi verificada na maioria de tumores sólidos e 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). 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 câncer de cólon (NISHIHARA *et al.*, 2008), próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; LAITINEN *et al.*, 2008), endometrial (LI *et al.*, 2005), e cervical (BRAKE *et al.*, 2003). Entretanto, só alguns estudos foram direcionados à análise da expressão de proteínas MCMs em mucosa uterina humana (WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999) ou de linhagens celulares derivadas desse sítio (ISHIMI *et al.*, 2003). Além disso, a maioria desses trabalhos analisaram predominantemente a imunoexpressão das proteínas MCM2 e MCM5 (WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999). Apenas alguns trabalhos analisaram a expressão de MCM7 em mucosas cervicais de pacientes (BRAKE *et al.*, 2003; MIDDLETON

et al., 2003; LOBATO *et al.*, 2012) e de camundongos (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006), e em linhagens celulares derivadas da cérvix (ISHIMI *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que as proteínas MCMs não são expressas somente nos casos de câncer. Em epitélios do tipo estratificado, sem anormalidades, as MCMs são expressas fisiologicamente na camada basal do epitélio, já que se trata da camada proliferativa. De fato, alguns trabalhos demonstraram que a expressão das MCM 2, 5 e 7 foi restrita a regiões proliferativas normais da epiderme, da cérvix, do intestino, da pele, do esôfago e de tecidos linfóides (HIRAIWA *et al.*, 1997; TODOROV *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999). Em trabalho realizado em nosso grupo de estudo, LOBATO e colaboradores (2012) obtiveram resultado semelhante, mostrando que a proteína MCM7 é expressa somente nas camadas mais profundas do epitélio estratificado cervical sem anormalidades.

A marcação pelo anti-MCM7 nas células alteradas é basicamente nuclear, visto que se trata de um marcador relacionado com o ciclo celular. A análise da expressão Imunocitoquímica das MCMs em esfregaços citológicos, foi principalmente realizada em amostras de Citologia em Meio Líquido, devido à grande vantagem do método que permite a realização de testes baseados em Imunocitoquímica. Células obtidas em preparações citológicas geralmente emanam de camadas superficiais e, dessa forma, as células escamosas normais e bem diferenciadas presentes em esfregaços citológicos, são MCM negativas. Nos processos malignos e pré-malignos, caracterizados por descontrole do ciclo celular, a expressão das proteínas MCM em núcleos ao longo de toda a espessura do epitélio estratificado é abundante, inclusive nas camadas superficiais (GONZALEZ *et al.*, 2005). Por consequência, a detecção das proteínas MCM em preparações citológicas, permite a detecção de células anormais (COLEMAN & LASKEY, 2009).

Alguns estudos foram realizados a partir de 2006 utilizando o teste conjugado ProExC(BD – Diagnóstica), formado pelo coquetel de dois anticorpos monoclonais anti-MCM2 e anti-TOP2A. TAMBOURET e colaboradores (2008) observaram que, o teste ProExC apresenta sensibilidade de 92 % e especificidade de 84 % para a detecção de HSIL. Trabalho realizado por DEPUYDT e colaboradores (2011) com 3126 mulheres portadoras de HSIL também mostrou resultado similar, alcançando 78% de sensibilidade e 91% de especificidade pelo uso deste teste em lesões do tipo HSIL. BECCATI e colaboradores (2008) mostraram que o teste ProExC, baseado nos marcadores monoclonais anti-MCM2 e anti-TOP2A, mais informativo para a progressão de LSIL para HSIL do que o marcador de proliferação Ki67.

Desde a descrição inicial da categoria ASC-US, muitos pesquisadores têm tentado avaliar o risco de detecção subsequente de neoplasia intraepitelial cervical neste grupo, principalmente com relação à evolução para neoplasia intraepitelial de alto grau. Em média os estudos mostram que 10 a 20% das pacientes com lesões do tipo ASC-US são diagnosticadas posteriormente, por técnica histológica, com HSIL (SELVAGGI *et al.*, 1995; COLLINS *et al.*, 1996 ; AUGER *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1997; LACHMAN *et al.*, 1998; MANOS *et al.*, 1999 ; LONKY *et al.*, 1999; VLAHOS, 2000). Assim, a análise da expressão de alguns biomarcadores vem sendo utilizada, na tentativa de selecionar os casos cujas lesões poderiam ter maior probabilidade de progredir, como a proteína p16^{INK4} (NIEH *et al.*, 2005; MEYER *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2007; LI YU *et al.*, 2010; DENTON *et al.*, 2010; MA YUAN-YING *et al.*, 2011; ROELEN *et al.*, 2012).

Alguns estudos foram direcionados à análise da expressão das proteínas MCMs em casos de ASC-US. Ao analisar a expressão de MCM2/TOP2A em 200 amostras de ASC-US, através do uso do teste ProExC, SIDDIQUI e colaboradores (2008) detectaram as proteínas MCM2/ TOP2A em 88 desses casos (44%). Também utilizando o mesmo teste, BECCATI e colaboradores (2008) encontraram positividade para MCM2/ TOP2A em 18 de 76 (23%) amostras analisadas.

Em nosso estudo observamos uma positividade para MCM7 em 18,3% (39/213) do total de casos analisados, taxa relativamente semelhante aos dados da literatura para a marcação com a proteína MCM2 associada a TOP2A. Quando analisamos a expressão do marcador dentro das 2 categorias de ASC-US, observamos que a imunomarcação para MCM7 aconteceu em 12,7% das amostras de ASC-US e em 9% dos casos classificados como ASC-US com alterações sugestivas da infecção pelo HPV.

A análise da imunomarcação por MCM7 nos casos de LSIL foi de 9,32%, (23/119). BECCATI e colaboradores (2008) que encontraram 20% de positividade para proteína MCM2/TOP2A nos casos de LSIL analisados. Observou-se em nosso estudo uma maior porcentagem de marcação dos casos de LSIL, em comparação aos casos de ASC-US (18,8%), onde a taxa de imunomarcação foi maior para os casos de LSIL com alterações sugestivas da infecção pelo HPV (28,1%), do que nos casos de LSIL com alterações compatíveis com a infecção pelo HPV (18,3%). Embora esse resultado possa estar relacionado a diferenças no “N” amostral analisado em cada grupo, 71 casos de LSIL com alterações compatíveis com HPV versus 32 casos de LSIL com alterações sugestivas da infecção pelo vírus, outros fatores relativos à infecção pelo vírus podem estar envolvidos.

Diversos trabalhos avaliaram a expressão das MCMs de maneira comparativa entre as lesões do tipo LSIL e HSIL. Os dados da literatura demonstram que o número de núcleos marcados aumenta de acordo o grau da lesão, tanto na análise de tecidos por Imunohistoquímica (FREEMAN *et al.*, 1999; DAVIDSON, *et al.*, 2003; TAMURA, *et al.*, 2010), quanto pela técnica de Imunocitoquímica (MUKHERJEE, *et al.*, 2007; BECCATI, *et al.*, 2008; SIDDIQUI, *et al.*, 2008; MURPHY, *et al.*, 2008), em estudos que avaliaram de forma comparativa a expressão das MCMs em casos de ASC-US, LSIL e HSIL, revelando um aumento da expressão das MCMs de acordo com a severidade da lesão.

Quando analisados os casos de HSIL do presente trabalho, observou-se que 100% das amostras foram positivas para MCM7. No estudo de BECCATI e colaboradores (2008) o percentual de positividade para MCM2/TOP2A encontrado foi de 80% (17/56) para os casos de NICIII, valor um pouco inferior do que o encontrado em nosso estudo, sendo, entretanto nosso “N” amostral reduzido. Em estudo realizado por SIDDIQUI e colaboradores (2008), observou-se um valor preditivo positivo para a detecção de MCM2/TOP2A (ProExC) em lesões do tipo HSIL de 100%.

O estudo desenvolvido por FREEMAN e colaboradores (1999) investigou o estado proliferativo de 204 amostras de tecidos humanos (correspondente a tecidos normais, hiperplasias, displasias e neoplasias) de vários sítios anatômicos, incluindo 48 tecidos da cérvix uterina (13 amostras de tecido normal, 08 de NIC I, 21 de NIC III e 06 de câncer). Esses autores verificaram aumento da expressão das MCMs 2 e 5 em lesões de alto grau em comparação a lesões de baixo grau. Porém, não foi avaliado nesse estudo (FREEMAN *et al.*, 1999), e nem em trabalho anterior do mesmo grupo (WILLIAMS *et al.*, 1998), o padrão de marcação de MCM7 em lesões progressivas da cérvix uterina.

Um outro estudo investigou o padrão de expressão de MCM7 em tecidos cervicais obtidos de pacientes humanos, e de camundongos transgênicos com elevada expressão da proteína E7 do HPV 16 (BRAKE *et al.*, 2003). No modelo murino, MCM7 foi altamente expressa tanto em lesões de alto grau quanto em tumores cervicais induzidos pela oncoproteína E7, exibindo um padrão de expressão muito similar àquele observado na doença cervical humana (BRAKE *et al.*, 2003). O último estudo foi um dos poucos a avaliar a expressão de MCM7 ao longo do epitélio cervical, em mucosa cervical de pacientes com epitélio normal ou apresentando doença cervical progressiva. As 13 amostras de mucosa cervicais normais avaliadas exibiram expressão positiva de MCM7 no terço basal do epitélio, enquanto que as amostras correspondentes aos grupos de lesão apresentaram o seguinte

padrão de distribuição da proteína: 100% das 07 LBG mostraram marcação de 1/3 do epitélio, 33% e 66% das 06 amostras de LAG exibiram marcação de 2/3 e 3/3 do epitélio e a totalidade das 08 amostras de câncer apresentaram marcação de 3/3 do epitélio (BRAKE *et al.*, 2003). Da mesma forma, MIDDLETON e colaboradores (2003) observaram resultados semelhantes ao último trabalho, ao avaliar o padrão de expressão de MCM7 em amostras de câncer cervical.

Esse mesmo padrão de distribuição da marcação ao longo do epitélio estratificado da cérvix uterina, também foi observado por LOBATO e colaboradores (2012) que analisaram em 80 amostras de pacientes incluídas em parafina, por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta, a expressão dos três biomarcadores (p16, Ki67 e MCM7) em amostras cervicais sem alteração histopatológica, e naquelas portadoras de graus distintos de Neoplasia Intraepitelial Cervical. Tais amostras incluíram 24 casos de mucosa cervical normal sem alteração histopatológica, obtidas de pacientes submetidas à histerectomia, 17 amostras de NIC I, 18 de NIC II e 21 amostras de NIC III.

Com base nessas considerações, podemos inferir com os dados obtidos em nosso estudo sobre a expressão de MCM7 em amostras cervicais obtidas por CML, com diagnóstico de ASC-US, LSIL e HSIL que o percentual de expressão dessa proteína aumenta gradativamente com o aumento da severidade da lesão, começando com ASC-US (23%), depois LSIL (59%) e HSIL (100%).

Diversos estudos indicam que a neoplasia cervical está intimamente relacionada à infecção persistente por HPVs de alto risco (revisão em BOSCH & SANJOSÉ, 2002; zur HAUSEN, 2002; DOORBAR, 2006). A integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira é, provavelmente, um passo importante na carcinogênese cervical, pois está frequentemente associada à progressão deste tipo de câncer.

Um dos principais desafios relacionados à detecção da infecção pelo HPV é determinar quais os indivíduos infectados, apresentariam maior risco de progressão das lesões. É sabido que a expressão Imunocitoquímica /Imunohistoquímica da proteína L1 do capsídeo viral está bastante associada à fase produtiva da infecção (YOSHIDA *et al.*, 2008). A proteína L1 é sintetizada no citoplasma das células da camada superficial do epitélio cervical na presença da infecção pelo HPV em fase produtiva do seu ciclo celular, e transportada posteriormente até o núcleo (HILFRICH, 2013).

Estudos sugerem que a perda da expressão da proteína L1 poderia funcionar como um marcador prognóstico de progressão das lesões (MELSHEIMER *et al.*, 2003; LEE, *et al.*, 2008; LI YU *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2010; SARMADI *et al.*, 2012).

No presente trabalho também avaliou-se em amostras cervicais obtidas por CML a expressão da proteína L1 do HPV, responsável pela síntese do capsídeo viral do HPV. Observou-se que 60,5% das amostras apresentaram a expressão da proteína L1 do HPV. XIAO e colaboradores (2010) encontraram uma taxa de positividade da proteína semelhante 59,12% (162 de 274) à observada em nosso estudo. Em outros estudos mais antigos, verificou-se uma expressão de L1 em aproximadamente 50% dos casos (MELSHEIMER *et al.*, 2003; NEGRI, *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008).

A avaliação da expressão da proteína por classe diagnóstica mostrou positividade em 61,5% dos casos de ASC-US e 70,5% das amostras de ASC-US com alterações sugestivas da infecção pelo HPV. Poucos estudos foram direcionados à análise da expressão da L1/HPV em amostras citológicas de ASC-US. LEE e colaboradores (2008) relataram a presença de L1 em 38,5% dos casos de ASC-US analisados, frequência inferior àquela encontrada nesse estudo. Em estudo bem recente, ao examinar um total de 475 casos de amostras citológicas cervicais colhidas pelo método convencional, o mesmo grupo encontrou 21,8% de casos de ASC-US positivos para L1 do HPV (LEE *et al.*, 2014). Entretanto, destaca-se que em nosso estudo apenas uma parcela das amostras foi submetida à análise da expressão de L1 do HPV.

Em relação aos casos de LSIL, observou-se positividade para L1 em 61,5% dos casos de LSIL sugestivos da infecção pelo HPV, e em 67% dos casos de LSIL compatível com a infecção pelo HPV. MELSHEIMER, e colaboradores (2003) encontraram dentre os 76 casos de LSIL analisados resultados semelhantes aos nossos, com 59% de positividade para L1, sendo todos os casos DNA/HPV positivo. SARMADI e colaboradores (2012) avaliaram a positividade para o L1 do HPV em 65 amostras, sendo que 43 correspondiam a casos de LSIL e encontraram 65,1% de amostras positivas. Dados semelhantes também foram encontrados por BYN e colaboradores (2013), estudando amostras citológicas de 309 pacientes, sendo 80 portadoras de LSIL, nas quais a positividade para L1/HPV foi de 66,7%. Para os casos de LSIL sem alterações que remetesse à infecção pelo HPV encontrou-se em nosso estudo 67% de positividade. Considerando que a marcação para a proteína L1 do HPV pode ser tanto nuclear quanto citoplasmática, a análise dessa imunomarcação nas células se torna um pouco mais difícil quando comparada aquela da proteína MCM7, que

marca exclusivamente o núcleo. Dessa forma, não se descarta no presente estudo ter ocorrido uma “supervalorização” das marcações durante a leitura dos esfregaços, o que poderia ter gerado algum resultado falso-positivo.

Como já destacado, a biologia da infecção pelo HPV está fortemente associada à patogênese do câncer uterino. A busca por biomarcadores que possam distinguir entre a infecção transitória pelo HPV e a infecção persistente é de grande importância, na tentativa de selecionar as pacientes com maior probabilidade de progressão das lesões. Vários estudos prospectivos na literatura têm mostrado que a detecção da proteína L1 do HPV, poderia ser usada como um biomarcador para se avaliar essa tendência. GRIESSER e colaboradores (2004) ao avaliar por um período de 2 anos aproximadamente, a evolução das lesões em 84 pacientes com diagnóstico de NIC I ou II positivas para HPV de alto risco, e que não apresentavam a expressão de L1/HPV por Imunocitoquímica, encontraram progressão em 73,4% dos casos, enquanto que apenas 23,6% das pacientes L1/HPV positivos apresentaram progressão. XIAO e colaboradores (2010), ao estudar a expressão da proteína L1/HPV em 274 pacientes positivas para HPVs de alto risco, encontraram positividade para L1/HPV em 83,5% dos casos de LSIL. Essas pacientes não foram submetidas a nenhum tratamento sendo que após um ano de *follow-up* a análise histopatológica de biopsias cervicais, mostrou ter havido regressão espontânea das lesões em 80% dos casos. Resultado similar foi encontrado por RAUBER e colaboradores (2008), em estudo retrospectivo realizado com 279 pacientes portadoras de NIC I ou II: a taxa de progressão para NIC III foi de apenas 12,3% nas pacientes que apresentaram L1/HPV positivo.

YOSHIDA e colaboradores (2008) apresentam duas prováveis hipóteses para explicar a perda de expressão de L1 de acordo com a progressão das lesões cervicais: 1- a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira; 2- e a presença de infecção latente, com pouca ou nenhuma produção de partículas virais. Os mesmos autores descrevem que a expressão de L1 diminui de acordo com a progressão das lesões de LSIL para HSIL, onde observa-se 30% de positividade para essa proteína nos casos de LSIL, e 12% nos casos de HSIL. Em nosso estudo, apenas 1 dos 4 casos de HSIL analisados apresentou positividade para L1/HPV o que equivale a 25%. Alguns trabalhos mostraram resultados semelhantes, porém com um (N) amostral mais significativo. BYN e colaboradores (2013) encontraram 25% (21/84) de positividade para L1, enquanto que UNGUREAU e colaboradores (2010) relatam 18,5% (5/27) dos casos de HSIL positivos para L1/HPV. Em todos os casos de HSIL analisados observou-se maior positividade para L1 entre as amostras de NIC II. A maior parte dos

estudos mostram que a positividade para L1/HPV entre os casos de NICIII e CCE é muito baixa, próxima de zero (YOSHIDA *et al.*, 2003; UNGUREAU *et al.*, 2010; LI YU *et al.*, 2010).

Os dados obtidos nesse estudo e em diversos outros, sugerem que a detecção da proteína L1 do HPV poderia ser um bom biomarcador para selecionar as pacientes com diagnóstico de lesão de baixo grau, com maior probabilidade de progressão da doença. Quanto aos casos de ASC-US, nossos dados foram divergentes dos poucos dados encontrados na literatura, e dessa forma, o uso isolado da proteína L1 como um biomarcador indicativo de progressão, para essa categoria diagnóstica, necessitaria de maiores estudos.

No presente estudo também avaliou-se a presença do DNA do HPV nas amostras de CML. Com base nessa análise encontramos 85% de casos DNA/HPV positivos, entre as amostras avaliadas, o que está de acordo com os dados da literatura. Ao analisar a prevalência do HPV em amostras de esfregaços cervicais de mulheres com história progressiva de lesões, LEVI e colaboradores (2001) e MELO e colaboradores (2005), que utilizaram respectivamente as técnicas de PCR e “Nested – PCR” observaram uma prevalência do DNA do HPV de 98% e de 100%, respectivamente. Em outro estudo realizado por EVANS e colaboradores (2010), a presença do DNA/HPV foi investigada pela técnica de PCR em 45 pacientes que apresentavam diagnóstico de ASC-US, LSIL e HSIL sendo encontradas 91,1% (41/45) das amostras positivas para o DNA do vírus. Em um estudo realizado em mulheres no Distrito Federal, Brasil, que apresentavam lesões cervicais pré-neoplásicas e neoplásicas diagnosticadas através de esfregaços citológicos, o DNA de HPV foi detectado em 62% das amostras, através da utilização da técnica de PCR com os oligonucleotídeos MY09/MY11 (CAMARA *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, observamos a positividade para o DNA/HPV em 81%, das pacientes com ASC-US enquanto que nos casos de ASC-US sugestivo da infecção pelo HPV a positividade aumentou para 90%. CARMO e colaboradores (2004), também encontraram 80% dos casos de ASC-US positivos para o DNA/HPV. Num estudo realizado por COX e colaboradores (1992), observou-se 41% de positividade para o DNA/HPV entre os 89 casos de ASC-US analisados, enquanto WRIGHT e colaboradores (1995), detectaram o DNA do HPV em 59% (128 de 217) das amostras estudadas. Num estudo realizado por esse mesmo grupo em 1998, os dados mostraram positividade para o DNA/HPV nos casos de ASC-US em 71% das amostras (WRIGHT *et al.*, 1998). CHOI e colaboradores (2013) observaram uma positividade para o DNA/HPV nos casos de ASC-US de 70,6% (36 de 51 amostras).

Com relação aos casos de LSIL, nossos dados mostraram que o DNA/HPV foi detectado em 87% dos casos, enquanto que naqueles casos de LSIL com alterações sugestivas ou compatíveis com a infecção pelo HPV, a positividade para o DNA/HPV foi observada em 94% e 93% dos casos respectivamente. Nossos dados foram semelhantes ao encontrado por WRIGHT e colaboradores (1998), e CAVALCANTI e colaboradores (2000) que detectaram o DNA/HPV em 86% dos casos de LSIL. Já no estudo realizado por GUGLIELMO e colaboradores (2012), que examinaram 60 pacientes cujo diagnóstico citológico apresentava alterações sugestivas da infecção pelo HPV, detectaram pela técnica do PCR o DNA/HPV em 73,3% dos casos. Em estudo bem recente, CHOI e colaboradores (2013) detectaram o DNA/HPV em 93,5% (36 de 51) das amostras de LSIL.

Em nosso estudo, quando analisamos a prevalência da infecção pelo HPV em amostras de HSIL, observamos a presença do DNA/HPV em 100% das amostras. Vários estudos demonstram uma prevalência do DNA/HPV em amostras de HSIL, variando de 89% à 93% (WRIGHT *et al.*, 1998; CARRILLO, *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2013). Um estudo de meta-análise realizado por CLIFFORD e colaboradores (2003) mostrou o DNA/HPV foi detectado em 84,2% dos 4338 casos diagnosticados como HSIL, sendo que 34,1% dos casos correspondiam a amostras histológicas enquanto 65,9% eram amostras de citologia esfoliativa.

No presente estudo ao realizar a investigação da presença do DNA do HPV em comparação à expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV, constatamos que a expressão de MCM7 mostrou-se bastante associada à presença do DNA/HPV.

Em trabalho anterior realizado em nosso grupo por LOBATO e colaboradores (2012), investigando a associação entre a imunoreatividade de MCM7 e a infecção pelo HPV, verificou-se uma correlação positiva entre a expressão desse biomarcador e a presença do DNA viral ($P < 0.05$ – Coeficiente de Correlação de Spearman). ZAMORA e colaboradores (2009) ao analisarem a expressão de ProExC (MCM2/TOP2A) em 100 amostras cervicais, obtidas por conização ou histerectomia (21 normais e 79 com alterações de grau variados), em associação com a presença do DNA/HPV de alto risco, observaram 60% de positividade para o DNA/HPV naquelas amostras que expressaram o marcador ProExC além do terço inferior do epitélio. Como já citado anteriormente, o estudo realizado por BRAKE e colaboradores (2003) investigou o padrão de expressão de MCM7 em tecidos cervicais obtidos de pacientes humanos, e de camundongos transgênicos com elevada expressão da proteína E7 do HPV 16. No modelo murino, MCM7 foi altamente expressa tanto em lesões de

alto grau quanto em tumores cervicais induzidos pela oncoproteína E7, exibindo um padrão de expressão muito similar àquele observado na doença cervical humana. Em estudo *in vitro*, KUKIMOTO e colaboradores (1998) concluíram que a ligação da proteína E6 do HPV 16 à porção C-terminal de MCM7, poderia ser capaz de promover distúrbios no mecanismo de licenciamento celular, causando anormalidades cromossômicas nas células, possivelmente semelhantes às encontradas em células humanas que expressam a proteína E6 do HPV.

Sabe-se que a integração do DNA de HPVs de alto risco oncogênico ao genoma da célula hospedeira, leva à instabilidade genética que por sua vez altera o ciclo celular (KADAJA *et al.*, 2007; COLEMAN *et al.*, 2012). Entretanto, elevada expressão das proteínas MCMs é observada em lesões intraepiteliais precursoras do câncer uterino, onde ainda não haveria ocorrido o evento de integração do DNA viral. Portanto é razoável concluir que outras alterações na fisiologia da célula que antecedem a integração do genoma do HPV, poderiam contribuir para a indução da expressão das MCMs.

Uma importante questão surge acerca dos resultados da análise da expressão de MCM7 e L1 observadas nesse trabalho, em associação com a infecção pelo HPV. Propusemos nesse estudo uma avaliação baseada no trabalho desenvolvido por YOSHIDA e colaboradores (2008), da expressão de ambas as proteínas, dentre as amostras positivas para a presença do DNA/HPV, de forma que os casos fossem categorizadas em 4 grupos: (i) MCM7 (-) / L1 (-): nesse padrão considera-se que o DNA viral está presente, entretanto não haveria replicação viral nem alteração do ciclo celular, inferindo que a infecção seria do tipo latente e estaria num estágio não displásico; (ii) MCM7 (-) / L1(+): padrão onde o DNA viral está presente e o vírus em atividade produtiva de novas cópias, mas sem alteração do ciclo celular, indicando que a lesão seria do tipo produtiva e não displásica; (iii) MCM7 (+) / L1(+): esse padrão indica a presença do DNA viral com o vírus em fase produtiva associada à alteração do ciclo celular; (iv) MCM7 (+) / L1(-): esse padrão é indicativo de infecção viral latente, ou integração do DNA do HPV no genoma da célula hospedeira, com alteração do ciclo celular causando aumento da expressão de MCM7, especialmente na ocorrência do evento de integração.

Como já descrito na literatura e citado no presente trabalho, pacientes com expressão aumentada de MCM7 teriam supostamente maior probabilidade de progressão das lesões malignas e pior prognóstico em vários tipos de câncer (HIRAIWA *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1998; FREEMAN, *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009). Além disso, nos casos de lesões cervicais

especificamente associadas à infecção pelo HPV, a ausência de expressão da proteína L1/HPV está fortemente associada àqueles casos com maior probabilidade de progressão das lesões (MELSHEIMER *et al.*, 2003; LEE, *et al.*, 2008; LI YU *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2010; SARMADI *et al.*, 2012).

A análise combinada da expressão de ambas as proteínas em 4 perfis foi capaz de separar as amostras em 2 grupos, relacionados às LBG ou às LAG. Nossa análise mostrou, que 75% das amostras testadas ficaram dentro do grupo que apresentaram os padrões de marcação MCM7- / L1- e MCM7- /L1 +. Esse seria o grupo com melhor prognóstico, visto que a ausência da expressão de MCM7 seria um indicativo de que o ciclo celular não estaria alterado, mesmo na presença da infecção pelo HPV. De fato, dentro desse grupo observamos a maioria das amostras de ASC-US e LSIL. Esse resultado está de acordo com dados da literatura, que já demonstraram que as lesões do tipo ASC-US e LSIL teriam maior probabilidade de regressão, e não de progressão (BARASSO *et al.*, 1999; HAUSEN *et al.*, 2002; SANKARANARAYANAN *et al.*, 2004, WHO 2008).

O outro grupo foi representado por aquelas amostras que apresentaram os padrões de marcação MCM7+ / L1 + e MCM7 + / L1 -. Essas amostras corresponderam a 25% dos casos estudados. Para esse grupo seria esperado um pior prognóstico das lesões, visto que a expressão aumentada de MCM7 seria um indicativo de alteração no ciclo celular. Vale a pena ressaltar que 100% das nossas amostras de LAG ficaram dentro desse grupo, o que confirma a nossa hipótese. O pior perfil de marcação, ou seja, MCM7 + / L1 -, foi observado em 6,2% das nossas amostras, sendo que dessas, 2 correspondiam a amostras de ASC-US, e 2 à lesões de baixo grau (LBG), além de 4 das 6 lesões de alto grau (LAG). Baseados em nossa interpretação, esses casos seriam indicativos daquelas pacientes que poderiam apresentar alterações no ciclo celular, além de infecção pelo HPV do tipo não produtiva, possivelmente relacionada ao evento de integração do genoma viral.

Esses dados poderiam supostamente selecionar, dentre as pacientes avaliadas nesse estudo, aquelas com maior probabilidade de apresentarem evolução das lesões iniciais. Um estudo de progressão com essas pacientes seria necessário para acompanhar tal evolução.

Conclui-se, portanto, no presente estudo, que a análise combinada da expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV, as qualificam como biomarcadores de severidade das lesões cervicais, associadas ao Papilomavírus humano. A utilização da marcação dessas proteínas pela técnica de ICC poderia complementar os métodos de diagnóstico citológico, nos casos de ASC-US e lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) auxiliando na identificação das lesões

com uma tendência à progressão, contribuindo assim para a melhoria da qualidade dos programas de rastreamento das lesões precursoras do câncer cervical.

- No presente estudo verificou-se uma correlação entre a expressão de MCM7 e a severidade dos grupos de lesão, com maior expressão da proteína nos de HSIL.
- Em comparação à expressão da proteína MCM7, observou-se maior frequência de positividade da proteína L1 do HPV nos casos de ASC-US e LSIL.
- Nesse estudo, verificou-se que a análise conjunta da expressão das proteínas MCM7 e L1 do HPV, mostrou-se um satisfatório biomarcador para as lesões do tipo ASC-US e LSIL, podendo ser útil para identificar e distinguir aquelas lesões que teriam maior potencial de evolução para grau mais avançados.
- Observou-se a detecção do DNA do HPV em todos os grupos de amostras analisados, com positividade acima de 80% em cada grupo.
- Nas amostras cervicais estudadas de ASC-US, LSIL e HSIL a expressão da proteína MCM7, foi significativamente associada à presença do DNA do HPV.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULAFIA O; PEZZULLO, J.C; SHERER, D.M. **Performance of ThinPrep liquid based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey.** *Gynecol. Oncol.* 2003; 90: 137-144.

ADAMS, V. *et al.* **Detection and typing of human papillomavirus in biopsy and cytological specimens by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: A method suitable for semiautomation.** *J. Med. Virol.* 1996; 48:161-170.

AGOFF, S.N ; 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.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; *et al.* **Biologia Molecular da Célula.** 5 Ed. São Paulo Artemd Ed. S.A.; 2010.

ALVARENGA, G.C; SÁ, E.M; PASSOS, M.R.L. **Papilomavírus humano e carcinogênese no colo uterino.** *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis.* 2000; (12)1: 28-38.

ANDERSSON, S; WANGSA, D; FLORES-STAINO, C; *et al.* **Expression of p16INK4a in relation to histopathology and viral load of 'highrisk' HPV types in cervical neoplastic lesions.** *Eur J Cancer.* 2006; 42(16):2815-2820.

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.

AVI, A.L.R.O; HELIO MASSAIOCHI TANIMOTO, H.M; CARLOS DEYVER DE SOUZA QUEIROZ, C.D.S; *et al.* **Neoplasia de boca e orofaringe: um estudo transversal na Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos, Brasil.** *Rev Odontol UNESP.* 2012; 41(4): 273-280.

BALDWIN, P; LASKEY, L; COLEMAN, N. **Translational approaches to improving cervical screening.** *Nature reviews – cancer* 2003; 3: 217-226.

BARCELOS, A.C.M.; MICHELIN, M.A.; ADAD, S.J.; *et al.* **Atypical squamous cells of undetermined significance: Bethesda Classification and association with Human Papillomavirus.** *Infections Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2011; v (2011):1-9.

BAUER, H.M. *et al.* **Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method.** *JAMA, Chicago.*1991; 265: 472-477.

BECCATI,M.D; BURIANI,C ;MASSIMO PEDRIALI,M;*et al.* **Quantitative Detection of Molecular Markers ProEx C (Minichromosome Maintenance Protein 2 and Topoisomerase IIa) and MIB-1 in Liquid-based Cervical Squamous Cell Cytology.** *Cancer (Cancer Cytopathology)* 2008; 25(114): 3:196-203.

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.

- BERGANT, M.M; OZBUN, M.A; CAMPOS, S.K; *et al.* **Human Papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17.** *Traffic.* 2012 Mar; (13) 3:455–67.
- BERNARD,H.U ; BURK,R.D;CHEN,Z; *et al.* **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** *Virology.* 2010; 401(1):70–79.
- BIN,H; RUIFANG, W; RUIZHEN, L; *et al.* **Detention of HPV L1 Capsid Protein and hTERT Gene in Screening of Cervical Cancer.** *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(6): 797-802.
- BLANCHON, S & DEMRET, C. **The Regulatory E2 Proteins of Human Genital Papillomavirus are pro-apoptotic.** *Biochimie.* 2003; 85: 813-819.
- BLOW, J.J & DUTTA, A. **Preventing re-replication of chromosomal DNA.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 June; 6(6): 476–486.
- BOARDMAN, L.A ; KENNEDY, C.M. **Management of Atypical Squamous Cells, Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions, and Cervical Intraepithelial Neoplasia I.** *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2008; 35: 599–614.
- BOLICK, D. R; HELLMAN, D.J. **Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep® Cervical Cancer Screening System.** *Acta Cytol.* 1998; 42: 209-213.
- BOON, M.E; SCHNEIDER, A; HOGEWONING, C.J.A; *et al.* **Penile studies and heterosexual partners: penicospy, cytology, histology, and immunocytochemistry.** *Cancer.* 1988; 61: 1652-9.
- BOSCH, F.X, & MUÑOZ N. **The viral etiology of cervical cancer.** *Virus Res.* 2002; 89; 2:183-90.
- BOSCH, F. X; de SANJOSÉ, S. **Human papillomavirus in cervical cancer.** *Current Oncology Reports.* 2002; 4(2):175-83.
- 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.
- BROWN, D.C & GATTER, K.C. **Ki67 protein: the immaculate deception?** *Histopathology.* 2002; 40(1):2-11.
- BROW, A.J & TRIMBLE, C.L. **New technologies for cervical cancer screening.** *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology.* 2012; 26:233–242.
- BURRY Richard W. **Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research.** Springer Science+Business Media, 2010.
- BYUN, S.W; LEE, A; SUYEON KIM, S; *et al.* **Immunostaining of p16INK4a/Ki-67 and L1 Capsid Protein on Liquid-based Cytology Specimens Obtained from ASC-H and LSIL-H Cases.** *Int. J. Med. Sci.* 2013; 10:1602-1607.
- CAMARA, G.N.L; CRUZ, M.R; VERAS, V.S; *et al.* **Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico.** *Universitas Ciências da Saúde.* 2000; (1) 1: 149-158.
- CASTELLSAGUE, X.F; BOSCH, X.F; MUNOZ. N. **Environmental co-factors in HPV carcinogenesis: Review.** *Virus Research.* 2002; 89: 191- 199.
- CAVALCANTI, S.M.B.; ZARDO, L.G.; PASSOS, M.R.L.; OLIVEIRA, L.H.S. **Epidemiological aspects of Human Papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil.** *J. of Infection.* 2000; 40: 80-87.

- CHEUNG, A.N.Y; SZETO, E.F; FONG, K; *et al.* **Liquid-Based Cytology and Conventional Cervical Smears A Comparison Study in an Asian Screening Population.** *Cancer Cytopathology*.2003; 99 (6): 331-335.
- CHOI, J; PARK,Y.; EUN H.L; *et al.* **Detection and genotyping of human papillomavirus by five assays according to cytologic results.** *Journal of Virological Methods*.20139187): 79– 84.
- CHOW, V.T.K. *et al.* **Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing.** *Pathology, Abingdon*. 2000; 32: 204-208.
- CIBAS, E.S; DUCATMAN, B.S. **Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates.** *Diagnostic Cytopathology*. 1996; 16(2): 193-194.
- CLIFFORD, G.M.; SMITH, J.S., AGUADO, T.; *et al.* **Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis.** *British Journal of Cancer*. 2003; 89(1): 101 – 105.
- COLEMAN N & LASKEY, R.A. **Minichromosome maintenance proteins in cancer screening.** *European Journal of Cancer*. 2009 Sept; (45): 416-8.
- COLOMER, C.M. **Cáncer de cuello de útero: Nuevas perspectivas en la prevención.** *Offarm*. 2008; (27): 5: 120-4.
- CRUM, C.P; CIBAS, E.S; LEE, K.R. **Pathology of early cervical neoplasia:** (In- Contemporary issues in surgical pathology- v 22). New York: Churchill Livingstone, 1997.
- CULP, T.D; BUDGEON, L.R; MARINKOVICH, M.P; *et al.* **Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells.** *J Virol*. 2006; 80(18):8940–50.
- CUZICK J; MEIJER C.J; WALBOOMERS J.M. **Screening for cervical cancer.** *Lancet* 1998; 351:1439–40.
- DAY, P.M; RODEN, R.B; LOWY. *et al.* **The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and th viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains.** *J Virol*. 1998; 72(1):142–50.
- DAY, P.M; KINES, R.C; THOMPSON, C.D; *et al.* **In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection.** *Cell host & microbe*. 2010 Sep; 16; 8(3):260-70.
- DAVEY, D.D; WOODHOUSE, S; STYER, P; *et al.* **Atypical epithelial cells and specimen adequacy: current laboratory practices of participants in the college of American pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytology.** *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2000; 124: 203-211.
- DAVEY, E; BARRATT, A; IRWIG, L; *et al.* **Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review.** *Lancet*. 2006; 367: 122-132.
- DENNY. L. **Cytological screening for cervical cancer prevention.** *Best Practice & Research Clinical: Obstetrics and Gynecology*. 2012; 26: 189-196.

- DEPAMPHILIS, M.L. **Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex.** *Cell Cycle*. 2005; 4 (1): 70–79.
- DE VILLIERS, E.M; FAUQUET, C; BROKER, T.R; *et al.* **Classification of papillomaviruses.** *Virology*. 2004; 324: 17-27.
- DEHN ,D; TORKKO, K.C; SHROYER, K.R. **Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma.** *Cancer*. 2007; 111: 1-14.
- DOORBAR. J; ELY, S; STERLING, J; *et al.* **Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network.** *Nature*. 1991; 352(6338): 824–7.
- DOORBAR, J & STERLING, J.C. **The biology of human papillomaviruses** In STERLING, J.C. & TYING, S.K. (edit), *Human papillomaviruses – clinical and scientific advances Londres*. 2001: 10-23
- DOORBAR, J. **The papillomavirus life cycle: Review.** *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32: 7-15.
- DOORBAR, J. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** *Clinical Science* .2006; 110: 525–541.
- DOORBAR, J. **Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection.** *Disease Markers*. 2007; 23 : 297–313.
- DOORBAR, J; QUINTB, W; BANKSC, L; *et al.* **The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses: Review.** *Vaccine*. 2012; 30: 55– 70.
- D’SOUZA, G; KREIMER, A.R; VISCIDI, R; *et al.* **Case control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer.** *N Engl J Med*. 2007; 356(19): 1944-56.
- DUARTE-FRANCO, E; SCHLECHT, N.F ; PLATT, R.W; *et al.* **Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia.** *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95:1336–43.
- DUNCAN, L; JACOB, S; HUBBARD, E. **Evaluation of p16INK4a as a Diagnostic Tool in the Triage of Pap Smears Demonstrating Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance.** *Cancer (cancer cytopathology)*. 2008; Feb; 25;v 114 (1): 34-48.
- DUTTA, A & BELL, S.P. **Initiation of DNA replication in eukaryotic cells.** *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997; 13: 293-332.
- ENDL E & GERDES J. **The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function.** *Exp Cell Res*. 2000; 257(2): 231-7.
- EVANDER, M.; FRAZER, I.H.; PAYNE, E.; *et al.* **Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses.** *J. Virol*. 1997; 71: 149-56.
- EVANS ,M.F; ADAMSON, C.S; SCHNED, L.M; *et al.* **HPV is detectable in virtually all abnormal cervical cytology samples after reinvestigation of HPV negatives with multiple alternative PCR tests.** *Diagn Mol Pathol*. 2010; Sep; 19(3):144-50.
- FAHEY.M.T; IRVIG, L; MACASKILL P; *et al.* **Meta-Analysis of Pap test accuracy.** *Am. J. Epidemiology*. 1995; 14: 680- 689.

FEHRMANN, F; KLUMPP, D.J; LAIMINS, L.A. **Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation.** *J Virol.* 2003; 77(5):2819-31.

FERENCZY, A .& FRANCO, E. **Cervical-cancer screening beyond the year 2000.** *The Lancet Oncology.* 2001; 2: 27-32.

FIELDS, B.N; KNIPE, D. M.; HOWLEY P. M. **Virology.** 5th Edition Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, ©2007.

FLORES, E.R; ALLEN-HOFFMANN,B.BL; LEE. D; *et al.* **The Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene Is Required for the Productive Stage of the Viral Life Cycle.** *Journal of virology.* 2000, p. 6622–6631.

FLORIN L, SCHAFER, F; SOTLAR, K; *et al.* **Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2.** *Virology.* 2002; 295: 97–107.

FRANCO, E.D; FRANCO, E.L. **Cancer of the Uterine Cervix.** *BMC Women's Health.* 2004; 4 (Suppl. 1):13-23.

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.

GENTHER, S.M; STERLING, S; DUENSING, S; *et al.* **Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle.** *J Virol.* 2003; 77(5): 2832-42.

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.

GIROGLOU, T; FLORIN, L; SCHÄFER, F; *et al.* **Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate.** *J Virol.* 2001; 75(3):1565–70.

GOMPEL, C & KOSS, G.L. **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas.** São Paulo: Manole, 1997.

GONZALEZ, M.A; TACHIBANA, K.K; LASKEY, R.A; *et al.* **Control of DNA replication and its potential clinical exploitation.** *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 135–41.

GRAVITTI, P.E. **The known unknowns of HPV natural history.** *Clin Invest.* 2011; 121(12):4593–4599.

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.

GRIESSER H , SANDER H , HILFRICH R , *et al.* **Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia.** *Anal Quant Cytol Histol.* 2004; 26 (5) :241-5

GROSS, G. E. & BARRASSO, R. **Infecção por papilomavírus humano: atlas clínico de hpv.** Porto Alegre: Artmed, 1999.

GROSS, G. & PFISTER, H. **Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts.** *Medical Microbiology and Immunology.* 2004; 193: 35-44.

GRUPTA, K. P.; BALOCH, W. Z.; BIBBO, M. **Processing liquid-based gynecologic specimens. Comparison of the available techniques.** *Acta Cytologica*. 2001; 45 (6): 995-8.

GUGLIELMO, de Z.; ÁVILA, M.; VEITÍA, D. *et al*. **Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital.** *An. Sist. Sanit. Navar*. 2012; 35 (3): 445-454.

HALBE, H. W. **Tratado de Ginecología**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998.

HANSEN, T; PEDERSEN, H; BRAUNER, V; *et al*. **Control specimens for immunocytochemistry in liquid-based cytology.** *Cytopathology*. 2011; 22: 243–246.

HILDESHEIM, A; REEVES, W.C.; BRINTON L.A. **Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers.** *Int J Cancer*. 1990 May; 15:45(5):860-4.

HILDESHEIM, A & WANG, S.S. **Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review.** *Virus Res* 2002; 89: 229-40.

HILFRICH, R. **HPV L1 Detection as a Prognostic Marker for Management of HPV High Risk Positive Abnormal Pap Smears.** In: DAVY VANDEN BROECK (Ed.) *Human Papillomavirus and Related Diseases From Bench to Bedside A Diagnostic and Preventive Perspective*: InTech, 2013 Apr; 95-119.

HIRAIWA, A; FUJITA, M; NAGASAKA, T; *et al*. **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.

HO, G.Y; BURK, R.D; KLEIN, S; *et al*. **Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia.** *Journal of the National Cancer Institute*, 1995 ; 87:1365-1371.

HODA, R.S; LOUKERIS, K; ABDUL-KARIM, F. **Gynecologic Cytology on Conventional and Liquid-Based Preparations: A Comprehensive Review of Similarities and Differences.** *Diagnostic Cytopathology*. 2012; 41(3): 257-279

HORVATH, C.A.J; BOULET, G.A.V; RENOUX, V.M; *et al*. **Mechanisms of cell entry by human papillomavirus: an overview.** *Viol*. 2010; 20 (7): 2-9.

HUTCHINSON, M.L; ISENSTEIN, L.M.; GOODMAN, A; *et al*. **Homogeneous sampling accounts for the increased diagnostic accuracy using the Thin Prep processor.** *American Journal of Clinical Pathology*. 1994; 101: 215-9.

IARC. Working group on the evaluation of cancer. **Preventive strategies for cervix cancer screening.** Lyon: IARC Press. IARC Handbooks of Cancer Prevention, 2005 .Vol. 10.

ISHIMI Y. **A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex.** *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 24508–24513.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2011, 35-37.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Estimativa 2014: Estimativa de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2014.

ISAACSON, W. E; WANG, Q; ROBERTS, I; *et al.* **Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7 deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression.** *J Virol.* 2012; 86(11):6358–64.

IWASAWA, A. *et al.* **Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction.** *Obstetr. Gynecol.* 1997; 89: 81-84.

JENKINS. D. **Histopathology and cytopathology of cervical cancer.** *Disease Markers.* 2007; 23: 199–212.

JO H & KIM, J.W. **Implications of HPV infection in uterine cervical cancer.** *Cancer Therapy.* 2005; 3: 419-434.

JOHNSON, K.M; KINES, R.C; ROBERTS, J.N; *et al.* **Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus.** *J Virol.* 2009; 83(5):2067–74.

JORDÃO, A.V; RUGGERI, L.S; CHIUCHETA, G.I.R; *et al.* **Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano.** *J. Bras. de Patol. e Med. Laboratorial.* 2003; 39: 81-89.

JURIE, D; MAHOVLIE, V; RAJHVAJN, S; *et al.*; **Liquid-based cytology- New possibilities in the diagnosis of cervical lesions.** *Coll Antropol.* 2010; (34) 1: 19-24.

KLAES,R; FRIEDRICH, T; SPITKOVSKY,D; *et al.* **Overexpression of p16ink4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri.** *Int. J. Cancer.* 2001; 92: 276–284.

KIRNBAUER, R; BOOYT, F; CHENGT, N. *et al.* **Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic.** *Proc. Nati. Acad. Sci.*1992; 89: 12180-12184.

KURMAN, R.J. **Blaustein's pathology of the female genital tract.** 5^a Ed. Baltimore, USA. *Springer.* 2002.

KURMAN, R.J & SOLOMON, D. **The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses - Definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy.** New York: *Springer,* 1994.

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.

LEE, S.J; LEE,A.W; KANG, C.S; *et al.* **Clinicopathological Implications of Human Papilloma Virus (HPV) L1 Capsid Protein Immunoreactivity in HPV16-Positive Cervical Cytology.** *Int. J. Med. Sci.* 2014; 11 (1): 80-86.

LEVI, F; RANDIMBISON, L; LA VECCHIA, C. **Second primary cancers after in situ and invasive cervical cancer.** *Epidemiology* 2001; 12: 281–2.

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.

LINDER, J; ZAHNISER, D. **The ThinPrep® Pap test – a review of clinical studies.** *Acta Cytol.* 1997; 41: 30-38.

LOBATO, S; TAFURIA, 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

LONGWORTH, M.S & LAIMINS, L.A. **Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun; 68(2): 362-72.

LORENZATO, F.R, SINGER, A; HO, L; *et al.* **Human papillomavirus detection for cervical cancer prevention with polymerase chain reaction in self-collected samples.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2002; 186(5): 962–968.

Louis-Jacques V B. P16INK4a immunocytochemistry/immunohistochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. Review Article *Annals of Diagnostic Pathology* 16 (2012) 422–426

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

MANOS, M. M. *et al.* **The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses.** *Cancer Cell.* 1989; 7: 209-214.

MANOS, M.M; KINNEY, W.K; HURLEY, L.B; *et al.* **Identifying women with cervical neoplasia: Using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results.** *The Journal of the American Medical Association.* 1999; 281: 1605-1610.

MCMILLAN, N.A.; PAYNE, E.; FRAZER, I.H; *et al.* **Expression of the alpha 6 integrin confers papillomavirus capsid binding upon receptor-negative B-cells.** *Virology.* 1999; 261: 271-9.

MCMURRAY, H.R; NGUYEN, D; WESTBROOK, T.F; *et al.* **Biology of human papillomaviruses.** *Int J Exp Path.* 2001; 82: 15-33.

MCGOOGAN, E. **Cell preparation methods and criteria for sample adequacy.** *Acta Cytol.* 1998; 42: 25-32.

MEISELS, A & MORIN, C. **Cytopathology of uterus.** Chicago: ASCP Press, 1997.

MELÓN, S; ALVAREZ-ARGÜELLES, M; OÑA, M. D. **Molecular Diagnosis of Human Papillomavirus Infections** In: DAVY VANDEN BROECK (Ed.) *Human Papillomavirus and Related Diseases From Bench to Bedside A Diagnostic and Preventive Perspective:* InTech, 2013 Apr; 95-119.

MELNIKOW, J, NUOVO, J, WILLAN, A.R; *et al.* **Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis.** *Obstetrics and Gynecology.* 1998; 92: 727-735.

MELSHEIMER, P ; KAUL, S ; DOBECK, S; *et al.* **Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1-DNA.** *Acta Cytologica.* 2003 Apr; 47(2); 124-128.

MINISTÉRIO DA SAÚDE / INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, **Viva Mulher. Programa Nacional de Controle do Câncer do colo de útero – Manual informativo,** Rio de Janeiro, 1997.

MOTOYAMA, S; LADINES-LLAVE, C.A; LUIS VILLANUEVA, S; *et al.* **The role of human Papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis.** *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(1-2): 9-19.

MUKHERJEE, G; MURALIDHAR, B; BAFNA, U.D; *et al.* **MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India.** *British Journal of Cancer.* 2007; 96 : 1107 – 1111.

MUÑOZ ,N & BOSCH, F.X. **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** *New England Journal of Medicine;* 2003; 348: 348-518.

MÜNGER, K. **The role of human papillomaviruses in human cancers.** *Front Biosci.* 2002; 7: 641-9.

MURPHY, N; HEFFRON, C.C. B. B ; KING, B ; *et al.* **P16INK4A positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem.** *Virchows Archiv.* 2004; 445(6): 610-615,

NEGRI, G; BELLISANO; G ZANNONI, .G.F; *et al.* **p16ink4a and HPV L1 Immunohistochemistry is Helpful for Estimating the Behavior of Low-grade Dysplastic Lesion of the Cervix Uteri.** *Am J Surg Pathol* 2008; 32 (11): 1715-1721.

NELSON, J.H. *et al.* **A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples.** *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 : 688-695.

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.

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.

PARIKH, S; BRENNAN, P; BOFFETTA, P. **Meta –analys of social inequality and the risk of cervical cancer.** *Int. J. Cancer.* 2003 (105): 687-691.

PARRY, D; BATES, S; MANN, D.J; *et al.* **Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product.** *EMBO J.* 1995: 14(3):503-11.

PEREZ, L.A. **Genital HPV: links to cervical cancer, treatment, and prevention.** *Clin Lab Sci.* 2001; 14(3):183-6.

PINTO, A.P; DEGEN, M; VILLA, L.L. **Immunomarkers in Gynecologic Cytology: The Search for the Ideal ‘Biomolecular Papanicolaou Test.** *Acta Cytologica.* 2012; 56: 109–121.

PROKHOROVA, T.A & BLOW, J.J. **Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity.** *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 2491–2498.

QUEIROZ, C; SILVA, T.C; ALVES, V.A; *et al.* **Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions.** *Pathol Res Pract.* 2006: 202(10):731-7.

- RAUBER, D; MEHLHORN, G; FASCHING, P.A ; *et al.* **Prognostic significance of the detection of the human papillomavirus L1 protein in smears of mild HPV L1 Detection as a Prognostic Marker for Management of HPV High Risk Positive Abnormal Pap Smears to moderate cervical intraepithelial lesions.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 Oct; 140(2):258-62.
- REMUS, D; BEURON, F; TOLUN, G; *et al.* **Concerted loading of MCM2-7 double hexamers around DNA during DNA replication Origin Licensing.** *Cell.* 2009; 139 (4): 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.
- RENSHAW, A. A; MODY, R.D.; MOLLY, W; *et al.* **The significance of certification in liquid-based cytology and performance in the College of American pathologists interlaboratory comparison program in cervico vaginal cytopathology.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 2006; 130: 1269-1272.
- RICHART. R.M.; **Natural history of cervical intraepithelial neoplasia,** *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1968 (41) :Issue 6; 1343-1353.
- RICHART, R.M. **Cervical intraepithelial neoplasia,** *Pathol Annu.* 1973 (8): 301–328.
- RODEN,R.B ; DAY, P.M ; BRONZO,B.K.; *et al.* **Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection.** *J Virol.* 2001; 75(21): 10493-10497.
- RÓLON, P.A. *et al.* **Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay.** *Int. J. Cancer.* 2000; 85 : 486-491.
- ROWLES, A; TADA, S; BLOW, J.J. **Changes in association of the Xenopus origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins.** *J. Cell Sci.* 1999; 112 : 2011–2018.
- RUNOWICZ, C. D. **Molecular screening for cervical cancer—time to give up Pap tests?** *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 1650–1653.
- SAHEBALI.; DEPUYDT, C.; SEGERS, K.; *et al.* **Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool?** *J. Clin. Pathol.* 2003; 56:681-686.
- SAKAGUCHI, M; FUJII, Y; HIRABAYASHI, H; *et al.* **Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study.** *Int J Cancer.* 1996; 65(4):442-5.
- STOEBER, K; HALSALL, I; FREEMAN A; *et al.* **Immuno-assay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine.** *Lancet.* 1999; 354: 1524-1525.
- SAPP, M; BIENKOWSKA-HABA, M. **Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus.** *FEBS J.* 2009; 276(24):7206–16.
- SARMADI, S; IZADI-MOOD, N; POURLASHKAR, M. *et al.* **HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome.** *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 285: 779–784.
- SCHELHAAS, M; SHAH, B; HOLZER, M; *et al.* **Entry human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft independent endocytosis.** *PLoS Pathog.* 2012; 8(4).
- SCHILLER, J.T; DAY, P.M; KINES, R.C. **Current understanding of the mechanism of HPV infection.** *Gynecol Oncol.* 2010;118(Suppl 1):12–7.

SCHIFFMAN, M.H. & BRINTON. **Cervical cancer**. In: Schottenfeld, D., & Fraumeni, J.F., Jr (Eds). *Cancer epidemiology and prevention*. New York: Oxford University Press, 1996; 1090-116.

SCHIFFMAN M & KJAER, S.K. Chapter 2: **natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia**. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 14-9.

SCHLÜTER, C; DUCHROW, M; WOHLBERG, C; *et al*. **The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle maintainin gproteins**. *J Cell Biol*. 1993 Nov; 123(3):513-22.

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.

SCHNEIDER, A; MEINHARDT, G; de-VILLERS, E.M; *et al*. **Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hibridization studies**. *Diag. Citopathol*. 1997;3 : 250-255.

SCHOLZEN, T;& GERDES, J. **The Ki-67 Protein: from the known and the unknown**. *J Cell Physiol*. 2000; 182: 311-322.

SELLORS, J.W; JAMES, B. M ; KACZOROWSKI, J. *et al*. **Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada**. *Canadian Medical Association Journal*. 2000; 163: 503-508.

SHLAY, J.C; DUNN, T; BYERS, T; *et al*. **Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 using risk assessment and human papillomavirus testing in women with atypia on papanicolaou smears**. *Obstetrics Gynecology*. 2000; 96: 410-416.

SIDDIQUI, M .T; HORNAMAN, K; COHEN, C. *et al*. **ProExC immunocytochemistry and high-risk human papillomavirus DNA testing in Papanicolaou tests with atypical squamous cell (ASC-US) cytology: Correlation study with histology biopsy**. *Arch Pathol. Lab. Med*. 2008; 132 : 1648-1652.

SILVA, A.M.T.C; AMARAL, M.V.T; CRUZ, A.D. **HPV e Câncer: o papel do papiloma vírus humano na carcinogênese**. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 2002; 29 : 48-54.

SILVA, A.R & ZUCOLOTO, S. **A família do p53: aspectos estruturais e funcionais do p73 e do p63**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*.2003; (39)2 :179-84.

SMITH, J.H.F. **Cytology, liquid-based cytology and automation**. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2011; 25 : 585–596.

SOLOMON, D & NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal- Definições, Critérios e Notas Explicativas**. Segunda edição. Rio de Janeiro: Copyright© 2005 – Livraria e Editora Revinter Ltda. 192pg .

SPITZER M. **Cervical screening adjuncts: recent advances**. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:544 –56.

STANLEY, M.A. **Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus.** *Clin. Microbiol: Review.* 2012; 25(2):215-22.

STOLER, M.H. **Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis.** *Int J Gynecol Pathol .* 2000; 19: 16-28.

STOREY, A; PICCIN, A; ROMANOS, M, *et al.* **Regulation of human papillomavirus type 16 DNA replication by E2, glucocorticoid hormone and epidermal growth factor.** *J Gen Virol .* 1997; 78(8): 1963–70.

SURVILADZE, Z; DZIDUSZKO, A; OZBUN, M.A. **Essential roles for soluble virion associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections.** *PLoS Pathog* 2012; 8(2): 1002519.

TACHIBANA. K.E; GONZALEZ, M.A; COLEMAN, N. **Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology.** *J Pathol.* 2005; 205: 123–9.

TERMINI, L & VILLA, L.L. **Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino.** *DST – J bras Doenças Sex Transm .* 2008; 20(2): 125-131.

TEZUKA, F; OIKAWA, H; SHUKI, H; *et al.* **Diagnostic efficacy and validity of the ThinPrep method in cervical cytology.** *Acta Cytol.* 1996; 40 : 513-518.

THE INSTITUTE FOR MOLECULAR VIROLOGY. Disponível em: <http://www.virology.wisc.edu/>. Acesso em 20 Ago. 2013.

TYRING, S.K. **Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response.** *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43(2): 18-26.

THOMISON, J.R.D; THOMAS, L. K; SHROYER, K. R. **Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma.** *Hum Pathol.* 2008; 39(2):154-66.

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.

UNGUREANU, C; SOCOLOV, D; ANTON, G; *et al.* **Immunocytochemical expression of p16INK4a and HP L1 capsid proteins as predictive markers of the cervical lesions progression risk.** *Rom J Morphol Embryol.* 2010; 51(3): 497-503.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA. Disponível em: http://www.colon.it/Condilomi_anali.html. Acesso em 02 Nov. 2013.

VELASCO, J. Citologia líquida. **VPH Hoje.** 2001 (1): 8-9.

VILLIERS, E.M. MICHELE, E; CLAUDE, F; *et al.* **Classification of papillomaviruses.** *Virology.* 2004; 324 : 17-27.

VLAHOS, N.P; DRAGISIC, K.G; WALLACH E.E; *et al.* **Clinical significance of the qualification of atypical squamous cells of undetermined significance: an analysis on the basis of histologic diagnoses.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2000; 182: 885-890.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, *et al.* N. **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** *J. Pathol.* 1999; 189 : 12-19.

WEAVER, B.A; FENG, Q; HOLMES, K. K; *et al.* **Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of Human papillomavirus DNA in men.** *Journal Infectious Diseases.* 2004; 189: 677-685.

WEINTRAUB, J & MORABIA. A. **Efficacy of a liquid-based thin layer method for cervical cancer screening in a population with a low incidence of cervical cancer.** *Diag. Cytopathol.* 2000; 22: 52-59.

WHITE, E.A & HOWLEY, P.M. **Proteomic approaches to the study of papillomavirus–host interactions.** *Virology.* 2013; 435: 57–69.

WILLIAMS, M.L; RIMM, D.L; PEDIGO, M.A. *et al.* **Atypical squamous cells of undetermined significance: correlative histologic and follow-up studies from an academic medical center.** *Diagnostic Cytopathology.* 1997; 16: 1-7.

WILLIAMS, G.H; ROMANOWSKI, P; MORRIS, L; *et al.* **Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 14932–7.

WHO. **The Health Organization’s Fight Against Cancer: Strategies that Prevent. Cure and Care.** 2007.

WOODMAN, C.B; COLLINS, S; WINTER, H; *et al.* **Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study.** *Lancet.* 2001; 357: 1831-6.

WOODMAN, C.B.J; COLLINS, S.I; YOUNG, L.S: **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues.** *Nat Rev Cancer.* 2007; 7 :11-22.

WRIGHT, T.C.; ATTILA, A.L.,. FERRIS, D.G., **Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Papanicolaou smears.** *Am J Obstet Gynecol.* 1998; (178):5: 962 -966.

XIAO, W; BIAN, M; MA, L; *et. al.* **Immunochemical Analysis of Human Papillomavirus L1 capsid protein in liquid-based cytology samples from cervical lesions.** *Acta Cytologica Gynecol. Cytopathology.* 2010; 54(3): 661-667.

YANAGI, K; MIZUNO, T; YOU, Z; *et al.* **Mouse geminin inhibits not only Cdt1–MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity.** *J. Biol. Chem.* 2002(277): 40871–40880ZHENG, Z.M & BAKER, C.C. **Papillomavirus genome structure, expression, and posttranscriptional regulation.** *Front Biosci.* 2006 (11): 2286-302.

YOSHIDA,T; FUKUDA,T; TAKAANKI, S; *et al.* **Usefulness of Liquid-Based Cytology Specimens for the Immunocytochemical Study of p16 Expression and Human Papillomavirus Testing A Comparative Study Using Simultaneously Sampled Histology Materials.** *Cancer cytopathology.* 2004 :25(102) n°2:100-109.

YOSHIDA,T; SANO,T; KANUMA, T; *et al.* **Immunochemical Analysis of HPV L1 Capsid Protein and p16 Protein in Liquid-based Cytology Samples From Uterine Cervical Lesions.** *Cancer cytopathology.* 2008(25); 114 (2): 83-89.

YUAN-YING, M; CHENG X.D; , ZHOU C.Y; *et al.* **Value of P16 expression in the triage of liquid-based cervical cytology with atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions.** *Chinese Medical Journal* 2011;124(16):2443-2447.

YU, L; WANG,L; ZHONG, J; *et al.* **Diagnostic Value of p16INK4A, Ki-67, and Human Papillomavirus L1 Capsid Protein Immunochemical Staining on Cell Blocks From Residual Liquid-Based Gynecologic Cytology Specimens.** *Cancer Cytopathology* .2010 (25):47-56.

ZUR HAUSEN, H & de VILLIERS, E.M. **Human Papillomaviruses.** *Annu. Rev. Microbiol.* 1994 (48): 427- 47.

ZUR HAUSEN, H. **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nature Reviews*; 2002(2): 342-350.

ZUR HAUSEN H. **Papillomaviruses in Human Cancer.** *Proc Assoc Am Physicians.* 2003; 111 (6): 581-587.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do COEP (Enviado por e-mail em SET/2009)

O COEP/UFMG analisou o projeto de pesquisa CAAE - 0375.0.203.000-09 e decidiu colocá-lo em diligência.

Parecer do processo ETIC –0375.0.203.000-09 Data da entrada no COEP: 11/08/2009

Projeto: Expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular em lesões intra-epiteliais cervicais e sua correlação com os tipos de HPVs de alto risco

Autores: Annamaria Ravara Vago; Soraya Lobato Charmon

Unidade: Departamento de Morfologia ICB/UFMG

Documentos apresentados:

Carta de encaminhamento do projeto ao COEP

Protocolo de pesquisa

Folha de rosto

Parecer substanciado – Departamento de Morfologia ICB/UFMG

Curriculum vitae – plataforma lattes

Orçamento financeiro - FAPEMIG

Referências Bibliografias

TCLE

Carta de anuência da responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica onde o material esta armazenado; protocolo de empréstimo do material

Início da pesquisa: agosto de 2009

Término da pesquisa: agosto de 2013

Objetivos: Avaliar a expressão de proteínas do ciclo celular (como p16 e Ki67) em lesões intra-epiteliais cervicais e no Câncer Cervical, e sua correlação com a persistência da infecção por HPVs de alto risco.

Metodologia: Serão analisadas 150 amostras de biópsias ou CAF de colo do útero coletadas por ginecologistas do Serviço de Patologia do Colo da URS (PAM) Sagrada Família e que se encontram em blocos de parafina e que se encontram sob a guarda do Dr. Alexandre Tafuri. As 150 amostras serão divididas 5 grupos de 30 amostras segundo o tipo de lesão: NIC I, II, III, carcinoma invasor e controle. Não existe seleção por idade da mulher mas o material deve ter sido colhido entre 2006 e 2008. Serão obtidos 2 fragmentos para a extração do DNA e amplificação do DNA e verificação da prevalência da infecção por HPV através da utilização do PCR. Após a identificação das amostras com HPV pelo PCR será avaliada a tipagem do HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58). A expressão das proteínas do ciclo celular (p16 e Ki-67) será analisada por meio da técnica de imunofluorescência indireta.

Parecer: O estudo é de grande relevância principalmente por estudar o câncer de colo do útero e sua associação com o HPV, ainda fator de grande mortalidade e morbidade em nosso meio. Esta plenamente justificado pela literatura apresentada e faz parte de um grupo de outros estudos estão sendo propostos pela pesquisadora principal, que tem grande experiência com as técnicas que serão utilizadas. Quase todos os documentos e termos de anuência necessária estão presentes, mas falta a anuência dos responsáveis pela URS Sagrada Família. Não existem riscos e os benefícios são evidentes mesmo individuais, pois a determinação da expressão de uma proteína reguladora de um grupo de HPVs oncogênico pode influenciar na terapia a ser adotada. O TCLE esta em linguagem que possibilita a compreensão pelos sujeitos do estudo, mas não esta informado se os resultados serão disponibilizados para as pacientes ou seus médicos. Somos portanto, SMJ, pela colocação do estudo em diligência para que seja solicitado:

- 1- Carta de anuência dos responsáveis pela URS Sagrada Família;
- 2- Informar se os resultados serão disponibilizados para as pacientes e ou médicos assistentes.

Belo Horizonte, 25 de Novembro de 2009.

À Profª Maria Teresa Marques Amaral

Coordenadora do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Ao Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Sub-coordenador do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

Prezados Professores,


Vimos apresentar ao COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, o Projeto de Pesquisa intitulado “EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E SUA CORRELAÇÃO COM OS TIPOS DE HPVs (Vírus do Papiloma Humano) DE ALTO RISCO”, a ser desenvolvido sob a Coordenação da Profª Annamaria Ravara Vago no Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

Constitui o objetivo central do presente Projeto, avaliar a expressão de proteínas do ciclo celular (como p16^{INK4a} e Ki-67) em Lesões Intraepiteliais Cervicais e no Câncer Cervical, e sua correlação com a persistência da infecção por HPVs (Vírus do Papiloma Humano) de alto-risco. Para o desenvolvimento do presente Projeto serão analisadas biópsias incluídas em parafina obtidas durante exame histopatológico de rotina, de pacientes atendidas pela Unidade de Referência Secundária Sagrada Família da Prefeitura de Belo Horizonte. É importante ressaltar, que tal exame corresponde a procedimento realizado na rotina do atendimento, não sendo, portanto necessário realizar qualquer exame adicional para o desenvolvimento da presente Pesquisa. Destaca-se ainda que tais amostras encontram-se sob a guarda do Dr. Alexandre Tafuri, do Laboratório de Patologia Tafuri, que corresponde a um dos Laboratórios que atende ao Serviço acima citado para realização do exame histopatológico.

Na ocasião gostaríamos de informar-lhes que o presente Projeto foi aprovado pela Câmara do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG em reunião realizada no dia 03/08/2008. Além disso, o presente Projeto de Pesquisa já foi apreciado pela Coordenação da Atenção à Saúde da Mulher da Secretaria Municipal de Saúde, da Prefeitura de Belo Horizonte, recebendo aprovação, anuência e autorização para sua execução.

Colocando-nos à disposição para os esclarecimentos necessários,

Subscrevemo-nos, respeitosamente,


Prof. Dra. Annamaria Ravara Vago,

Departamento de Morfologia,

Raquel Álvares da Silva Campos

Gerente da Unidade de Referência Secundária (U.R.S.)

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Sagrada Família – S.C.O.M.G.E.R. Leste

Secretaria Municipal de Saúde

Prefeitura de Belo Horizonte (PBH)

e-mail: arvago@icb.ufmg.br

e-mail: urssf@pbh.gov.br

ANEXO 2

Tabela da relação das amostras analisadas no presente estudo, com informações sobre os informes Colposcópicos, Diagnóstico Citológico e Resultados das análises por ICC e PCR

Número	Informes Clínicos	Pacientes com história de lesão anterior	Diagnóstico	Idade	MCM7	L1	DNA/HPV
1	S+, EAB		NIC I/HPV	41	-	-	+
2	NDN		ASC-US/ SUG.HPV	19	+	NR	+
3	Colpite		ASC-US	30	-	NR	+
4	EAB		ASC-US/SUG. HPV	28	-	+	+
5	S+		ASC-US/SUG.HPV	37	AMOSTRA DESCARTADA		
6	Ectopia		NIC I/HPV	19	-	NR	+
7	Ectopia		NIC I/SUG HPV	21	-	+	+
8	NDN		ASC-US	17	-	+	+
9	S+		ASC-US	20	-	-	+
10	NDN		NIC I/SUG. HPV	35	-	-	+
11	NIC?		ASC-US/DL	25	-	NR	-
12	S-		ASC-US	39	-	-	+
13	NDN		NIC I/HPV	23	-	-	+
14	S-	Controle de NIC I	NIC I/HPV	18	-	+	+
15	NDN	Controle de DL/HPV	NIC I/HPV	23	+	+	+
16	S-		ASC-US	35	+	NR	SC
17	S-		NIC II	31	+	-	+
18	S+, EAB		ASC-US	23	-	NR	+
19	S-, EAB	Condiloma vulvar	NIC I /SUG. HPV	23	-	NR	+
20	S+, EAB		NIC I/HPV	19	-	+	-
21	Rotina		NIC I/RARAS	27	-	NR	+
22	S-		ASC-US	57	-	NR	+
23	S-		ASC-US	23	-	+	+
24	Ectrópio		ASC-US	26	-	+	+
25	NDN		NIC I/SUG.HPV	27	+	+	+
26	NDN		NIC I/HPV	20	-	+	+
27	NDN		ASC-US	24	-	+	+
28	S-	Controle de NIC I	NIC I/HPV	38	-	+	+
29	S+, EAB		NIC I/SUG.HPV	20	-	+	+
30	S-		NIC I	40	-	NR	+
31	S-		NICI	32	+	-	+
32	S-	Controle de ASC-US	NIC I/HPV	23	+	+	+
33	NDN		ASC-US/SUG. HPV	38	-	+	+
34	-	Controle de NIC I	ASC-US/SUG. HPV	25	-	+	+

Número	Informes Clínicos	Pacientes com história de lesão anterior	Diagnóstico	Idade	MCM7	L1	DNA/HPV
35	NDN		NIC I/HPV	24	-	NR	+
36	S-, EAB	Controle de NIC II	NIC II/SUG. HPV	31	+	+	+
37	S-		NIC I/SUG. HPV	46	-	-	-
38	NDN		NIC I/HPV	22	-	NR	+
39	-	Controle de NIC I	NIC I/ HPV	22	-	-	+
40	Rotina		NIC I/HPV	22	-	NR	+
41	NDN		ASC-US	58	-	NR	-
42	S-		NIC I/HPV	18	-	-	-
43	S;EAB	CAF(NIC I/NIC II)	ASC-US	24	-	NR	+
44	S+		ASC-US	20	-	NR	+
45	S-		NIC I/SUG. HPV	26	-	NR	+
46	S-		ASC-US	22	-	NR	+
47	NDN		NIC I/SUG. HPV	24	-	-	+
48		Controle de NIC II	NIC I/HPV	44	-	+	+
49	NDN		ASC-US/SUG. HPV	25	+	+	+
50	EAB		NIC I/HPV	27	-	+	+
51	S-		ASC-US	24	-	-	+
52	S-		NICI I/SUG. HPV	22	+	+	-
53	S-		ASC-US/possível LSIL	27	-	-	+
54	S-		ASC-US/SUG. HPV	27	-	NR	+
55	S +		ASC-US/RAR. CELS	29	-	NR	-
56	-	Controle de HSIL	NIC I/SUG. HPV	28	-	+	-
57	S-		ASC-US	15	+	NR	-
58	S+	Controle de NIC I	NIC I/SUG. HPV	31	-	+	+
59	S-		ASC-US/SUG. HPV	30	-	+	+
60	S-		ASC-US	26	-	NR	+
61	NDN		ASC-US	22	-	NR	-
62	-		ASC-US/SUG. HPV	21	-	+	+
63	S-		NIC I	23	-	NR	-
64	Ectrópio		NIC I/HPV	33	-	+	+
65		Controle de NIC I	NIC I	30	-	+	+
66	S-		NIC I/HPV	23	-	-	-
67	S-		ASC-US	17	-	+	+
68	S+, Mosaico	Controle de NIC I	ASC-US/ sugereLSIL	27	-	NR	+
69	NDN		NIC I	50	-	NR	-
70	S-	Controle de Infecção pelo HPV	ASC-US/SUG. HPV	40	-	+	+
71	S-		ASC-US	58	+	+	-
72	S-,ZTT		ASC-US/RAR. CELS	51	-	NR	-
73	S-, ZTT		NIC I/HPV	23	-	NR	+
74	S-	Controle de ASC-US	ASC-US/RAR. CELS	25	-	+	+
75	S +, EAB grau II		ASC-US/SUG. HPV	36	-	NR	-






Número	Informes Clínicos	Pacientes com história de lesão anterior	Diagnóstico	Idade	MCM7	L1	DNA/HPV
76	S-		NIC I/SUG. HPV	35	-	NR	+
77	S-, ZTT		NIC I/SUG. HPV	20	SC – sem ICC		+
78	NDN		ASC-US	26	-	NR	+
79	S-		NIC I	39	-	NR	+
80	Ectrópio		NIC I	26	-	NR	+
81	-	Controle. NIC I/HPV	NIC I/HPV	45	+	+	+
82	Colpite		NIC I/SUG. HPV	24	-	+	+
83	Ectrópio		NIC I/HPV	27	SC- sem ICC		-
84	S-		NIC I/HPV	19	-	NR	+
85	S-, ZTT		NIC I/SUG. HPV	27	-	NR	+
86	S-		NIC I/SUG. HPV	19	SC- sem ICC		+
87	-	Controle de AS-CUS	ASC-US	22	+	-	+
88	S+, ectrópio		ASC-US/SUG. HPV	25	-	+	+
89	S+, AIN		ASC-US	50	-	NR	+
90			ASC-US/SUG. HPV	26	-	-	+
91	NDN		NIC I/SUG. HPV	17	-	NR	+
92	S- Histerec tomia sub-total		NIC I/HPV	21	-	+	+
93	NDN		NIC I/HPV	30	-	+	+
94	-	Controle de ASC-US	ASC-US /SUG. HPV	17	-	+	+
95	S-		NIC I/SUG. HPV	27	-	-	+
96		-	NIC I/HPV (+)	42	-	+	+
97	Colpite		NIC I/HPV	27	+	+	+
98	-		ASC-US	43	-	NR	-
99	S-		ASC-US	63	+	+	+
100	S-	Controle de ASC-US	NIC I	51	-	+	+
101	Ectrópio	Controle de ASC-US	ASC-US/ RARAS	25	-	+	+
102	S-		NIC I/HPV	37	-	SC	SC-
103	-		NIC I/HPV	-	-	+	+
104	S-, ZTT		NIC I/HPV	83	+	+	+
105	-		NIC I/HPV	31	-	+	+
106	S-		NIC I/SUG. HPV	30	+	+	+
107	-		NIC I/SUG. HPV	31	-	+	+
108	EAB, ZTA	Controle de NIC I/HPV	NIC I/HPV	37	-	-	+
109	S-, ZTT	Controle de NIC/HPV	ASC-US	24	-	-	+
110	S-	Controle de infecção pelo HPV	NIC I/HPV (+)	29	-	+	+
111	-		NIC I/HPV	25	+	NR	+
112	-		NIC I/SUG. HPV	22	-	+	+

Número	Informes Clínicos	Pacientes com história de lesão anterior	Diagnóstico	Idade	MCM7	L1	DNA/HPV
113	-		ASC-US	31	-	SC	SC-
114	-		ASC-US	33	-	NR	+
115	-		NIC I/SUG. HPV	27	-	-	+
116	-		ASC-US (NIC?)	34	-	SC	SC-
117	S -		ASC-US	32	+	+	+
118	S +, ZTT		NIC I/HPV	30	+	+	+
119	S+		ASC-US	20	-	SC	SC-
120	S+	HPV VULVAR	NIC I	33	-	+	+
121	S-	Controle de ASC-US	NIC I/HPV	27	-	-	+
122	NDN		NIC I / SUG. HPV	31	+	+	+
123	NDN		ASC-US/ SUG. HPV	22	-	+	+
124	NDN		ASC-US	60	-	NR	-
125	S +, EAB em ZT	Controle de NIC I	NIC I / SUG. HPV	31	+	+	+
126	-	Controle de ASC-US	NIC I/HPV	52	-	-	+
127	S-	Controle de ASC-US	ASC-US	19	-	SC	SC-
128	S-		ASC-US/ SUG. HPV	17	-	-	SC-
129	NDN		NIC I +	20	-	NR	+
130	NDN		NIC I/HPV	29	-	-	-
131	S-, ZTT		ASC-US/ RARAS CÉLULAS	22	-	SC	SC-
132	S-		ASC-US/RARAS CÉLULAS	33	-	+	+
133	-	Controle de NIC I/HPV	NIC I/HPV	16	-	+	+
134	S-		ASC-US	27	-	-	SC
135	S-		NIC I/HPV	21	+	+	+
136	NDN		NIC I/HPV	30	+	+	+
137	S-,ZTT		NIC I/HPV	26	+	+	+
138		-	NIC I/SUG. HPV	26	-	-	+
139	-	Controle de NIC II/III /HPV	NIC I (+)	22	-	NR	+
140			NIC I/HPV	21	-	-	+
141	S-,ZTT		ASC-US RARAS CÉLULAS	16	-	-	+
142	S-, ZTT	Controle de NIC I	NIC I/HPV	22	-	+	+
143	EAB		NIC I/HPV	26	-	-	+
144	S-		NIC I/HPV	24	-	NR	+
145		CAF NIC I E II/ HPV de alto e baixo risco	NIC I/HPV	33	-	+	SC
146	S-		ASC-US /SUG. HPV	19	-	+	+
147	S-		ASC-US /SUG. HPV	38	-	NR	+
148	S-,ZTT		NIC I/SUG. HPV	21	-	-	+
149	S-, ZTT		NIC I/HPV	19	-	NR	+
150			NIC I/SUG. HPV	15	-	+	+
151	S-, ZTT		ASC-US	30	-	SC	+

Número	Informes Clínicos	Pacientes com história de lesão anterior	Diagnóstico	Idade	MCM7	L1	DNA/HPV
152	S-		ASC-US/ RARAS CÉLULAS	30	-	SC	+
153	S-		NIC I/HPV	25	-	+	+
154	S-, ZTT		NIC I/HPV	23	-	-	+
155	-		ASC-US	30	+	-	+
156	-		ASC-US	48	-	-	+
157	S-		NIC I/SUG. HPV	28	-	-	+
158	S+		NIC I/ SUG. HPV	24	-	+	+
159	S-		ASC-US SUG. HPV	20	-	+	+
160		Controle de. NIC II / III /HPV	NIC I/HPV	40	-	-	+
161	S-		ASC-US RARAS CÉLUALS	34	-	+	SC
	-						
162	S-,ZTT		NIC I	23	-	NR	+
163	S-		ASC-US /DL	26	-	-	+
164	S+, EAB, AIC		ASC-US	40	-	NR	+
165	AIC		NIC I/HPV +	54	+	+	+
166	S-	Controle de NIC II	NIC I/HPV	24	-	NR	+
167	-		NIC I	18	-	NR	+
168	S-, ZTT		NIC I/HPV	26	+	+	+
169	-		ASC SUG. HPV	19	-	NR	+
170	-	Controle de infecção pelo HPV	NIC I/ HPV	17	-	+	+
171	S-		NIC I/HPV	27	-	+	+
172	S-		NIC I /HPV	31	-	-	+
173	NDN		NIC I/HPV	18	-	-	+
174	Pontilha do fino		NIC I/NIC II	35	+	+	+
175	EAB	Controle de ASC-US	NIC I/HPV +	30	-	+	+
176	S-		ASC-US	24	-	+	+
177	NDN		NIC II	33	+	-	+
178	NDN		NIC I /HPV	65	-	+	+
179	Schiller manchado		NIC I/HPV	21	-	-	+
180	S-		NIC I/HPV	23	-	+	+
181	S-	Controle de NIC I	NIC I/HPV	46	-	+	+
182	S-		ASC-US	28	-	+	+
183	-		NIC I/HPV (+)	51	-	+	+
184	NDN		ASC-US	26	-	-	+
185		Controle de NIC I /HPV	ASC-US RARAS. CÉLULAS.	22	-	+	+
186					AMOSTRA DESCARTADA		

Número	Informes Clínicos	Pacientes com história de lesão anterior	Diagnóstico	Idade	MCM7	L1	DNA/HPV
187	S-	Controle de NIC I/ HPV	NIC II	18	+	-	+
188	S-		NIC I/HPV	26	-	-	+
189	S-		NIC I/HPV (+)	28	-	+	+
190	S-	ZTT	NIC I/SUG. HPV	21	+	+	+
191		-	ASC-US SUG. HPV	22	-	-	+
192	S-, sangramento importante		HSIL CÉLULAS GLANDULARES	42	+	-	+
193	S-	Controle de ASC-US Sugestivo de HPV	NIC I/HPV	30	-	NR	+
194	S+		HSIL /SUG HPV	35	+	NT	+
195	S-, EAB		NIC I/HPV	31	-	NR	+
196	S-, ZTT		NIC I/SUG. HPV	22	+	-	+
197		-	NIC I/HPV	29	-	+	+
198	Espessamento Endometrial e Sangramento		ATIPIAS DE PADRÃO POSSIVELMENTE ENDOMETRIAL	66	+	+	+
199	S-,	Controle de ASC-US	NIC I/HPV	27	-	-	+
200	S-, ZTT		NIC I/SUG. HPV	17	+	+	+
201	-		NIC I/HPV	37	-	-	+
202	S-		NIC I/SUG. HPV +	21	+	NR	-
203	-		NIC I (+)	32	-	-	+
204	-		NIC I/HPV	24	-	NR	-
205	-		ASC-US	30	-	+	+
206	-				AMOSTRA DESCARTADA		
207	S-		ASC-US/SUG. HPV	28	-	-	+
208	S-		NIC I/HPV	21	-	NR	+
209	-		NIC I/SUG. HPV	22	-	-	+

LEGENDA:

-  Lesão de alto grau (LAG)
-  Lesão de baixo grau (LBG). A presença do símbolo (+) indica que a lesão poderia ser mais avançada
-  Paciente com história de lesão anterior
-  Casos MCM7 (+)/ DNA do HPV (+)
-  Amostra não analisada em pelo menos dois testes (6 excluídas do trabalho: 209 -6=203 amostras)

NR- Não realizou por escassez de amostra

SC- Teste não realizado por escassez de células na amostra

S- Teste de Schiller (S+ positivo; S- negativo)

CAF- Cirurgia de alta frequência

EAB- Epitélio aceto- branco

ZTT- Zona de transição típica

ZTA- Zona de transição atípica

NDN- Nenhum desvio da normalidade

AIN- Área iodo negativa

HST- Histerectomia subtotal

AIC- Área iodo clara

NIC- Neoplasia Intraepitelial Cervical

{	NIC I= LBG ou LSIL
	NIC II/III= LAG ou HSIL

ANEXO 3- PROTOCOLOS DE COLORAÇÃO

1- PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DOS CORANTES DA BATERIA DE PAPANICOLAOU

Hematoxilina de Harris:

5g- Hematoxilina
50ml- Álcool absoluto
100g – Alúmen de potássio ou Sulfato de potássio
1000ml- H₂O destilada
2,5g- Óxido de mercúrio amarelado
200ml- Ácido Acético Glacial P.A

Diluir a HE no álcool e reservar. Diluir o Alúmen na água, aquecendo em fogo brando (não deixar ferver). Retirar do fogo e misturar as 2 soluções. Retornar ao fogo e deixar ferver por 30 segundos. Adicionar o Óxido de mercúrio aos poucos. A solução vai adquirir uma cor púrpura. Lavar o recipiente imediatamente com água gelada. Quando a solução atingir a temperatura ambiente adicionar o ácido Ácido acético Glacial. Filtrar.

EA36:

450ml- Verde luz
450ml- Eosina amarelada
100ml- Pardo de Bismarck

Adicionar 10 gotas de Carbonato de Lítio, misturar e adicionar 2g de Ácido Fosfotungstíco. Misturar bem e adicionar 5ml de Ácido Acético Glacial.

Preparo das soluções de uso do EA36:

- Eosina Amarelada:

5g – Eosina amarelada
1000ml – Álcool absoluto
50ml- Água destilada

Diluir a corante eosina na água e misturar o álcool.

- Verde Luz:

2g- Verde luz

1000- Álcool absoluto

50ml- Água destilada

Diluir o corante verde luz na água e misturar o álcool

- Pardo de Bismarck:

5g- Pardo de Bismarck

1000ml- Álcool Absoluto

50ml- Água destilada

Diluir o corante Pardo de Bismarck na água e misturar o álcool.

(Obs.: Guardar todas as soluções em frasco âmbar).

2- PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

ETAPA	TEMPO	SOLUÇÃO
1	1:00 min.	Álcool
2	1:00 min.	Água
3	Variável	Hematoxilina
4	1:00 min.	Água
5	1:00 min.	Álcool
6	1:00 min.	Álcool
7	1:00 min.	Álcool
8	Variável	EA36
9	30 seg.	Álcool
10	30 seg.	Álcool
11	45seg.	Álcool
12	1:00 min.	Xilol
13	1:00 min.	Xilol
14	1:00 min.	Xilol

3- PROTOCOLO DE COLORACÃO PELA PRATA

Após a eletroforese, os géis foram submersos em solução fixadora (contendo 5 mL de ácido acético-VETEC, 100 mL de etanol e ddH₂O até um volume final de 1000 mL), por no mínimo 10 minutos. Em seguida, os géis foram expostos à solução de coloração contendo 0,30g de nitrato de prata (AgNO₃) (Labsynth), 100 mL de solução fixadora e 200 mL água, por 15 minutos. Os géis, então, foram lavados com água destilada por 30 segundos e revelados com solução reveladora contendo 30g de hidróxido de sódio (NaOH) (VETEC), 10 mL de formaldeído (Cromoline) e ddH₂O para o volume final de 1000 mL, até o aparecimento das bandas de interesse (SANGUINETTI *et al.*, 1994).