

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIA BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Lara Verônica de Araújo Lopes

CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE α/β -INIBINA E
***MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN (MCM)-7* COM**
DIFERENCIAÇÃO E PROGNÓSTICO DO CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO

Belo Horizonte

2023

Lara Veronica de Araújo Lopes

**CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE α/β -INIBINA E
MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN (MCM)-7 COM
DIFERENCIAÇÃO E PROGNÓSTICO DO CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO**

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

Orientador: Prof. Enrrico Bloise

Co-Orientadora: Prof.^a Annamaria Ravara
Vago

Belo Horizonte

2023

043

Lopes, Lara Veronica de Araújo.

Correlação da imunomarcagem de α/β -Inibina e minichromosome maintenance protein (MCM)-7 com diferenciação e prognóstico do carcinoma cervical escamoso [manuscrito] / Lara Veronica de Araújo Lopes. – 2023.
166 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Enrrico Bloise. Co-Orientadora: Prof.^a Annamaria Ravara Vago.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. Subunidades beta de Inibinas. 4. Componente 7 do Complexo de Manutenção de Minicromossomo. 5. Prognóstico. I. Bloise, Enrrico. II. Vago, Annamaria Ravara. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE LARA VERONICA DE ARAUJO LOPES

Às treze horas e trinta minutos do dia 31 de maio de 2023, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE α/β -INIBINA E MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN (MCM)-7 COM DIFERENCIAÇÃO E PROGNÓSTICO DO CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. Enrrico Bloise, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq. | Instituição | Indicação |
|---|-------------|-----------|
| Dr. Enrrico Bloise | UFMG | APROVADA |
| Dra. Annamaria Ravara Vago | UFMG | APROVADA |
| Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida | UFMG | APROVADA |
| Dra. Marcia Cristina Ferreira | UFMG | APROVADA |
| Dra. Alessandra Duarte Clarizia | FAMINAS | APROVADA |
| Dr. Jacinto Costa Neto | UFPE | APROVADA |

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 31 de maio de 2023.

Dr. Enrrico Bloise (Orientador) _____

Dra. Annamaria Ravara Vago _____

Drª. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida _____

Drª. Marcia Cristina Ferreira _____

Drª. Alessandra Duarte Clarizia _____

Dr. Jacinto Costa Neto _____



Documento assinado eletronicamente por **Enrrico Bloise, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 19:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Annamaria Ravara Vago, Chefe de departamento**, em 06/06/2023, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacinto da Costa Silva Neto, Usuário Externo**, em 07/06/2023, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 08/06/2023, às 07:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcia Cristina Franca Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 16/06/2023, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 21/06/2023, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Duarte Clarizia, Usuária Externa**, em 18/07/2023, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2363163 e o código CRC 39512AF4.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é a palavra que resume meus sentimentos no momento que concluo mais uma fase de minha Pós-graduação. Durante todos esses anos - essa História começou em 2012- tive grandes aprendizados, com experiências maravilhosas, e também com algumas nem tão boas, mas que fazem parte da caminhada e do amadurecimento.

Obrigada Deus por me permitir ter saúde e guiar meus caminhos ao longo dessa jornada.

Meus familiares, principalmente minha mãe, obrigada por me incentivarem durante o caminho... e hoje vibram com essa conquista. Mãe você faz parte de tudo isso.... meu pai (in memoriam) me assiste de outra dimensão, mas tenho certeza que muito feliz também!

Meu marido Leandro, obrigada pela parceria e compreensão por minhas ausências! Somente o amor permite tamanha grandeza.

Obrigada a minha filha, que chegou em minha vida no início dessa caminhada, e fez com o que o desafio fosse maior ainda! Mas ao mesmo tempo foquei nela, para que mesmo diante das dificuldades não desistisse do percurso.

Muito obrigada aos meus Orientadores pelos ensinamentos compartilhados, pelo apoio pela paciência. Vocês foram muito importantes no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas, funcionários, professores e coordenadores da Pós-Graduação em Biologia Celular, meu muito obrigado, assim como a todos os colaboradores e às pacientes que contribuíram para realização deste trabalho.

E em ESPECIAL, um agradecimento a minha eterna Orientadora Professora Annamaria: Um obrigado é muito pouco! Anninha, como costume chama-la, me ensinou muito mais do que técnicas e protocolos. Ela me ensinou a ser uma pessoa melhor! Sempre tão gentil, delicada e de uma humildade ímpar. Hoje tenho a honra de dizer que tenho uma amiga incrível. Vou levar pra vida!!!

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher” (Cora
Coralina).*

RESUMO

O câncer cervical (CC) é a quarta causa de morte por câncer em mulheres no Bras. Portanto, a identificação de marcadores de diferenciação celular e de prognóstico é de extrema relevância para o tratamento doença. Nossa hipótese é de que proteínas envolvidas com vias celulares de diferenciação, ativinas e inibinas, e de proliferação, minichromosome maintenance protein (MCM)-7, estariam associadas ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (CCE) mais indiferenciados ou de pior prognóstico, respectivamente. Amostras de CCE moderadamente (CCEM; N=39) ou pouco (CCEP; N=20) diferenciados foram recrutadas e submetidas à análise de Imunohistoquímica para α - β A-inibina e MCM7. No CCEM, a área de imunomarcacão de α -Inibina citoplasmática foi diminuída em células apresentando um fenótipo indiferenciado (FI) em comparação com células apresentando um fenótipo diferenciado (FD) ($p < 0,01$), enquanto a coloração de α -Inibina nuclear em células de FD foi diminuída em CCEP em comparação com CCEM ($p < 0,05$). A intensidade de β A-inibina citoplasmática foi diminuída em FI (comparado com FD). Usando uma matriz de correlação, detectamos uma diminuição evidente no coeficiente de correlação da coloração de α -Inibina entre os núcleos de FD em relação a FI, em ambos os tumores (CCEM e CCEP). De modo similar, nos tumores CCEP, uma perda importante de correlação de intensidade de β A foi detectada entre as células FD e FI. A análise morfométrica da imunomarcacão de MCM7 detectou a sua expressão no núcleo das células tumorais, tanto no CCEM quanto no CCEP. A média de imunomarcacão para o MCM7 foi de 96%. As porcentagens de imunomarcacão foram comparadas com os parâmetros clínicos e histopatológicos associados ao prognóstico. Não foi observada diferença significativa da % de marcação das células tumorais com a idade das pacientes e o grau de diferenciação. Entretanto, verificou-se associação significativa entre a porcentagem de células tumorais marcadas e a profundidade da lesão, o grau de estadiamento dos tumores (FIGO), invasão dos linfonodos, metástase direta/à distância e evolução a óbito em período inferior a 5 anos ($p < 0,05$). A análise da imunomarcacão de p16 (marcador de infecção por HPV de alto risco) revelou que 12% (7/58) das amostras eram negativas para infecção pelo HPV. Foi evidenciada tendência para maior imunomarcacão de MCM7 nas células tumorais de casos negativos pra p16, associados com pior prognóstico. Concluímos que subunidades α - β A-inibina desempenham um papel importante na perda de diferenciação celular no CCE e conseqüentemente, na carcinogênese cervical humana, e que MCM7 possui potencial valor como biomarcador de prognóstico do CCE. Mais estudos são necessários para expandir o conhecimento sobre o papel de α - β A-inibina na carcinogênese cervical, e sobre o potencial valor prognóstico de MCM7 no CCE.

PALAVRAS CHAVE: carcinoma; células escamosas; α -inibina; β A (ativina/inibina); MCM7; prognóstico.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the fourth leading cause of cancer death in women. Therefore, the identification of cell differentiation and prognostic markers is extremely relevant for the treatment of the disease. Our hypothesis is that proteins involved in cell differentiation, activins and inhibins, and proliferation, minichromosome maintenance protein (MCM)-7, pathways would be associated with the development of more undifferentiated squamous cell carcinoma (SCC) phenotypes or with a worse prognosis, respectively. SCC specimens of moderately (MD-SCC; N=39) or poorly (PD-SCC; N=20) differentiated cervical tumors were recruited and submitted to immunohistochemical analysis for α -/ β A-inhibin subunits and MCM7. α - and β A-inhibin staining was detected both at the cytoplasmic and nuclear levels, more predominantly at the basal layer of the cervical epithelium. In MD-SCC, the area of cytoplasmic α -inhibin immunostaining was decreased in cells with a more undifferentiated phenotype (UP) compared to cells with a differentiated phenotype (DP cells) ($p < 0.01$), whereas, DP nuclear α -inhibin staining was decreased in PD-SCC compared to MD-SCC ($p < 0.05$). Cytoplasmic β A-inhibin intensity was decreased in UP compared to DP cells. By using a correlation matrix, we detected an evident decrease in the correlation coefficient of α -inhibin staining between the nuclei of DP, compared to UD cells in both MD- and PD-SCC tumors, whereas in PD-SCC tumors, an important loss of β A intensity correlation was detected between DP and UP cells. Morphometric analysis of MCM7 immunostaining detected its expression in the nucleus of tumor cells, both in MD-SCC and in PD-SCC. The mean immunostaining for MCM7 was 96%. Immunostaining percentages were compared with clinical and histopathological parameters associated with prognosis. No significant difference was observed in the % of tumor cell marking with the age of the patients and the degree of differentiation. However, there was a significant association between the higher percentage of MCM7 immunostained tumor cells and the depth of the lesion, the degree of tumor staging (FIGO), lymph node invasion, direct/distant metastasis and evolution to death in a period of less than 5 years ($p < 0.05$). Analysis of p16 immunostaining (high-risk HPV infection marker) revealed that 12% (7/58) of the samples were negative for HPV infection. There was evidence of a correlation trend of MCM7 higher immunostaining in tumor cells negative for p16, which was further associated with a worse prognosis. We conclude that α -/ β A-inhibin subunits play an important role in the loss of cell differentiation in SCC and, consequently, in human cervical carcinogenesis, and that MCM7 has potential value as a prognostic biomarker for SCC. More studies are needed to expand knowledge on the role of α -/ β A-inhibin in cervical carcinogenesis, and on the potential prognostic value of MCM7 in SCC.

KEY WORDS: squamous cervical carcinoma; α -inhibin; β A; MCM7; prognosis.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 1: | Desenho esquemático da anatomia do colo do útero..... | 18 |
| FIGURA 2: | Fotomicrografias de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) do colo uterino de diferentes graus de histológicos..... | 23 |
| FIGURA 3: | Forma física do HPV dentro da célula hospedeira..... | 26 |
| FIGURA 4: | Desenho esquemático da estrutura das Ativinas/Inibinas..... | 32 |
| FIGURA 5: | Ação dos fatores de replicação para o Licenciamento da Duplicação do DNA..... | 36 |
| FIGURA 5A: | Associação das proteínas E6 e E7 com as proteínas de controle do Ciclo celular..... | 40 |
| FIGURA 6: | Imagem de CCE capturada pelo <i>software Aperio Image Scope Leica biosystems</i> | 52 |
| FIGURA 7: | Fotomicrografia(H&E) representativas das lesões cervicais encontradas na <i>cohort</i> estudada..... | 57 |
| FIGURA 8: | Imunomarcção da proteína α -Inibina em áreas de epitélio cervical não alterado..... | 58 |
| FIGURA 9: | Imunomarcção da proteína α -Inibina em amostras de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM), representado células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica..... | 61 |
| FIGURA 10: | Imunomarcção da proteína α -Inibina em amostras de carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP), representado células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica..... | 64 |
| FIGURA 11: | Análises estatísticas (Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana) da imunomarcção da proteína α -Inibina..... | 66 |
| FIGURA 12: | Análises estatísticas (Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana) da imunomarcção nuclear da proteína α -Inibina nas células FD em CCEM e CCEP..... | 67 |
| FIGURA 13: | Imunomarcção da proteína β A em áreas de epitélio cervical não alterado..... | 68 |
| FIGURA 14: | Imunomarcção da proteína β A em amostras de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM), representado células | |

| | | |
|------------|--|----|
| | com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se técnica de Imunohistoquímica..... | 71 |
| FIGURA 15: | Imunomarcção da proteína β A em amostras de carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP), representado células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se técnica de Imunohistoquímica..... | 74 |
| FIGURA 16: | Análises estatísticas (Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana) da imunomarcção da proteína β A nas células com FD e FI..... | 76 |
| FIGURA 17: | Análises estatísticas (Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana) da imunomarcção da proteína β A nas células com FD em CCEM e CCEP..... | 77 |
| FIGURA 18: | Imunomarcção da proteína MCM7 em áreas de epitélio cervical não alterado..... | 78 |
| FIGURA 19: | Imunomarcção da proteína MCM7 em amostras com diagnóstico de carcinoma de células escamosas moderadamente e pouco diferenciado, utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica | 81 |
| FIGURA 20: | Comparação entre a porcentagem de marcação para MCM7 e o grau de diferenciação da lesão (Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana) | 83 |
| FIGURA 21: | Correlação da porcentagem de marcação para MCM7 com a profundidade da lesão ($r=0,03$) Teste de <i>Sperman</i> | 83 |
| FIGURA 22: | Porcentagem de marcação de MCM7 de acordo com o grau de Classificação da FIGO - Teste <i>One Way Anova</i> (<i>Kruskal -Wallis test</i> com mediana)..... | 85 |
| FIGURA 23: | Porcentagem de marcação para MCM7 e a presença de invasão linfonodal ($p<0,05$). Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana..... | 86 |
| FIGURA 24: | Porcentagem de marcação para MCM7 e a presença de Metástase direta e à distância ($p<0,05$). Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana) | 88 |
| FIGURA 25: | Porcentagem de marcação para MCM7 e a ocorrência de óbito em tempo inferior a 5 anos ($p<0,05$). Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana..... | 89 |
| FIGURA 26: | Porcentagem de marcação para MCM7 e a positividade para p16. Teste <i>t</i> - <i>Mann Whitney</i> com mediana..... | 92 |
| FIGURA 27: | Imunomarcção das proteínas p16 e E7 do HPV em amostras de CCE utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica..... | 93 |

LISTA DE QUADROS E TABELA

| | | |
|------------|---|----|
| QUADRO 1: | Principais características morfológicas das diferentes classificações de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de acordo com o grau de diferenciação..... | 22 |
| QUADRO 2: | Estadiamento da classificação da FIGO para o carcinoma de células escamosas (2018) | 21 |
| QUADRO 3: | Distribuição das amostras de CCE de acordo com o grau de diferenciação (período 01/2018 a 12/2011 e 04/2019 a 01/2021) | 48 |
| QUADRO 4: | Parâmetros semiquantitativos utilizados para análise da marcação por Imunohistoquímica..... | 51 |
| TABELA 1: | Especificações dos Anticorpos utilizados na técnica de Imunohistoquímica..... | 49 |
| TABELA 2: | Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para α -Inibina em amostras de CCEM (N=17) | 59 |
| TABELA 3: | Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para α -Inibina em amostras de CCEP (N=12) | 63 |
| TABELA 4: | Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para β A em amostras de CCEM (N=17) | 68 |
| TABELA 5: | Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para β A em amostras de CCEP (N=12) | 72 |
| TABELA 6: | Resultados da análise morfométrica da Imunohistoquímica para MCM7 nas amostras de CCE pouco e moderadamente diferenciado..... | 79 |
| TABELA 7: | Faixa etária das pacientes distribuídas de acordo com a Diretrizes de Rastreamento para o Carcinoma do Colo Uterino estabelecidas pelo Ministério da Saúde (INCA, 2016) | 82 |
| TABELA 8: | Distribuição das pacientes de acordo com o estágio de Classificação da FIGO de..... | 84 |
| TABELA 9: | Distribuição das pacientes de acordo com a presença de Metástase direta e à distância..... | 87 |
| TABELA 10: | Distribuição dos perfis das pacientes com CCE que apresentaram evolução para óbito..... | 89 |

| | |
|---|----|
| TABELA 11: Distribuição dos casos p16+ e p16- nas amostras de CCE moderadamente e pouco diferenciado..... | 90 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ASCUS | <i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado) |
| AR | Alto Risco |
| BR | Baixo Risco |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica) |
| CAF | Cirurgia de Alta Frequência |
| CCE | Carcinoma de Colo Uterino |
| CCEB | Carcinoma de Células Escamosas Bem Diferenciado |
| CCEM | Carcinoma Cervical Escamoso Moderadamente Diferenciado |
| CCEP | Carcinoma Cervical Escamoso Pouco Diferenciado |
| CDK | <i>Cyclin Dependent Kinases</i> (Kinases dependents de ciclinas) |
| COEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CPR | Complexo Pré-replicativo |
| DAB | 3, 3' - Diaminobenzidina |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico) |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico) |
| EGRF | <i>Epidermal Growth Receptor Factor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) |
| E6AP | <i>E6 Associated Protein a E6</i> (Proteína associada a E6) |
| FD | Fenótipo Diferenciado |
| FI | Fenótipo Indiferenciado |
| FIGO | Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria |
| FM | Faculdade de Medicina |
| FSTL3 | <i>Follistatin Like 3</i> (Folistatina tipo 3) |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HPV | <i>Human Papilloma Virus</i> (Papilomavírus Humano) |
| HPV-AR | Papilomavirus Humano de Alto Risco |

| | |
|--------|---|
| IARC | <i>International Agency for Research on Câncer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus) |
| IHQ | Imunohistoquímica |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IST | Infecção sexualmente Transmissível |
| JEC | Junção Escamo-colunar |
| Kb | <i>Kilobase</i> (1Kb = 1000 pares de base) |
| LCR | <i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle) |
| LEI | Lesão Escamosa Intraepitelial |
| MCM | <i>Minichromosome Maintenance Proteins</i> (Proteínas de Manutenção de Minicromossomas) |
| miRNAs | MicroRNAs (<i>Micro Ribonucleic Acid</i> (Micro ácido ribonucleico) |
| MEC | Matriz Extracelular |
| µg | Microgramas |
| µL | Microlitro |
| mL | Mililitros |
| µM | Micromolar |
| mM | Milimolar |
| µm | Micrometro |
| NIC | Neoplasia Intraepitelial Cervical |
| nm | Nanômetro |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> (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) |
| pRb | Proteína do Retinoblastoma |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico) |
| q-PCR | <i>Real Time- Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) |
| TA | Temperatura Ambiente |
| TGF- β | <i>Transformer Growth Factor</i> (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) |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 1.0 O Câncer de Colo Uterino..... | 18 |
| 1.1 Epidemiologia do Câncer cervical..... | 19 |
| 1.2 Aspectos Histopatológicos dos Carcinomas Cervical Escamoso..... | 21 |
| 1.3 Estadiamento do Carcinoma Cervical Escamoso..... | 24 |
| 1.4 O Status da infecção pelo HPV associado a carcinogênese..... | 25 |
| 1.5 O prognóstico do carcinoma de células escamosas..... | 27 |
| 1.6 O Uso dos Biomarcadores no Diagnóstico e Prognóstico do CCE..... | 29 |
| 1.6.1 As Proteínas do Sistema Ativina/Inibina..... | 31 |
| 1.6.2 As Proteínas de Manutenção de Minicromossomos (MCMs)..... | 35 |
| 1.6.3 A proteína p16INK4 ^a | 39 |
| 1.6.4 A oncoproteínas E7 do HPV..... | 41 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 43 |
| 3 OBJETIVOS..... | 45 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 45 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 45 |
| 4 METODOLOGIA..... | 46 |
| 4.1 Material Clínico- Amostras de Tecido Cervical..... | 46 |
| 4.2 Levantamento dos dados Epidemiológicos e Anatomopatológicos..... | 46 |
| 4.3 Análise Histológica..... | 47 |
| 4.4 Reação Imunohistoquímica..... | 48 |
| 4.5 Avaliação e Interpretação das imunomarcações por Imunohistoquímica..... | 50 |
| 4.5.1 Avaliação das proteínas α -Inibina e subunidade β A..... | 50 |
| 4.5.2 Avaliação da proteína MCM7..... | 49 |
| 4.5.3 Avaliação da proteína p16..... | 52 |
| 4.5.4 Avaliação da proteína E7 do HPV..... | 53 |
| 4.6 Aquisição das imagens..... | 54 |

| | |
|--|------------|
| 4.7 Análise Estatística..... | 54 |
| 5 RESULTADOS..... | 55 |
| 5.1 Análise Histopatológica..... | 55 |
| 5.2 Análise Imunohistoquímica para α - Inibina nas Amostras de Carcinoma Cervical Escamoso..... | 57 |
| 5.3 Análise Imunohistoquímica para subunidade β A nas Amostras de Carcinoma Cervical Escamoso..... | 67 |
| 5.4 Análise Imunohistoquímica para a proteína MCM7 nas Amostras de Carcinoma Cervical..... | 77 |
| 5.4.1 Marcação para MCM7 e sua associação com o prognóstico das pacientes.. | 77 |
| 5.4.2 Dados clínicos das pacientes e análise do prognóstico..... | 82 |
| 5.5 Análise Imunohistoquímica para a proteína p16 e E7 dos HPV nas Amostras de Carcinoma Cervical..... | 90 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 94 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 105 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 106 |
| 9 ANEXOS..... | 121 |

1.0 - O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020 (WHO). Trata-se de um crescimento descontrolado de células, ocasionado pelo desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose (THOMPSON & THOMPSON 2002). Especificamente em relação ao Carcinoma de células escamosas (CCE), essa desregulação acomete as células dos epitélios de revestimento das duas porções do colo uterino: ectocérvice e endocérvice (Figura 1). A ectocérvice é considerada a porção mais externa do colo uterino, em contato direto com o canal vaginal, revestida por um tecido estratificado escamoso, enquanto a endocérvice é a porção mais interna, correspondendo ao canal endocervical, revestida por um epitélio simples colunar. A área de transição entre esses dois epitélios é denominada junção escamo-colunar (JEC), que se acredita ser uma área de maior risco de transformação neoplásica (CONSOLARO & ENGLER, 2014).

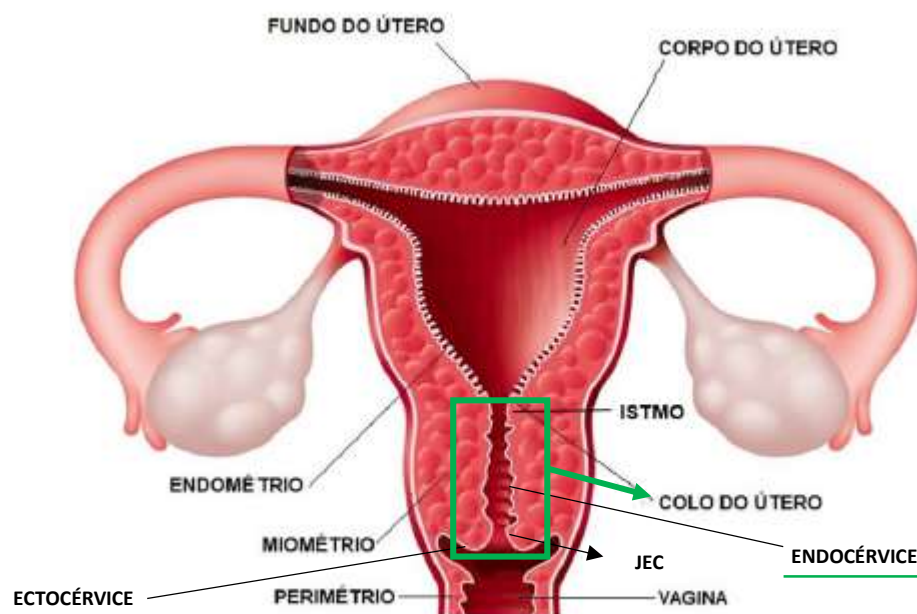


Figura 1- Desenho esquemático da anatomia do útero. Na figura estão representadas as 3 principais partes do útero, com ênfase no Colo Uterino. **Fonte:** Adaptado do site Anatomia em foco, 2019 <<https://www.anatomiaemfoco.com.br/>> e do site KASVI, 2020 <<https://kasvi.com.br/hpv-cancer-colo-utero>>.

Diferentes tipos de tumores cervicais podem se desenvolver nos distintos epitélios de revestimento do colo. O CCE se origina na ectocérvice, sendo responsável por aproximadamente 75% dos casos. Já o Adenocarcinoma, localizado na endocérvice corresponde a cerca de 15 a 25% dos diagnósticos. Os carcinomas, Adeno-escamoso,

Neuroendócrino e de Células Claras do Colo do Útero são subtipos histológicos menos comuns (ROBBINS, 2013).

Na literatura já está claramente descrita a relação dos carcinomas epiteliais do colo uterino com a infecção persistente por Papilomavírus humano (HPVs) de alto risco oncogênico, associado a presença de fatores de risco já estabelecidos, como tabagismo, múltiplos parceiros sexuais, além de condições que comprometem o sistema imune. E apesar dos avanços dos métodos de triagem, diagnóstico e tratamento alcançados na última década, as disparidades regionais e sociais levam a uma grande diferença no desfecho da doença, o que torna ainda necessária a busca por ferramentas baseadas em evidências, que melhorem a qualidade no seguimento das pacientes, favorecendo desfechos bem sucedidos (COHEN, *et al.*, 2019).

1.1- EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

O CCE é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, estando atrás apenas do câncer de mama, colorretal e de pulmão (WHO, 2020). Trata-se de uma doença com íntima relação com o perfil socio-econômico-cultural das pacientes, sendo considerado o sétimo câncer mais incidente no mundo e representando a quarta causa de mortes entre as mulheres (GLOBOCAN, IARC, 2023). No Brasil são esperados para o ano de 2023, 17.010 novos casos, sendo a Região Norte a primeira em incidência (20,48 casos/100 mil), seguida pela Nordeste (17,59/100 mil) e Centro-Oeste (15,66/100 mil). A Região Sul ocupa a quarta posição na incidência (14,55/100 mil), e a Região Sudeste (12,93/100 mil), a quinta posição. Especificamente para o Estado de Minas Gerais são esperados 1670 novos casos sendo estimada para Belo Horizonte a taxa de surgimento de 8,63 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

Os subtipos de HPV 16 e 18 são considerados os mais relacionados aos carcinomas do colo uterino. Entretanto, vários trabalhos demonstram que o HPV-18 está presente em cerca de 50-58% dos casos de Adenocarcinoma e em apenas 15-18% de Carcinoma escamoso. (CLIFFORD *et al.*, 2006; FUJIWARA, 2014; WANG, X. *et al.*, 2018; BRUNI *et al.*, 2019).

Com relação à prevalência dos principais tipos de carcinoma de colo uterino, a porcentagem de casos diagnosticados como Adenocarcinoma aumentou em 55,9% (de 10,2% para 15,9%) nos últimos 10 anos (TERUMI, *et al.*, 2017). A melhora observada nos Métodos diagnósticos tem contribuído para o aumento da detecção da incidência de Adenocarcinoma *in situ*, uma vez que este tipo de tumor é considerado o mais difícil de se detectar pelo Método de Papanicolaou (FUJIWARA *et al.*, 2014).

Um estudo de base populacional realizado por Harper & Vierthaler (2011) comparou a incidência do CCE por idade entre mulheres do Brasil e do Reino Unido. Foi demonstrada uma taxa semelhante de incidência até os 30 anos, evidenciando uma exposição semelhante aos fatores de risco. Entretanto, após essa idade, ocorre uma evidente separação das curvas, de modo que aos 65 anos foi observada uma incidência quase quatro vezes maior nas mulheres brasileiras em relação às britânicas. Essa diferença na taxa de incidência poderia ser explicada pela eficiência nos métodos de rastreamento, assim como ao maior acesso ao tratamento médico adequado pelas mulheres britânicas. De fato, o número de casos de CCE em mulheres da América do Sul foi de 20,4 casos a cada 100.000, contra 6,6 casos a cada 100.000 habitantes na América do Norte e 8,7 casos a cada 100.000 habitantes no Norte Europeu (FERLAY *et al.*, 2012).

Uma análise epidemiológica realizada por Nogueira-rodrigues e colaboradores (2014) com pacientes brasileiras demonstrou que em 51.842 dos casos amostrados, as mulheres eram frequentemente mais jovens (idade média de $51,2 \pm 14,5$ anos), solteiras, negras, sem escolaridade e fumantes (NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Com relação à mortalidade pelo CCE, de acordo com estudo publicado em 2020, no período de 2012 a 2016 o número de óbitos por câncer cervical observado na população brasileira, entre diferentes grupos etários e nas diferentes regiões do país, foi de 27.716 casos. Houve um crescimento de 4,6% do coeficiente de mortalidade sendo registradas nesse período, 189 mortes em mulheres muito jovens, abaixo de 25 anos, o que equivale a 0,68% do total de óbitos. Entre 25 e 64 anos, ocorreram 18.574 óbitos (67,02%), sendo o maior percentual observado dentro da faixa etária de 50-54 anos. Um total de 8.950 mortes foi verificado no grupo de pacientes acima de 64 anos (32,29%). A região Norte apresentou os maiores índices de óbitos e de taxas de mortalidade, e a do Sul o maior índice de crescimento (TAILLON *et al.*, 2020). O impacto da mortalidade pelo câncer de colo uterino no Brasil tem grande importância psicossocial, visto que afeta mulheres entre 30 e 60 anos, que são muitas vezes responsáveis pela renda familiar, o que torna ainda mais importante a questão da prevenção (SANTANA *et al.*, 2010).

Canfell e colaboradores (2020) avaliaram o impacto da mortalidade por CCE em 78 países de baixa renda, sendo verificado que em 79% desses países (149/185) o câncer cervical foi o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado em mulheres abaixo de 45 anos.

A associação entre a infecção persistente por HPV de alto-risco (AR) oncogênico e o desenvolvimento dos carcinomas de colo uterino já está bem estabelecida na literatura. Vários estudos demonstram detecção positiva do DNA-HPV em uma grande porcentagem de mulheres

com câncer cervical, em comparação com mulheres do grupo controle (SCHIFFMAN *et al.*, 1995). Alguns fatores considerados predisponentes influenciam nas taxas de infecção pelo HPV, como o início precoce da vida sexual, a multiplicidade de parceiros, e a co-infecção com outros patógenos. Outros estão associados ao desenvolvimento do CCE, como a imunossupressão, o uso de anticoncepcionais orais por tempo prolongado, e o tabagismo, considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer. Um estudo prospectivo realizado na Europa incluindo 300.000 mulheres demonstrou que o tempo de exposição à fumaça do cigarro, assim como o número diário de cigarros consumidos foram associados ao dobro do risco de desenvolver o CCE nas pacientes portadoras de HPV. Porém as mulheres que pararam de fumar tinham uma redução de 2 vezes na taxa de incidência do CCE, dados que demonstram uma forte associação entre o tabagismo e o desenvolvimento do câncer cervical (ROURA *et al.*, 2014).

1.2- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Dentre os carcinomas invasores do colo do útero, os carcinomas de células escamosas são os mais comuns seguidos pelo Adenocarcinoma Endocervical, sendo que ambos apresentam associação bem estabelecida com a infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico (DOOBAR *et al.*, 2018; SAN JOSE *et al.*, 2018) A grande maioria dos CCE se desenvolvem a partir da zona de transformação ou Junção Escamo-Colunar (JEC- Figura 1), definida como a fronteira entre o epitélio escamoso estratificado da ectocérvice e o epitélio simples colunar (ROOBINS, 2013). Durante o período reprodutivo da mulher, as células colunares do epitélio glandular podem se propagar para a porção externa do colo, o que favorece a exposição dessas células à acidez do canal vaginal pelo fenômeno denominado de Ectopia. Esse processo leva à substituição das células de reserva do epitélio simples colunar por epitélio metaplásico escamoso, tornando a JEC uma região muito dinâmica, onde frequentemente estão presentes células metaplásicas jovens, alvos fáceis para a infecção pelo HPV, fato que determina o surgimento de um grande número de carcinomas escamosos nessa região específica da cérvice (CONSOLARO & ENGLER, 2014).

O CCE pode se apresentar desde pequenos focos de invasão estromal, até tumores vegetantes visíveis macroscopicamente. A profundidade da invasão tumoral e a presença de células tumorais em vasos relaciona-se com a probabilidade de disseminação para os linfonodos pélvicos. O risco de metástases corresponde a menos de 1% para tumores com 3 mm de profundidade, sendo esse risco superior a 10% quando a invasão excede 3 mm. Os CCEs

geralmente exibem considerável heterogeneidade morfológica em padrão de crescimento, tipo celular e grau de diferenciação celular. A classificação dos tumores é baseada no pleomorfismo nuclear, no tamanho dos nucléolos e atividade mitótica associados a outros achados histomorfológicos presentes nas células que compõem a massa tumoral. Dessa forma os CCEs são classificados histologicamente com base em seu grau de diferenciação escamosa em: **(i)** Carcinoma de células escamosas bem diferenciado-CCEB (Figura 2A); **(ii)** Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado-CCEM (Figura 2B); **(iii)** Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado-CCEP (Figura 2C) (NUCCI & OLIVA, 2009; WHO, 2020). O Quadro 1 apresenta as principais características celulares e morfológicas desses tumores de acordo com o seu grau de diferenciação. Aproximadamente 50% a 60% dos CCEs são classificados como moderadamente diferenciados sendo o restante distribuído igualmente entre as categorias pouco e bem diferenciados (SELLORS *et al.*, 2004; ROBBINS, 2013;).

Quadro 1: Principais características morfológicas dos diferentes tipos de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de acordo com o grau de diferenciação

| Classificação | Grau | Características |
|--------------------------------|------|--|
| CCE bem diferenciado | I | Células escamosas maduras com abundante formação de pérolas de queratina, pleomorfismo celular intenso, e pontes intercelulares. |
| CCE moderadamente diferenciado | II | Moderada quantidade de citoplasma, bordas celulares menos distintas, podendo apresentar células isoladas queratinizadas. Discreto pleomorfismo nuclear com evidente cariomegalia e mitoses. |
| CCE pouco diferenciado | III | Células com aparente sinais de imaturidade, pequenas, com citoplasma escasso e núcleo hiper cromático com aumento do número de mitoses. As células tumorais geralmente estão dispostas em ninhos que podem ser separados por septos do tecido conjuntivo, ou podem estar infiltrados de forma difusa no estroma. |

Legenda: O quadro mostra as principais características do CCE de acordo com o grau de diferenciação. As fotomicrografias correspondentes às lesões CCE de distintos graus de diferenciação encontram-se na Figura 2. **Fonte:** Nucci, M.R & Oliva, E. *Gynecologic Pathology*; Elsevier, 2009,

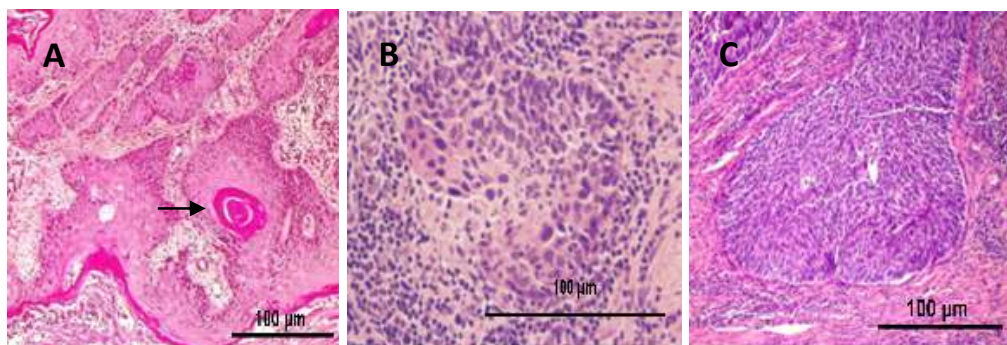


Figura 2: Fotomicrografias de Carcinomas de Células Escamosas (CCE) do colo do útero de diferentes graus histopatológicos. No corte histológico A, observa-se o CCE bem diferenciado que possui ninhos de células tumorais, com características morfológicas de células epiteliais maduras, além de pérolas de queratinização (seta). Em B observa-se CCE moderadamente diferenciado, apresentando grau de diferenciação intermediário com células de citoplasma mais amplo, e variação evidente no tamanho dos núcleos. Na imagem C, verifica-se o CCE pouco diferenciado apresentando massa de células escamosas tumorais no estroma com características de imaturidade, com núcleos pequenos e hiper cromáticos. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 100X, 200X, e 100X, em A, B, C.

Fonte: A e B- Nucci, M.R & Oliva, E. *Gynecologic Pathology*; Elsevier, 2009; C- https://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.

1.3- ESTADIAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Além da classificação histológica é primordial definir o estadiamento do CCE para melhor direcionar o tratamento das pacientes. O sistema de estadiamento da FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (sigla inglesa para *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) é usado com maior frequência para a classificação de cânceres dos órgãos reprodutivos femininos, incluindo o Câncer cervical (*American Cancer Society*, 2020). O estágio é definido com base nos resultados do exame físico realizado pelo médico, de biópsias, e de exames de imagem. O CCE pode atingir toda a extensão no peritútero, vagina, útero e órgãos adjacentes, como bexiga e reto. Além disso, esse tipo de tumor pode se espalhar ao longo dos vasos linfáticos para os linfonodos regionais. Em 2019, o Comitê de Oncologia Ginecológica da FIGO revisou como deveriam ser os critérios para o estabelecimento dos estágios do CCE, como descrito no Quadro 2. Esses podem variar de I a IV, e como regra, quanto menor o número, menor a extensão do câncer. Além disso, dentro de um estágio, uma letra anterior significa um estágio inferior. Destaca-se que os tumores que são classificados como apresentando estágios semelhantes, geralmente são tratados segundo o mesmo protocolo (*BHATLA et al.*, 2019; *American Cancer Society*, 2020).

Quadro 2 – Estadiamento de classificação da FIGO para o Câncer do colo do útero (2018)

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

Legenda: Critérios de Estadiamento da FIGO do câncer do colo do útero foram revisados pelo FIGO Gynecologic Oncology Committee em 2018. **Fonte:** Adaptado de BHATLA *et al.*, 2019.

1.4- O STATUS DA INFECÇÃO PELO HPV ASSOCIADO À CARCINOGENESE

Os HPVs são considerados um grupo heterogêneo de vírus de DNA circular de fita dupla, não envelopados, com genoma de tamanho aproximado de 8.000 nucleotídeos (Figura S2), que infectam a camada basal do epitélio da pele (tipos de HPV cutaneotrópicos) e de tecidos mucosos (tipo mucosotrópicos) (ZUR HAUSEN, 2002).

O genoma do HPV se divide em três regiões funcionais: duas regiões codificadoras denominadas ORFs (Open Reading Frames) e uma região reguladora, longa, denominada LCR (*Long Control Region*). De fundamental importância, as duas ORFs são classificadas como: 1) Região precoce (*Early Region – E*), que apresenta atividade transcricional desde os primeiros estádios da infecção, e composta pelos genes *E1, E2, E4, E5, E6 e E7*; e a 2) Região tardia (*Late Region– L*), expressa nos estádios finais da infecção viral, sendo composta pelos genes *L1 e L2*; (GROVES & COLEMAN, 2015; GRAHAM, 2017). A árvore filogenética do vírus (Figura S3) foi construída com base na sequência de nucleotídeos do gene *L1* classificando os tipos de HPV em cinco gêneros – *alfa, beta, gama, mu e nu* (DOOBAR, 2012). O gênero *Alfa* (*Alphapapillomavirus*), de maior importância clínica e epidemiológica, abrange 62 tipos de HPV que infectam o epitélio das mucosas. Dentro desse gênero os vírus são classificados em tipos de alto risco (AR) e tipos de baixo risco (BR), de acordo com seu potencial de causar lesões intraepiteliais e câncer anogenital. Atualmente mais de 200 genótipos de HPV foram completamente sequenciados e apresentam distintos ciclos de vida de acordo com seu potencial oncogênico (Figura S4); (TOMASINO, 2014).

A associação entre a infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico e as lesões do colo uterino já está bem estabelecida na literatura, sendo o DNA do HPV detectado em aproximadamente 98% das lesões de acordo com o tipo de amostra e o método de detecção empregado (DE SANJOSE, *et al.*, 2010; DOORBAR *et al.*, 2015; COHEN *et al.*, 2019). A história natural das infecções por HPV mostra que a maioria das infecções são temporárias, com altas taxas de resolução espontânea. No entanto, em elevada proporção dos casos, a infecção persistente resultará no desenvolvimento das lesões consideradas pré-malignas, podendo essas ser de origem escamosa, originando a neoplasia intraepitelial cervical, ou glandular, que levará ao desenvolvimento do Adenocarcinoma (SMALL *et al.*, 2017). Na maioria dos casos, a transição das lesões pré-malignas até o carcinoma invasor pode levar uma década. Entretanto, em cerca de 10% das pacientes a ptogressão pode acontecer em tempo inferior a 1 ano (*National Cancer Institute Cervical Cancer*, 2016).

A integração do DNA do HPV de alto risco no genoma do hospedeiro (Figura S4) é um fator chave que induz a transformação maligna em lesões cervicais. Esse processo leva ao acúmulo de danos cromossômicos e desestabilização do genoma nas células infectadas. Além disso favorece ao aumento da expressão dos oncogenes do HPV *E6/E7* (HOWIE & GALLOWAY, 2009; MCLAUGHLIN- & MUNGER, 2009; MOODY & LAIMINS, 2010 DOOBAR, 2012; MCBRIDE & WARBURTON, 2017;). Tanto a taxa de integração do genoma viral quanto a persistência da infecção pelo HPV16 demonstram correlação positiva no desenvolvimento de grau avançado da lesão cervical (WU, 2017; KLOPFER, 2018).

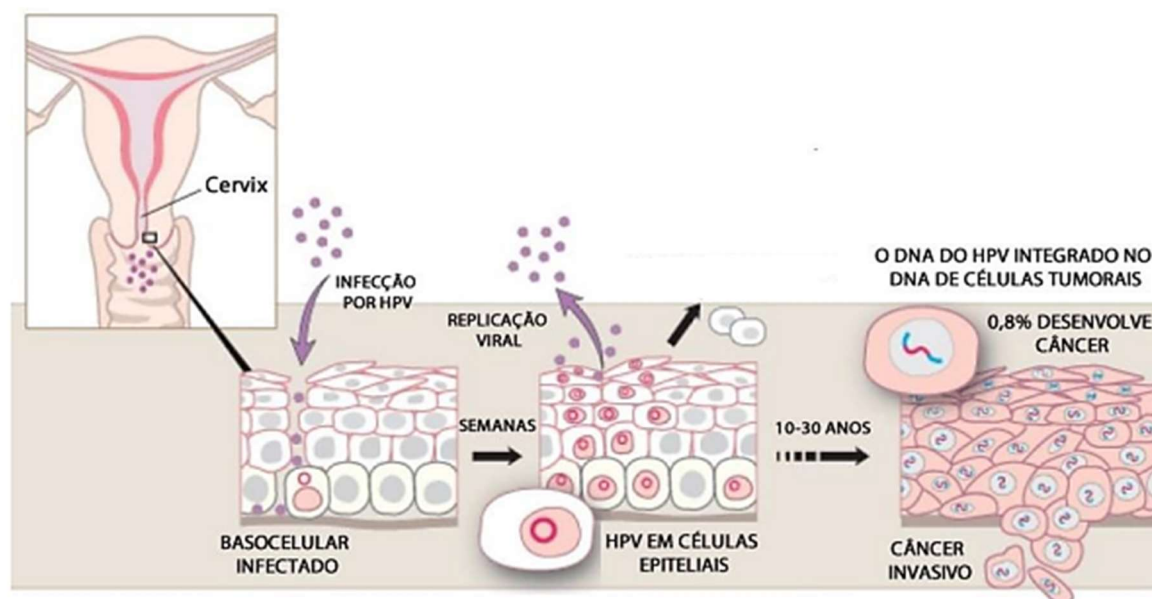


Figura 3: Forma física do HPV dentro da célula hospedeira. O vírus alcança as células da camada basal do tecido, liberando seu DNA na forma epissomal que sofre posterior replicação, formando novas partículas virais. Em outra fase do ciclo, o vírus pode integrar seu DNA ao genoma da célula hospedeira, o que leva à transformação celular, fator imprescindível para a carcinogênese. **Fonte:** Nobel Committee for Physiology or Medicine, 2008. *Ilustração Annita Rohi- Adaptado.*

Outro ponto considerado importante no processo de evolução da carcinogênese uterina é a carga viral no interior das células infectadas. Uma associação entre a carga viral dos HPVs de AR presente nas lesões do colo do útero e a gravidade da doença cervical foi descrita pela primeira vez em 1999 por SWAM e colaboradores. Tal associação foi verificada em vários estudos posteriores (HERNANDEZ-HERNANDEZ, 2003; SHUKLA *et al.*, 2014; WU, 2017; KLOPFER, 2018).

Considerando que a maioria das infecções por HPV são transitórias, há variação da carga viral de acordo com o curso das infecções. Um estudo realizado com mulheres entre 16 a 29 anos demonstrou que em 42% das infecções por HPV16 e 56% das infecções por HPV18, o

vírus não era detectado após um ano. Além disso a carga viral basal foi maior nos casos de infecções persistentes por HPV para esses dois genótipos do vírus, levando os autores a sugerir que a carga viral dos HPVs de AR seria um marcador para infecção persistente (VAN DER WEELE, 2016). Em estudo baseado na quantificação da carga viral de HPVs de AR durante o curso natural das lesões intraepiteliais foi possível distinguir quais teriam maior probabilidade de regressão, e prever quais lesões teriam mais chances de progressão para o câncer cervical (DEPUYDT *et al.*, 2015).

Porém a importância clínica da avaliação da carga viral do HPV no desenvolvimento das lesões cervicais ainda não está clara (DONG *et al.*, 2018). Sabe-se que a presença de elevada carga viral de HPVs de alto risco oncogênico relaciona-se com maiores taxas de persistência da infecção, com a recorrência das lesões precursoras do câncer cervical, com o aumento da concentração das proteínas virais oncogênicas e com o aumento da probabilidade de integração do DNA viral. Todos esses fatores podem favorecer o agravamento das lesões (KADAJA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; NACHAJOVA *et al.*, 2015; WEELE, *et al.*, 2016).

Alguns estudos sugerem que a determinação do “status da infecção pelo HPV”, baseada na detecção da presença do DNA viral de HPVs de AR, na determinação da carga viral e do estado físico do genoma do HPV (proporção das formas episomal e integrada, como descrito na Figura 3) consiste em estratégia fundamental para se avaliar a persistência da infecção e, em última análise realizar o estudo e o acompanhamento da progressão das lesões escamosas ao câncer invasor (CHEUNG *et al.*, 2006).

1.5- O PROGNÓSTICO DO CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS

O prognóstico pode ser definido como a capacidade de se prever o desfecho da doença. Estudos têm sugerido que o prognóstico do câncer cervical está relacionado a múltiplos fatores. Gai e colaboradores (2019) demonstraram que o estágio clínico avançado, a invasão vascular e/ou parametrial, e a presença de metástases em linfonodos foram considerados fatores associados a piores prognósticos do câncer cervical. Por outro lado, o prognóstico não teve correlação significativa com idade, invasão do miométrio, tamanho do tumor, e grau histológico. Estudo clínico realizado com grande amostragem de pacientes demonstrou que as taxas de sobrevida global de 5 anos, para os estádios I e II do Câncer cervical foram de 89 e 79% das pacientes, respectivamente (SERRANO *et al.*, 2015). Estudo retrospectivo realizado por Zheng e colaboradores (2016) com 795 pacientes que receberam algum tipo de tratamento

para CCE, verificou um pior prognóstico em 91% dos casos onde observou-se metástase em linfonodos.

Além disso, a classificação mais recente da OMS para os tumores genitais femininos (WHO,2020) divide os carcinomas do colo do útero com base em sua associação com a infecção pelo HPV em grupos HPV positivos e HPV negativos, sendo o segundo grupo considerado um subconjunto tumoral biologicamente distinto, que segue uma via patogênica diferente dos tumores HPV positivos e apresentam pior prognóstico (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO, *et al.* 2014; LEI *et al.*, 2018; YOSHIDA, H *et al.*, 2021). Ainda não está bem descrito na literatura se os casos de CCE negativos para o HPV foram inicialmente HPV-positivos e posteriormente seguiram uma via independente do vírus, ou se já surgiram independentes da infecção viral. Uma possível explicação seria a perda do fenótipo de diferenciação celular com perda subsequente do HPV dentro da célula (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO, *et al.* 2014). Entretanto mais estudos são necessários para elucidar a etiologia desses casos.

Pacientes com CCE HPV-negativos são mais propensas a desenvolver estágio avançado de FIGO e invasão do espaço linfático, resultando em um pior prognóstico caracterizado pela presença de maior taxa de invasão linfonodal, de metástase e de menor tempo de sobrevivência (NICOLAS *et al.*, 2019). Este pior prognóstico para tumores HPV-negativos também foi observado em outros sítios de infecção onde o HPV pode desenvolver carcinomas, como câncer de cabeça e pescoço e tumores de vagina (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO, *et al.* 2014).

Um estudo comparativo de detecção do DNA do HPV por PCR em pacientes com CCE em estágio inicial revelou que o risco de recidiva geral não diferia entre os diferentes genótipos de HPV em pacientes HPV-positivos, mas era 2,6 vezes maior em pacientes HPV-negativos. E nessas pacientes o risco de metástase à distância foi 4,5 vezes maior do que aquele observado em pacientes HPV- positivos (RIOU *et al.*, 1990).

No entanto vale ressaltar, que o termo “negativo para o HPV” deve ser reservado apenas para aqueles casos de tumor primário sem uma explicação técnica para a obtenção de um resultado negativo do teste de HPV. Existem vários testes para detecção do DNA do HPV com diferentes taxas de sensibilidade e especificidade, e são várias as causas relacionadas à negatividade dos métodos de detecção, destacando-se por exemplo: **(i)** carga viral baixa; **(ii)** deleção de fragmentos do genoma viral durante o processo de integração; **(iii)** escassez de DNA na amostra utilizada para extração; **(iv)** degradação do DNA/RNA devido à fixação inadequada das amostras em formalina e inclusão em parafina, que podem levar a resultados falso-negativos de HPV; **(v)** presença de tumor metastático no colo uterino não associado ao HPV (CUZICK *et al.*, 2013; YOSHIDA, H. *et al.*, 2021). Mesmo com a utilização dos métodos de detecção do

DNA do HPV mais sensíveis, cerca de 5 a 7% de todos os casos de CCE são negativos para o HPV, sendo as características clínicas, macroscópicas e microscópicas desses tumores indistinguíveis daquelas verificadas no CCE associado ao HPV.

Dessa forma a recomendação é a de que a Imunohistoquímica para a proteína p16 (proteína associada a via da oncoproteína E7 do vírus e pRb- Anexo II Material suplementar) seja utilizada para o diagnóstico dos casos de CCE independente do HPV, em concomitante uso do teste de detecção molecular do HPV, quando possível. Coloração forte e difusa para p16 está consistentemente presente em quase todos os cânceres associados ao HPV, enquanto os tumores independentes do HPV são tipicamente p16 negativos. Notavelmente, a infecção pelo HPV tem mostrado ser de alto significado prognóstico em carcinomas de vagina, vulva, cabeça e pescoço. Em todos esses sítios anatômicos, os tumores p16-negativos se comportam mais agressivamente do que tumores p16-positivos (CAROZZI *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018; NWACHUKWU *et al.*, 2019). Já foi proposto na literatura que a infecção por HPV não pode ser diagnosticada de forma confiável apenas pela detecção do DNA do HPV, e que um segundo teste, como a Imunohistoquímica para a p16 ou a detecção do mRNA E6/E7, devem ser necessários para classificar um tumor como conclusivamente associado ao HPV (DE SANJOSE *et al.*, 2013; HALEC *et al.*, 2017; RAKISLOVA *et al.*, 2017).

De fato, evidências recentes indicam que um pequeno subconjunto de CCE associados ao HPV não superexpressam p16, e se comportam de forma mais agressiva, apresentando essas pacientes menor sobrevida do que pacientes portadoras de CCE convencionalmente associados ao HPV e, concomitantemente, à superexpressão da proteína p16 (NICOLAS, *et al.*, 2020).

1.6- O USO DOS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CCE

A utilização dos exames citológicos preventivos (teste de Papanicolaou) como método de *screening* das Lesões Intraepiteliais cervicais tem reduzido significativamente as taxas de incidência do câncer cervical, principalmente em países que possuem Programas de Rastreamento bem estabelecidos (INCA, 2020). Entretanto as taxas de resultados falso-negativo e falso-positivo têm variado bastante, uma vez que a técnica, baseada em parâmetros morfológicos, mostra grande subjetividade, tornando-se assim necessário o desenvolvimento de biomarcadores específicos, que possam ser utilizados como ferramentas acessórias (PINTO *et al.*, 2012)

Os biomarcadores têm a função de aumentar a especificidade e a sensibilidade dos métodos diagnósticos, especialmente na detecção de lesões cervicais de alto grau com maior risco de progressão, e que possam trazer informações complementares ao exame citológico, histopatológico e ao teste de detecção do DNA/HPV (TSOUMPOU *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2011).

A definição de biomarcador é dada a qualquer parâmetro biológico que possa ser mensurado e avaliado com precisão, e que seja capaz de refletir processos biológicos normais ou patogênicos (STRIMBU & TAVEL, 2010). Um biomarcador de prognóstico é usado para identificar a probabilidade de um evento clínico, como recorrência ou progressão da doença em pacientes com uma condição médica de interesse, enquanto os biomarcadores de suscetibilidade de risco lidam com o risco de um indivíduo transitar de um estado saudável para doente (DASARI *et al.*, 2015; CALIFF, 2018).

Os biomarcadores comumente correspondem a moléculas relacionadas: **(i)** à sinalização celular (ABBAS *et al.*, 2017; SYED, 2016); **(ii)** à regulação da expressão gênica via modulação por miRNAs (BEN *et al.*, 2015); **(iii)** à proliferação celular, como os antígenos de proliferação PNCA e Ki67 (AHMED *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2015); **(iv)** ao controle da duplicação do DNA, como as proteínas de manutenção de Minicromossomos ou MCMs (*Minichromosome Maintenance Proteins*) de 2 a 7 (LOBATO *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2013; ZHANG, *et al.*, 2013;); **(v)** ao controle da atividade do ciclo celular, como as proteínas regulatórias p16INK4a, p53, p21 e p27 (VAN DE PUTTE *et al.*, 2003; JIN & XU, 2015; LONGATTO FILHO *et al.*, 2015; TAN & ANKATHIL *et al.*, 2015). Esses biomarcadores têm sido avaliados quanto à sua especificidade na identificação de células displásicas ou neoplásicas, tanto em amostras citológicas quanto em biópsias cervicais.

A capacidade proliferativa de células tumorais é um aspecto fundamental de tumores em progressão e em crescimento. A análise por Imunohistoquímica (IHQ) de marcadores de proliferação como Ki67, é sugerida ser de utilidade para se aferir os níveis de proliferação celular em tecidos processados (LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008). Em relação à patogênese do câncer cervical, a imunomarcagem de Ki67 em esfregaços cervicais ou em tecidos obtidos por biópsias, tem sido sugerida como um marcador alternativo e específico de progressão (ANDERSSON *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2006). Entretanto, Ki67 apresenta baixa especificidade na detecção da proliferação celular, sendo verificada elevada expressão desse antígeno em células inflamatórias e sob proliferação, tanto em lesões atípicas (como ASCUS) como em lesões reativas (PINTO *et al.*, 2012). Além disso, estudos sugerem que a

função de Ki67 não estaria diretamente relacionada à proliferação celular, mas sim à biossíntese de ribossomos (MACCALLUM & HALL, 2000; SCHOLZEN & GERDES, 2000).

Considerando que atualmente o diagnóstico do câncer ainda se baseia principalmente nas características morfológicas que são avaliadas por análises histológicas, uma vez que essa abordagem leva a um diagnóstico confiável na maioria dos casos, a caracterização molecular dos biomarcadores prognósticos pode contribuir para um melhor estabelecimento do grau e da agressividade do tumor, bem como prever os possíveis resultados para os diferentes tratamentos disponíveis. A caracterização molecular se tornará uma ferramenta inestimável para os médicos no processo de tomada de decisão quanto ao acompanhamento e tratamento das pacientes (FRANCO *et al.*, 2014).

1.6.1- AS PROTEÍNAS DO SISTEMA ATIVINA/INIBINA

Ativinas e Inibinas são polipeptídios pertencentes à superfamília de Fatores de Crescimento Transformante (*Transforming Growth Factor*) TGF- β . Os membros da superfamília TGF- β podem regular o crescimento celular, diferenciação, apoptose, produção de matriz extracelular (MEC), angiogênese, entre outros processos celulares (SYED, 2016; ABBAS *et al.*, 2017). Dentre os componentes da superfamília TGF- β , destacam-se as Ativinas, que foram inicialmente descritas como reguladoras da secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise (TSUCHIDA *et al.*, 2004; KANEKO, 2016).

Ativinas são um dímero proteico formado por duas subunidades unidas por ligação dissulfeto, podendo formar em geral homodímeros como descrito a seguir: Ativina A, formada por dois monômeros β A (β A- β A), Ativina B (β B- β B) formada por dois monômeros β B, Ativina AB (β A- β B), Ativina C (β C- β C) e Ativina E (β E- β E) (WALTON *et al.*, 2012). Inibinas são heterodímeros que consistem de uma subunidade α e uma de duas possíveis subunidades β (β A ou β B), resultando na formação de Inibina A (α - β A) ou B (α - β B) respectivamente; Figura 4 (BLOISE *et al.*, 2019).

O processo de sinalização das ativinas acontece através de dois tipos de receptores trans - membrana Serina/Treonina kinase – que possuem um domínio extracelular rico em Cisteína com atividade de união ao ligante, e um domínio intracelular Serina/Treonina kinase (KANEKO, 2016). Eles agem pela fosforilação dos sítios ricos em Serina e Treonina, e são classificados segundo o seu peso molecular como: o receptor de ativina (*Activin receptor* –

ActR) tipo II de baixo peso molecular, e o receptor de ativina tipo I de alto peso molecular (ALEMAN-MUENCH & SOLDEVILA, 2012; BLOISE *et al.*, 2019).

O ActR II apresenta dois homólogos ActRIIA e ActRIIB (BLOISE *et al.*, 2019; KANEKO, 2016). Do mesmo modo ActRI também apresenta homólogos sendo o mais predominante o ActRIB, também conhecido como receptor de ativina tipo kinase 4 (*Activin receptor-like kinase 4* ou ALK4); os outros homólogos são o ActRIC (ou ALK7) e ActRIA (KANEKO, 2016; BLOISE *et al.*, 2019). Os receptores tipo II se unem à ativina com maior afinidade, comparado a ALK4 que não consegue ligar-se à ativina sem a presença de receptores tipo II (KANEKO, 2016). Além disso, a Ativina A tem maior potência e maior afinidade ao ActRII comparada a outras ativinas, razão pela qual é a mais estudada (MAKANJI *et al.*, 2014).

As ativinas iniciam sua via de sinalização ligando-se a ActRII, com posterior recrutamento de ActRI formando o complexo ativina –ActRII-ActRI. Neste âmbito, as subunidades do receptor tipo II fosforilam e ativam o receptor tipo I. Após a ativação de ActRI, o complexo recruta e induz a fosforilação de proteínas intracelulares denominadas SMADs (*Small Mothers Against Decapentaplegic*) 2 e 3, as quais formam um complexo hetero - dimérico e incorporam uma SMAD auxiliar, a SMAD 4 (BLOISE *et al.*, 2019; KANEKO, 2016). Esse complexo, SMAD 2/3 e 4 se transloca para o núcleo e regula a atividade transcricional da célula alvo (HELDIN & MOUSTAKAS, 2012; MACIAS *et al.*, 2015; KANEKO, 2016).

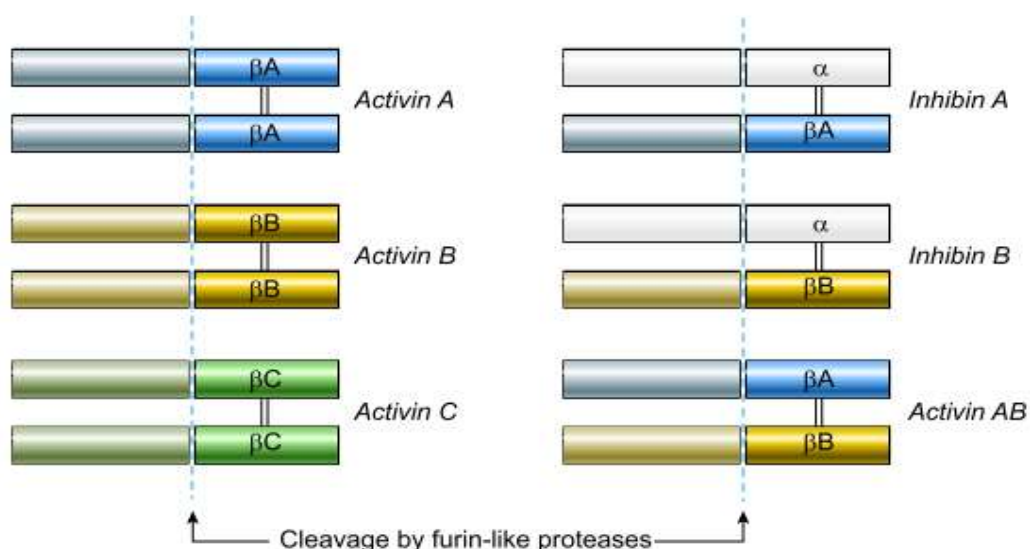


Figura 4: Desenho esquemático da estrutura das Ativinas e Inibinas. As ativinas são dímeros proteicos formadas por duas subunidades β , Ativina A é composta por duas subunidades βA , Ativina B por duas sub-unidades βB , Ativina C por duas sub-unidades βC e a ativina AB por uma subunidade βA e uma subunidade βB . O principal antagonista das ativinas é formado por uma subunidade α e uma subunidade β ; quando a sub-unidade β é A forma-se a

Inibina A e se for uma subunidade β B se tem a Inibina B. **Fonte:** adaptado de BLOISE *et al.*, 2019.

Devido ao seu importante papel, a ativação da sinalização intracelular das ativinas é amplamente regulada por vários reguladores, como por exemplo, pelas proteínas SMAD 7 (reguladoras intracelulares das Ativinas), pelas Folistatina (FS) e *Follistatin-like 3* (FSTL3) (reguladoras das ativinas no meio extracelular), que impedem que as ativinas se liguem a seus receptores (CIARMELA *et al.*, 2011; ALEMAN-MUENCH & SOLDEVILLA, 2012), e de particular importância pelas Inibinas, consideradas antagonistas fisiológicos das ativinas.

Inibinas têm afinidade pelo receptor betaglicano. Sua ação inibitória é realizada pela ligação da sua subunidade α em seu receptor betaglicano, com concomitante ligação da sua subunidade β (A ou B) no receptor das ativinas, ActRII (BLOISE *et al.*, 2019). A afinidade da inibina pelo ActRII é baixa, mas na presença do receptor betaglicano forma um complexo de alta afinidade com o ActRII. Esta interação bloqueia a ação das ativinas, ao competir com a subunidade β do dímero das ativinas pelo ActRII (WALTON *et al.*, 2012). Os mecanismos moleculares do antagonismo de inibina sobre a ativina ainda são uma área de investigação ativa. Existem vários modelos propostos. O mecanismo mais simples sugere que a capacidade da inibina de antagonizar a ativina está baseada na proporção de subunidades disponíveis, de forma que a montagem de heterodímeros é preferencial sobre monômeros (MAKANJI *et al.*, 2014). Cook e colaboradores (2005) demonstraram que enquanto dois resíduos das subunidades β são necessários para a ligação da ativina e posterior ativação de ActRIIB, com a substituição pelo resíduo α correspondente, a capacidade de ligação de ActRIIB e a ativação são perdidas. Assim, enquanto a ativina precisa ligar suas 2 subunidades β às moléculas de ActRIIB em uma proporção de 1:2, a inibina liga um único ActRIIB por meio de sua única subunidade β .

Fisiologicamente, as proteínas do eixo Ativina/Inibina apresentam um importante papel na regulação dos processos reprodutivos femininos. As subunidades de ativina e inibina são expressas no ovário, e sua sinalização autócrina/parácrina desempenha um papel crucial no desenvolvimento de células germinativas, na foliculogênese, na ovulação e na formação e manutenção do corpo lúteo, de modo que a falta de controle na expressão dessa proteína, pode afetar a sobrevivência do corpo lúteo e induzir a infertilidade (APPIAH *et al.*, 2020).

Nas tubas uterinas, a Ativina A tem um importante papel na modulação do peristaltismo, relaxando os músculos lisos por meio da estimulação da síntese do Óxido Nítrico e/ou por uma redução no acúmulo de Ca^{2+} intracelular, favorecendo o transporte de espermatozóides, ovócitos secundários e pre implantação dos embriões (REFAAT & LEDGER, 2011).

O processo de decidualização do endométrio é fortemente modulado pela expressão de Ativina A, de modo que células recém decidualizadas secretam e expressam grande quantidade de Ativina A. Além disso, a Ativina A se correlaciona diretamente com a espessura do endométrio de mulheres menstruadas e facilita a remodelação do endométrio após a menstruação (FLORIO *et al.*, 2003; KAITU'U-LINO *et al.*, 2008). Após o processo de fecundação a Ativina tem importante função durante a formação da placenta (BEARFIELD *et al.*, 2005).

Alguns processos patológicos benignos do trato genital feminino apresentam associação com a expressão das ativina/inibinas. Entre esses destaca-se a Síndrome do Ovário Policístico. Apesar de algumas contradições presentes na literatura, essa síndrome vem sendo associada com a deficiência de Ativina A e Inibina B, e isso sugere que a expressão desregulada dessas citocinas no ovário esteja envolvida na patogênese da síndrome. Entretanto mais investigações ainda são necessárias a fim de melhor esclarecer os mecanismos envolvidos nessa patogênese (ELDAR-GEVA *et al.*, 2001; WELT *et al.*, 2005).

A falta de regulação na expressão dessas proteínas também já foi verificada durante a formação da endometriose, indicando que a regulação positiva da Ativina A favorece o desenvolvimento da endometriose, por meio da modulação da biossíntese de estrogênio e da expressão de citocinas inflamatórias. A Ativina A promoveria a invasão de células endometriais no peritônio para formar implantes endometrióticos por meio da regulação negativa da E-caderina. Entretanto, essa invasão seria antagonizada pela Inibina A (FERREIRA *et al.*, 2008).

A desregulação na expressão das proteínas Ativina/Inibina em processos carcinogênicos femininos também já foi descrita na literatura. Alguns estudos mostram que o TGF- β tem sido reconhecido como um supressor tumoral em fases pré-malignas da carcinogênese, mas se apresenta como um pró oncogênese em fases posteriores da doença, conduzindo à metástase (RISBRIDGER, *et al.*, 2004). De fato, estudo recente demonstrou que durante as etapas iniciais da oncogênese em câncer de mama as ativinas atuam como um supressor de tumores, mas no câncer em fase de metástase e em síndromes de caquexia, os níveis séricos de Ativina A se encontram elevadas, evidenciando que a Ativina A pode favorecer o desenvolvimento tumoral (BLOISE *et al.*, 2019).

As subunidades das inibinas e/ou ativinas têm sido detectadas em tecidos normais e tumores endócrinos normais do sexo feminino, incluindo tecidos endometriais normal e patológico, sugerindo possíveis papéis dessas proteínas na proliferação do câncer e em seu crescimento (BERGAUER *et al.*, 2009; JUCKSTOCK *et al.*; 2010). As inibinas se encontram elevadas em mulheres com tumores epiteliais no ovário, mas em pacientes com câncer de mama

se encontram diminuídas demonstrando que a sua desregulação é altamente tumor-dependente (MAKANJI *et al.*, 2014). No estudo conduzido por Juckstock e colaboradores (2010), a imunomarcagem das Inibinas β A e β B foi avaliada por meio da técnica de Imunohistoquímica, em amostras de tecido cervical normal, portadoras de NIC (I, II e III) e de Câncer cervical (três diferentes graus). Verificou-se que a marcação da subunidade β A foi maior em amostras de NIC, e da subunidade β B nas amostras de Câncer escamoso de maior gravidade (JUCKSTOCK *et al.*, 2010). Com base nessas observações, é evidente que células epiteliais escamosas e carcinomas expressam as subunidades β A e β B das Inibinas. Destaca-se, contudo, que nesse trabalho o padrão de marcação tecidual (intensidade de marcação e número de células marcadas) foi avaliado por meio de análise semiquantitativa, não sendo ainda considerado nessa análise o status da infecção pelo HPV. Entretanto uma hipótese a ser considerada é a de que a transformação neoplásica do colo do útero humano pode estar relacionada à desregulação de TGF β e membros da superfamília, conduzindo à perda de diferenciação celular.

1.6.2- AS PROTEÍNAS DE MANUTENÇÃO DE MINICROMOSSOMO (MCMs)

Proteínas MCMs (*Maintenance Minichromosome Proteins*) correspondem a 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 (BLOW & DUTTA, 2005; LUO, 2011). As seis proteínas MCMs (2-7) formam uma estrutura tridimensional em forma de anel ao redor do DNA, que funciona como uma DNA-*helicase* que irá desenrolar a dupla fita no início da síntese de DNA, ao mesmo tempo em que as forquilhas de replicação bidirecionais se afastam da Origem de Replicação (ORI); Figura 5 (BLOW & DUTTA 2005).

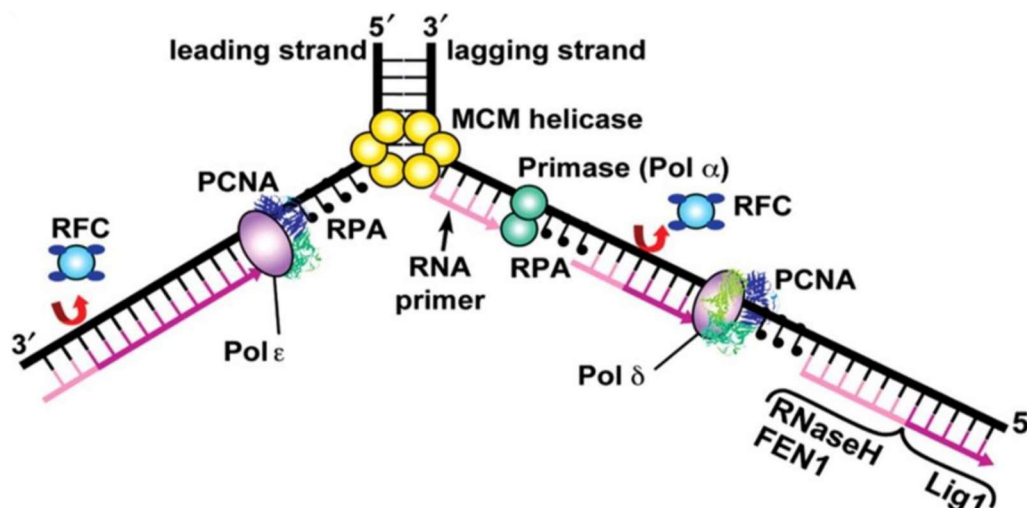


Figura 5: Ação dos Fatores de Replicação para o Licenciamento da Duplicação do DNA. Esquema da dupla fita de DNA no qual é mostrada a forquilha de Replicação que surge a partir de uma ORI eucariota. Destaca-se a presença de várias subunidades da DNA Polimerase (α , δ , ϵ), de fatores de Replicação (RFC, RPA, PCNA), além de um complexo de proteínas MCM formando uma estrutura em forma de anel (amarelo). **Fonte:**(DHAR *et al.*, 2001; ALBERTS 2010; PARKER 2017)

A acurácia da duplicação do genoma, evento que antecede a cada etapa da divisão celular é um aspecto primordial na manutenção da integridade genômica de cada indivíduo, e é particularmente importante para os organismos multicelulares. Milhares de ORI (10^3 a 10^5) são utilizadas por eucariotas para permitir que o genoma seja completamente replicado, de modo que o uso das ORI seja extremamente regulado, e permita que o DNA seja replicado apenas uma vez a cada etapa do ciclo celular (BLOW & DUTTA, 2005).

Visando elucidar de que forma a célula distinguiria se segmentos do DNA já haviam sido replicados ou não, experimentos *in-vitro* baseados na análise temporal da utilização das ORI durante a rápida duplicação do DNA em extratos de ovos de *Xenopus*, descobriram que ao final da fase G1, essas origens se encontravam em um estado “licenciado” para a replicação, que era convertido para um estado “não licenciado” imediatamente após o término da fase S. Assim, um modelo de “licenciamento” da duplicação do DNA foi proposto, sendo dividido em quatro aspectos principais: **(i)** as ORI são “licenciadas” por complexos de MCMs (2 a 7) que se ligam a essas origens durante a fase G1; **(ii)** a ligação do complexo MCM2-7 às ORIs é essencial para que essas se tornem hábeis a formar duas forquilhas de replicação, e então, “licenciadas” à duplicação do DNA; **(iii)** a ligação do complexo MCM2-7 às ORIs e o “licenciamento” dessas origens são restritos ao final da fase M e à totalidade da fase G1 do ciclo celular; **(iv)** as MCMs

(2 a 7) são deslocadas das ORI logo após o início da duplicação, provavelmente por trabalharem à frente da forquilha de replicação. O deslocamento do complexo MCM2-7 do DNA recém-replicado é considerado o aspecto central do modelo de licenciamento da duplicação do DNA (BLOW & HODGSON, 2002; BLOW & DUTTA, 2005).

Como mencionado, a especificidade de Ki67 em avaliar a proliferação celular é considerada baixa. Assim, o antígeno é frequentemente expresso em um número menor de células malignas ou pré-malignas do que as MCMs, em especial à MCM7, em uma ampla variedade de sítios anatômicos (PADMANABHAN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; NISHIHARA *et al.*, 2008; FUJIOKA *et al.*, 2009; TAMURA *et al.*, 2010; LOBATO *et al.*, 2012). Alguns trabalhos identificaram células que apresentam o fenótipo de marcação positiva para MCM7 e negativa para Ki67 (MCM7+ / Ki67-), que são consideradas como células “licenciadas” a proliferar, mas que ainda não se encontram em estado de proliferação. O aumento dessa população celular exibiu correlação positiva com o grau de severidade dos tumores renal (DUDDERIDGE *et al.*, 2005), de próstata (DUDDERIDGE *et al.*, 2007), oligodendroma (WHARTON *et al.*, 2007), fígado (ZHOU, 2002), e carcinoma colorretal (NISHIHARA *et al.*, 2008).

Portanto, uma das principais vantagens de se utilizar MCM7 como marcador de proliferação, reside no fato de que esta proteína constitui parte essencial do complexo pré-replicativo, com importante função no processo de “licenciamento” da duplicação do DNA, cuja presença tem sido bem caracterizada através de todo o ciclo celular (BLOW e DUTTA 2005). Além disso, as MCMs representam o ponto de convergência de numerosas vias de sinalização envolvidas no crescimento celular e dessa forma, constituem melhores marcadores de células que estejam no ciclo celular do que outros candidatos, como receptores de fatores de crescimento ou moléculas envolvidas na transdução de sinal (ROMANOWSKI *et al.*, 1997).

A imunomarcagem tecidual de MCMs incluindo a MCM7 tem sido avaliada em diversos trabalhos como possível Biomarcador de Prognóstico de diversos tipos de desordens proliferativas e neoplásicas. Padmanabhan e colaboradores (2004) avaliaram a correlação existente entre os índices de marcação (LIs ou *Labeling Index*) de MCM7 e de Ki67 e as características histopatológicas do tumor de próstata, como os níveis de PSA, graduação e estágio do tumor e status da re-seção de margens cirúrgicas. Os LIs de MCM7 foram mais elevados do que aqueles correspondentes a Ki67, em cada uma das categorias de risco (PADMANABHAN *et al.*, 2004). Um outro estudo também avaliou a significância de MCM7 como marcador prognóstico do carcinoma endometrial (LI *et al.*, 2005). Pacientes com valores elevados de LI de MCM7 apresentaram menor taxa de sobrevivência. Além disso, o LI de

MCM7 demonstrou correlação inversa com o grau de diferenciação dos tumores, ou seja, observou-se maior *Score* de proliferação em tumores de estádios mais avançados (estádios II e III). Entretanto, não foi verificada associação da expressão de MCM7 com outros importantes aspectos histopatológicos do carcinoma endometrial como o subtipo e o estágio clínico do tumor, a invasão do miométrio e a presença de metástases em linfonodos (LI *et al.*, 2005).

Nishihara e colaboradores (2008) avaliaram o potencial de MCM7 como marcador prognóstico do câncer colorretal. Esses autores demonstraram que o LI de células com o fenótipo MCM+ / Ki67- apresentou correlação positiva com a presença de metástases e com o estágio dos tumores: tumores em estádios mais avançados apresentaram valores mais elevados de LIs das populações MCM + / Ki67 -. A expressão de MCM7 foi considerada um fator prognóstico independente no carcinoma colorretal (NISHIHARA *et al.*, 2008). Da mesma forma, ao analisarem a expressão de MCM7 como fator prognóstico do Adenocarcinoma de pulmão, FUJIOKA e colaboradores (2009) observaram que os LIs de MCM7 exibiram correlação significativa com as características histopatológicas dos tumores, como o grau histológico, o subtipo e o tamanho do tumor. Todos os pacientes que apresentaram elevados LIs de MCM7, exibiram um pobre prognóstico e menor taxa de sobrevivência. A expressão de MCM7 foi considerada um fator prognóstico independente no Adenocarcinoma de pulmão (FUJIOKA *et al.*, 2009). Em estudo conduzido por Kwok e colaboradores (2014) observou-se que o uso combinado da imunomarcagem das proteínas MCM2-7 constitui um novo potencial indicador preditivo e de prognóstico para pacientes com câncer de mama. Além disso, o estudo desenvolvido por QU e colaboradores (2017) sugeriu que a via MCM7 ciclina D1 participa da progressão tumoral no carcinoma hepatocelular, e, portanto, tais proteínas poderiam ser utilizadas como Biomarcadores para o Prognóstico desse tipo de carcinoma. Verificou-se nesse estudo, que a expressão elevada de MCM7 e da ciclina D1 apresentou sensibilidade e especificidade relativamente altas, na predição de pior prognóstico dos pacientes com carcinoma hepatocelular (HCC).

Um estudo de metanálise foi conduzido com o objetivo de se analisar a relação existente entre a expressão das MCMs e a sobrevida geral de pacientes afetados por diversos tipos de câncer. O estudo mostrou que a expressão positiva ou elevada das MCM2, MCM5 e MCM7 pode estar relacionada a um pior prognóstico do câncer, e que esses resultados são úteis para fornecer evidências clínicas ao tratamento eficaz de pacientes que tendem a evoluir para pior prognóstico. Destaca-se que para MCM7 observou-se associação da mesma com parâmetros desfavoráveis aos pacientes com câncer, como maior proliferação celular, pior estágio clínico

do tumor e a presença de metástase linfática, dados esses que enfatizam o grande potencial de MCM7 como biomarcador de prognóstico do câncer (GOU *et al.*, 2018).

Diante de todas essas considerações, conclui-se que a elucidação do papel que MCM7 desempenha na patogênese de tumores, necessitará de investigações adicionais que visem caracterizar as interações moleculares de MCM7 e a identificação de vias celulares pró - tumorogênicas que possam ser influenciadas por elevados níveis da proteína MCM7 (HONEYCUTT *et al.*, 2006).

1.6.3- A PROTEÍNA p16INK4a

A família dos genes *INK4* inclui quatro membros: *p16INK4A*, *p15INK4B*, *p18INK4C* e *p19INK4D*, que mostram características biológicas comuns envolvidas na inibição do crescimento celular e na supressão tumoral. O gene supressor de tumor *p16* codifica proteínas envolvidas na regulação de duas importantes vias do ciclo celular, à p53 e a pRb (SERRANO, 1997; SERRA & CHETTY, 2018). A p16INK4a é uma proteína pertencente à família INK4, cujos membros possuem a habilidade de inibir as quinases dependentes de ciclina (CDKs, do inglês *cyclin dependent kinases*) e, que atua na regulação negativa do ciclo celular através do bloqueio da atividade de CDK4 e CDK6, e da interação com a ciclina D1. Na ausência de p16, a ciclina D1 se liga e ativa as CDKs 4 e 6, formando o complexo ciclina D1/CDK4- 6 que fosforila e inativa a proteína do retinoblastoma (pRb). No estado hipofosforilado, a pRb impede a progressão do ciclo celular ao formar um complexo com o fator de transcrição E2F. Porém, quando fosforilada, pRb dissocia-se de E2F, resultando na ativação da transcrição dos genes-alvo de E2F, promovendo a progressão do ciclo através da transição G1-S. O aumento de p16INK4a induz à inativação do complexo ciclina D1/CDK4-6 e ao bloqueio da progressão do ciclo (TRINGLER *et al.*, 2004; KIM & ZHAO, 2005; SERRA & CHETTY, 2018).

Durante a infecção pelo HPV, as oncoproteínas virais E6 e E7 interferem substancialmente nos eventos de apoptose e de regulação do ciclo nas células infectadas. A proteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de interagir e degradar a pRb, induzindo a liberação de E2F. A perda de função da pRb por interação com E7 de HPVs de alto risco, parece resultar na liberação do controle da transcrição do gene *p16INK4a*, ocasionando um aumento na expressão da proteína p16, como observado em diversos estudos (KALOF *et al.*, 2005; MURPHY *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2008; THOMISON *et al.*, 2008). Figura 5a.

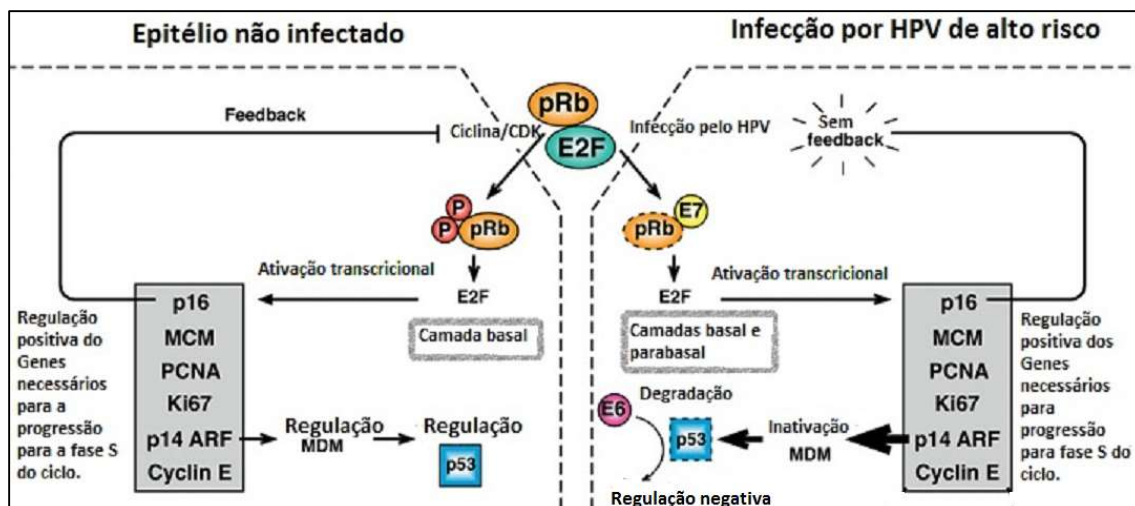


Figura 5a: Associação das proteínas E6 e E7 com as proteínas de controle do Ciclo celular.

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 e p16 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.

Carcinomas associados e independentes de HPV já foram descritos na vulva, vagina e cabeça e pescoço. A expressão imunohistoquímica de p16 tem sido frequentemente usada para classificar corretamente esses tumores, uma vez que os cânceres que surgem pela via independente do HPV são p16 negativos e são mais agressivos, enquanto aqueles associados ao HPV mostram uma forte superexpressão de p16 e têm melhor prognóstico (ALONSO *et al.*, 2012; NOOIJ *et al.*, 2017; RAKISLOVA *et al.*, 2017).

Como já destacado, a classificação mais recente da OMS de tumores genitais femininos (WHO, 2020. 5ª ed.) divide os carcinomas do colo do útero com base em sua associação com a infecção pelo HPV em grupos HPV positivos e HPV negativos, sendo o segundo grupo considerado um subconjunto tumoral biologicamente distinto que segue uma via patogênica diferente dos tumores HPV positivos e apresentam pior prognóstico (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO, *et al.* 2014; LEI *et al.*, 2018; YOSHIDA, H *et al.*, 2021). Pacientes HPV-negativos são mais propensos a desenvolver estágio avançado de FIGO e invasão do espaço linfático, resultando em um pior prognóstico (NICOLAS *et al.*, 2019). De fato, cerca de 5-7%

de todos os CCEs do colo do útero são negativos para o HPV, mesmo quando são utilizadas técnicas muito sensíveis para a detecção do HPV (WHO, 2020).

Assim, a detecção imunohistoquímica de p16 é considerada um marcador substituto confiável para a investigação da infecção por HPV de alto risco. Para ser considerada positiva a imunomarcagem da proteína p16 deve ser difusa e forte, com localização nuclear ou nuclear e citoplasmática (TRINGLER *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 2010; SERRA & CHETTY, 2018).

Neste sentido, destaca-se um estudo realizado por Nicolas e colaboradores (2020), que avaliou 194 pacientes portadoras de CCE positivo para HPV. Os autores compararam as características clinico-patológicas, o genótipo do HPV e a imunomarcagem para p16 com o prognóstico das pacientes. HPV 16 e/ou 18 foram os mais detectados, presentes em 156 (80%) tumores. Imunomarcagem positiva para p16 foi observada em 186 (96%) carcinomas, mas oito tumores (4%) foram negativos para p16. Foi observado que o tipo de HPV e a presença de infecção múltipla não apresentaram impacto com relação ao prognóstico. Entretanto, as pacientes com tumores p16-negativos apresentaram uma sobrevida global significativamente menor do que mulheres com carcinomas p16-positiva (45 e 156 meses respectivamente). Além disso, na análise multivariada, a imunocoloração negativa para p16 foi associada a estágio avançado de FIGO e à presença de metástases linfonodais. Dessa forma o estudo concluiu que a obtenção de um resultado p16 negativo em pacientes com tumores positivos para HPV representa um eficiente marcador prognóstico associado a uma sobrevida global ruim.

Estudos adicionais, incluindo um número maior de casos são necessários para confirmar esses dados e seu potencial uso na prática clínica.

1.6.4- A ONCOPROTEÍNA E7 DO HPV

O genoma do HPV é formado por 8000 pares de bases, e as proteínas codificadas pelos genes da região precoce -E- participam da replicação viral e da transformação das células do hospedeiro. Os genes dessa região induzem a expressão de proteínas reguladoras denominadas E1 e E2 (que atuam na replicação e na transcrição do DNA viral), E4 (atua na amplificação do vírus), E5, E6 e E7 (atuam na imortalização/transformação de queratinócitos), sendo estas últimas consideradas oncoproteínas (CHAN *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2016).

A propriedade principal e mais estudada da proteína E7 dos HPVs de alto risco, composta por 98 aminoácidos (de aproximadamente 11 KDa) é a sua capacidade de interagir com a forma desfosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), isoformas p105, p107 e p130 – degradando-as. Quando a proteína pRb encontra-se na forma desfosforilada, ela se liga ao

Fator de transcrição E2 ou E2F (*E2 Transcription-factor*), o qual tem a função de regular o ciclo celular e a síntese de DNA pela modulação de vários genes envolvidos no processo (DOORBAR *et al.*, 2012; DE SANJOSÉ *et al.*, 2018). A proteína E7, ao se unir ao supressor de Tumor (pRb) induz a degradação e consequente inativação dessa proteína, o que favorece a proliferação celular (ROMAN & MUNGER, 2013; PORTER *et al.*, 2017; HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018).

Além disso, E7 aumenta os níveis da fosfatase CDC25A por meio da ativação de seu promotor. A CDC25A induz a desfosforilação de resíduo específico de tirosina da CDK2 e, consequentemente, promove a ativação necessária para a transição da fase G1/S (MOODY *et al.*, 2017; PAL & KUNDU, 2020). Dessa forma, a atenuação do processo de senescência celular induzida por oncogene também é mediada por E7 sendo fortemente sinalizada pelo acúmulo da proteína p16. Quando expressa na ausência da proteína E6, a proteína E7 promove a apoptose de linhagens celulares de câncer cervical, mas quando é co-expressa com a proteína E6, a E7 permite à célula escapar deste mecanismo de defesa celular (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018). Durante a integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro pode ocorrer a quebra dos genes E1/E2, com perda da atividade regulatória das proteínas por eles codificada, resultando na superexpressão das oncoproteínas E6 e E7 (MOODY *et al.*, 2017; HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018; PAL & KUNDU, 2020)

Muitos vírus, incluindo o HPV, desenvolveram várias estratégias para bloquear a apoptose mediada pelo hospedeiro. A capacidade do HPV de persistir no hospedeiro por longos períodos sem ser eliminado atesta a sofisticação dos seus mecanismos de evasão. Com isso, o HPV é capaz de regular a sobrevivência das células infectadas de modo a facilitar o seu ciclo de vida, assegurando a produção e propagação da sua descendência (PAL & KUNDU, 2020).

Em particular, as oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são consideradas antiapoptóticas, de modo que a expressão persistente dessas oncoproteínas favorece o desenvolvimento do câncer invasivo, pelos efeitos destas sobre a instabilidade cromossômica e a alteração do ciclo celular (CHAN *et al.*, 2019).

2- JUSTIFICATIVA

O CCE apesar de ser um tipo de câncer altamente prevenível ainda apresenta elevadas taxas de incidência no país, sendo esperados mais de 17.000 novos casos para o ano de 2023, de acordo com dados do INCA. Em 2020, ano marcado por milhares de óbitos pela Pandemia por COVID 19, o câncer de colo uterino ainda foi a terceira causa de mortalidade entre as mulheres. O índice de cobertura do exame de rastreamento para os cânceres de colo uterino vem se mantendo em torno de 80% nas capitais do país, contudo índices menores são observados quando analisamos os dados de cobertura regionais (INCA, 2020).

Entender o comportamento do ambiente tumoral é de extrema importância, afim de buscar meios de identificar e avaliar o perfil de expressão de possíveis moléculas capazes de prever o desfecho dessa doença, de forma a promover um acompanhamento mais individualizado para aquelas pacientes com maior probabilidade de evoluírem para um pior prognóstico.

Como já bem descrito na literatura, a infecção persistente por HPVs de AR, pode resultar na integração do DNA viral no genoma das células humanas, evento que resulta na superexpressão das oncoproteínas transformantes E6 e E7 de HPVs de AR também considerado importante fator de risco para o desenvolvimento do CCE (CHEUNG *et al.*, 2006; KADAJA *et al.*, 2007). Entretanto estudos recentes têm demonstrado que a ausência de infecção ativa pelo HPV, caracterizada pelo teste de imunohistoquímica negativo para a proteína p16, está associada a um prognóstico desfavorável das pacientes, promovendo metástases e redução do tempo de sobrevivência das mesmas (NICOLAS *et al.*, 2020; YOSHIDA, H *et al.*, 2021).

O prognóstico pode ser definido como a capacidade de prever o desfecho da doença. Alguns estudos têm sugerido que o prognóstico do câncer cervical está relacionado a múltiplos fatores. Gai e colaboradores (2019) demonstraram que o estágio clínico avançado, a invasão vascular e/ou parametrial, além de metástases em linfonodos foram os fatores associados a piores prognósticos do câncer cervical. Por outro lado, o prognóstico não teve correlação significativa com a idade das pacientes, a invasão do miométrio, o tamanho do tumor e grau histológico.

Dessa forma, a possibilidade de estudar em amostras de tecido humano, o comportamento de moléculas reguladoras do ciclo celular, associadas às vias de sinalização, diferenciação e apoptose, como elegíveis biomarcadores de prognóstico do câncer cervical, abre

oportunidade para o entendimento das alterações moleculares promovidas pelas células tumorais no CCE, de modo a melhorar a previsibilidade dos desfechos clínicos das pacientes.

Nossa hipótese é a de que a expressão alterada das proteínas do eixo Ativina/Inibina, altamente envolvidas com diferenciação celular poderia estar associada ao desenvolvimento de casos de CCE mais diferenciados, enquanto a expressão tecidual da proteína de proliferação celular MCM7, estaria mais relacionada aos casos de pior prognóstico do CCE. Dessa forma, naqueles casos onde houver presença de recidiva, metástase à distância, invasão de linfonodos e sobrevida inferior a 5 anos, poderemos observar elevado número de células marcadas pela proteína MCM7 nas áreas de lesão, cujo perfil de expressão seria considerado inverso ao das proteínas do sistema Ativina/Inibina.

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de expressão tecidual das proteínas α -Inibina e β A, em pacientes com CCE, além de avaliar a possível utilização da proteína MCM7 como biomarcador de prognóstico do câncer cervical.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar por imunohistoquímica em amostras teciduais de CCE, a imunomarcação das proteínas α -inibina, β A, MCM7, p16 e E7 do HPV;
- Analisar de maneira semiquantitativa a porcentagem de imunomarcação de α -inibina e β A, bem como a intensidade das marcações obtidas;
- Analisar de maneira qualitativa a intensidade de imunomarcação para MCM7 nas amostras de câncer cervical;
- Analisar por meio de estudo morfométrico a porcentagem de marcação para MCM7 nas amostras de CCE e sua associação com os fatores prognóstico do câncer de colo uterino.
- Analisar em amostras teciduais de CCE a presença da imunomarcação para a proteína p16, com a finalidade de verificar de forma indireta a presença de infecção ativa pelo HPV;
- Analisar em amostras de câncer cervical negativas para p16, se há expressão da proteína E7 do HPV com a finalidade de investigar se há infecção ativa pelo HPV;
- Investigar a relevância da imunomarcação para MCM7 como biomarcador associado ao prognóstico do CCE.

4- METODOLOGIA

4.1- MATERIAL CLÍNICO – AMOSTRAS DE TECIDO CERVICAL

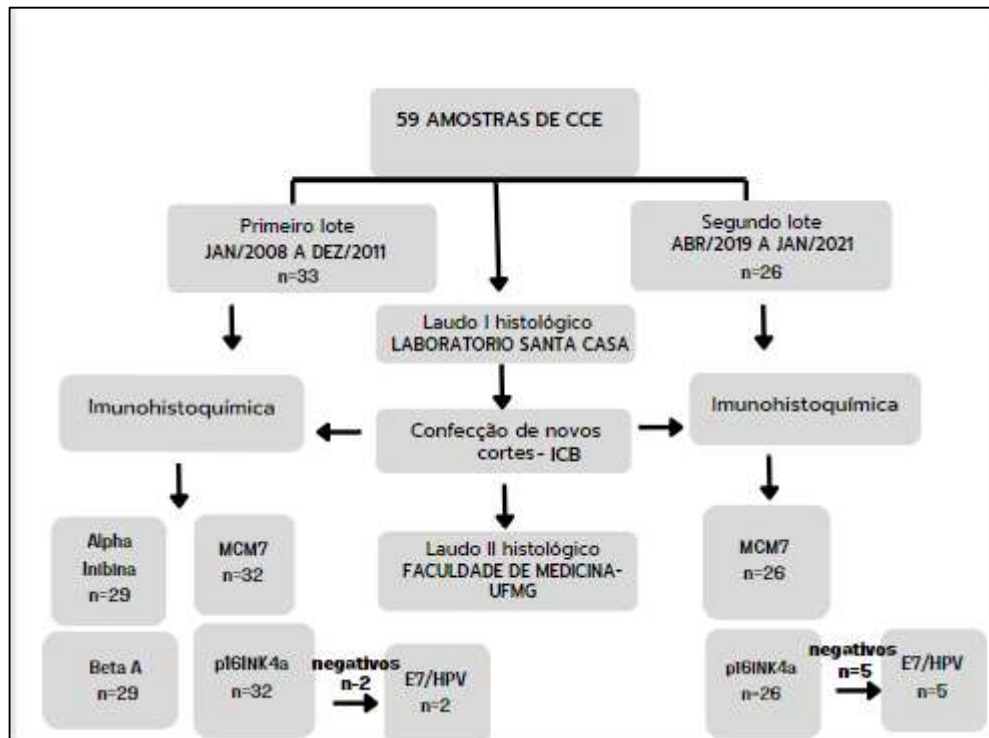
Neste estudo retrospectivo de caráter transversal foram selecionadas 59 pacientes divididas em 2 grupos de acordo com a data do diagnóstico. No primeiro incluímos 33 pacientes cujos diagnósticos foram concluídos entre o período de janeiro de 2008 até dezembro de 2011. Já no segundo grupo 26 pacientes foram selecionadas sendo o diagnóstico concluído de abril de 2019 a janeiro de 2021. Os blocos de amostras cervicais, correspondentes a espécimes incluídas em parafina de peça removida em cirurgia ou biópsia de pacientes portadoras de CCE, foram selecionadas de um banco de amostras do Laboratório de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, MG, sob a Coordenação do Dr. Maurício Buzzelin, Nunes que se prontificou a participar do presente Projeto por meio do empréstimo do material clínico após apreciação e análise do Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia. Desta forma, os blocos histológicos foram provisoriamente mantidos no Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG durante o período de realização da pesquisa, ficando sob a guarda provisória do referido Laboratório, mediante a assinatura de um Termo de Responsabilidade versando sobre a referida guarda.

Para a realização do presente estudo, e utilização das amostras de tecido incluídas em parafina para fins de pesquisa, esse Projeto foi encaminhado e aprovado pelo COEP (Comitê em Ética e Pesquisa) da UFMG e aprovado sob o número CAAE: 55168020.7.0000.5149.

4.2- LEVANTAMENTO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

Para realização do presente estudo retrospectivo foi realizado levantamento de todos os laudos emitidos pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. A seleção das pacientes incluídas no estudo foi realizada mediante acesso ao Sistema de Emissão de laudos do Centro de Tratamento e Diagnóstico (CTD) da Santa Casa. A partir desses laudos foram extraídas as informações disponíveis como a idade, o grau de diferenciação dos tumores e o grau de profundidade das lesões. Os dados dos prontuários foram coletados do Serviço de Arquivo Médico Estatístico (SAME) do referido Hospital e foram registradas as informações referentes aos dados clínico-patológicos das pacientes do presente

estudo, como: (i) o grau de estadiamento de FIGO; (ii) presença de recidiva direta; (iii) presença de metástase a distância; (iv) invasão de linfonodos; (v) óbito.



Fluxograma 1- Desenho experimental do estudo. As amostras foram selecionadas em dois lotes diferentes, sendo um lote de amostras mais antigas e um segundo com amostras mais recentes. O 1º laudo histológico (laudo I) foi emitido pela equipe coordenada pelo Dr Mauricio Buzzelin, médico patologista da Santa Casa. O 2º laudo histológico (laudo II) foi emitido pela Dra. Cristiana Buzzelin, docente do Departamento de Anatomia Patológica Faculdade de Medicina da UFMG. No primeiro lote foram realizadas Imunohistoquímica para α -inibina, β A, MCM7 e p16. No segundo lote foi realizada Imunohistoquímica para MCM7 e p16 em todas as amostras. Nos casos negativos para p16 foi realizada Imunohistoquímica para E7 do HPV.

4.3- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Primeiramente, todas as amostras selecionadas foram analisadas pela equipe de médicos Patologistas, do Laboratório de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia, para emissão dos laudos histopatológicos. Todas as lesões foram classificadas de acordo com critérios descritos e estabelecidos na literatura médica; Quadro 3 (WAXMAN *et al.*, 2012).

Quadro 3 – Distribuição das amostras de CCE de acordo com o grau de diferenciação (período 01/2008 a 12/2011 e 04/2019 a 01/2021)

| DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO | “N” AMOSTRAL |
|---|--------------|
| Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado | 20 |
| Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado | 39 |
| Carcinoma de células escamosas bem diferenciado | 0 |
| Total | 59 |

A partir dos blocos de parafina que foram retirados do arquivo da Santa Casa de Misericórdia e encaminhados ao Laboratório de Patogênese Molecular- ICB-UFMG foram realizados novos cortes na espessura de 5µm e corados por hematoxilina e eosina (H&E). Todas essas novas lâminas foram reexaminadas no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina (FM) da UFMG, pela Dra. Cristiana Buzzelin Nunes, docente do Departamento de Anatomia Patológica da referida Faculdade, para confirmação do laudo histopatológico previamente emitido. Assim no caso das amostras que apresentavam vários blocos (de 05 a 08 blocos), após o estudo microscópico foi escolhido aquele bloco que melhor representasse a lesão, a partir do qual seriam obtidos os cortes para o estudo Imunohistoquímico. Após essa etapa foram realizados 10 cortes consecutivos de 4µm para cada amostra tecidual, que foram transferidos para lâminas silanizadas para a realização dos testes Imunohistoquímicos.

4.4- REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Na primeira fase da técnica de Imunohistoquímica, para os processos de desparafinização, reidratação e recuperação antigênica nos cortes dos tecidos (4µm) foi utilizada a solução *Trilogy*TM na proporção 1:100 em água destilada (*Cell Marque- Código: 920P-07*), à qual os cortes foram submetidos à temperatura de 100°C em duas etapas de 30 minutos no vaporizador eletrônico (*Steamer marca e local de fabricação*). Ao final dessa primeira fase, as lâminas ficaram submersas em 2 banhos de 5 minutos em água destilada à temperatura ambiente (T.A). Para a realização dos ensaios Imunohistoquímicos foi utilizado o kit *NovoLink 24 Max Polymer Detection Novocastra*TM *Leica Microsystems* (#Cat: 7150-CE,). Destaca-se que devido à intensificação do anticorpo secundário em razão da presença de polímero, a utilização deste kit permite alcançar grande sensibilidade na reação de Imunohistoquímica.

Os cortes foram colocados em câmara úmida e as soluções do kit foram aplicadas seguindo as recomendações do fabricante, com pequena modificação em relação ao tempo de incubação de cada etapa. Após cada etapa houve lavagem dos cortes com PBS 1X.

Primeiramente, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da Peroxidase endógena e de proteínas inespecíficas, utilizando-se para tal as soluções específicas fornecidas pelo kit *NovoLink*, por 10 minutos à T.A em cada etapa.

Na etapa de incubação com o anticorpo primário, realizada por uma hora à T.A. os anticorpos (α -Inibina, β A, MCM7, p16 e E7/HPV) diluídos em PBS 1X/BSA 3% foram utilizados seguindo as condições padronizadas e estabelecidas no Laboratório (Tabela 1).

Tabela 1: Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunohistoquímica

| ANTICORPO | ESPECIFICAÇÕES | HOSPEDEIRO / TIPO | DILUIÇÃO E INCUBAÇÃO (1 HORA) |
|--------------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------------|
| MCM7 | Anticorpo Anti - MCM7; clone DCS-141 Abcam - Cambridge, United Kingdom;, UK AB 2360 | <i>Mouse</i> <i>monoclonal</i> | 1:200 |
| ALPHA INIBINA | Anticorpo Anti- α - Inibina Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA; HPA019141 | <i>Rabbit</i> <i>polyclonal</i> | 1:100 |
| BETA A (ATIVINA/ INIBINA) | Anticorpo Anti- β A; Santa Cruz - Biotechnology Santa Cruz, CA, USA; Sc-166503 | <i>Mouse</i> <i>monoclonal</i> | 1:1500 |
| P16INK4A | Anticorpo Anti – p16; LabVision clone JC8, USA | <i>Mouse</i> <i>monoclonal</i> | 1:100 |
| E7/HPV | Anticorpo Anti E7 (HPV 16-E7) Ab-1 (Clone TVG 710Y) | Mouse monoclonal | 1:50 |

Thermo Scientific. Ab,
Cat. Number Ms 768-
PO

Em seguida foi realizado o bloqueio pós-anticorpo primário utilizando a solução específica do kit *NovoLink* por 50 minutos à T.A. Após a etapa de bloqueio, os tecidos foram incubados com a solução denominada “Sistema Universal de Detecção por Polímeros” do kit *NovoLink* por 30 minutos à (T.A.). Para a revelação da marcação foram aplicados 100 µl de solução reveladora contendo Diamino-Benzidina 3,3 (DAB) por 10 minutos à T.A. Para a contra-coloração, as lâminas foram mergulhadas em solução de Hematoxilina de Harris (RenyLab®) por 15 segundos. Para finalização e montagem das lâminas, os tecidos foram lavados em água corrente por 5 minutos e, em seguida, desidratados em soluções com crescente concentração de álcool (75 % - 100%) por 3 minutos, seguidos de 3 banhos em xilol por 5 minutos cada. Após essas lavagens, procedeu-se à montagem das lâminas com lamínulas utilizando o meio de montagem *Entellan* (*Merck Millipore*, Código 3208 20 10, USA).

Apropriados controles negativos e positivos foram incluídos em cada bateria de reação. Para controle negativo de cada reação foi feita a substituição dos anticorpos primários por 100 µl da solução de PBS 1X. Como controle positivo foi utilizada em cada experimento, uma amostra de Carcinoma Escamoso Invasor, cuja marcação bem definida já havia ficado conhecida durante os experimentos de padronização.

O “grupo controle” foi estabelecido a partir de áreas de tecido normal presentes nas amostras, de modo a se observar o perfil de expressão das proteínas analisadas em células livres de atípicas. Tais áreas foram observadas em 12 amostras do presente estudo.

4.5-AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES POR IMUNOHISTOQUÍMICA

4.5.1- AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS α -INIBINA E SUBUNIDADE β A

Primeiramente, ressalta-se que para essas proteínas foram realizados testes Imunohistoquímicos somente nos casos referentes ao primeiro lote de amostras (de 2008 a 2011).

A quantificação da imunorreatividade para as proteínas α -inibina e β A foi avaliada por análise semiquantitativa, utilizando o Microscópio Binocular Olympus Optical Co-LTD (Modelo U-DO3 – Bx41TF, Laboratório de Multiusuários do PPG em Biologia Celular) nas

objetivas de 10X e de 40X, nas células com alteração morfológica, exibindo coloração marrom, evidenciando marcação nuclear e citoplasmática presentes nas áreas constituídas por tecido tumoral. Dois observadores analisaram independentemente as lâminas histológicas. Da mesma forma foi avaliada a intensidade da imunomarcação. Foram utilizados critérios propostos por KLAES e colaboradores (2001) com algumas modificações. Para cada parâmetro utilizado foi realizada a estratificação em cinco Scores (0 a 4) como apresentado no Quadro 4

Quadro 4- Parâmetros semiquantitativos utilizados para análise da marcação por Imunohistoquímica

| Parâmetros | Análise Semiquantitativa |
|---|---|
| Localização da imunomarcação: | Nuclear, Citoplasmática, Nuclear e Citoplasmática |
| PORCENTAGEM ESTIMADA DE CÉLULAS MARCADAS | |
| <i>Score 0</i> | Imunorreatividade não observada |
| <i>Score 1</i> | Imunorreatividade observada em até 25% das células |
| <i>Score 2</i> | Imunorreatividade observada entre 26 a 50% das células |
| <i>Score 3</i> | Imunorreatividade observada entre 51 a 75% das células |
| <i>Score 4</i> | Imunorreatividade observada em acima de 75% das células |
| INTENSIDADE ESTIMADA DE MARCAÇÃO | |
| <i>Score 0</i> | Marcação ausente |
| <i>Score 1</i> | Fraca - correspondente a 1+ |
| <i>Score 2</i> | Moderada- correspondente a 2+ |
| <i>Score 3</i> | Forte- correspondente a 3+ |
| <i>Score 4</i> | Muito forte- correspondente a 4+ |

4.5.2- AVALIAÇÃO DA PROTEINA MCM7

A imunohistoquímica para MCM7 foi realizada nas 59 amostras desse estudo. A quantificação da imunorreatividade para MCM7 foi avaliada por análise morfométrica das células com alteração morfológica exibindo marcação nuclear, presentes nas áreas constituídas por tecido tumoral. Para isso as lâminas foram digitalizadas no aparelho *Aperio VERSA 8, Leica Biosystems*. Destaca-se que a digitalização (escaneamento) das lâminas foi realizada em colaboração com a Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, coordenadora do Laboratório de

Imunologia e Biologia Celular do Instituto de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG. Os autores agradecem à Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ, pelo apoio e financiamento dos serviços prestados pela Plataforma de Microscopia e Microanálises de Imagens RPR07E. A visualização e a quantificação das imagens foram realizadas usando o software *Aperio ImageScope Leica Biosystems*. A contagem das células marcadas foi realizada em 5 campos com medida aproximada entre 50.000 e 60.000 micrometros, sendo obtida a média do número de células marcadas para realização das análises estatísticas (Figura 6).

Registra-se que a escolha do número de campos adotados (5) para a contagem das células marcadas, foi baseada na realização de experimentos prévios, nos quais foram testados a contagem de 5, 8 e 10 campos, não sendo observada diferença significativa na média de porcentagem das células contadas, definindo assim a contagem em 5 campos.

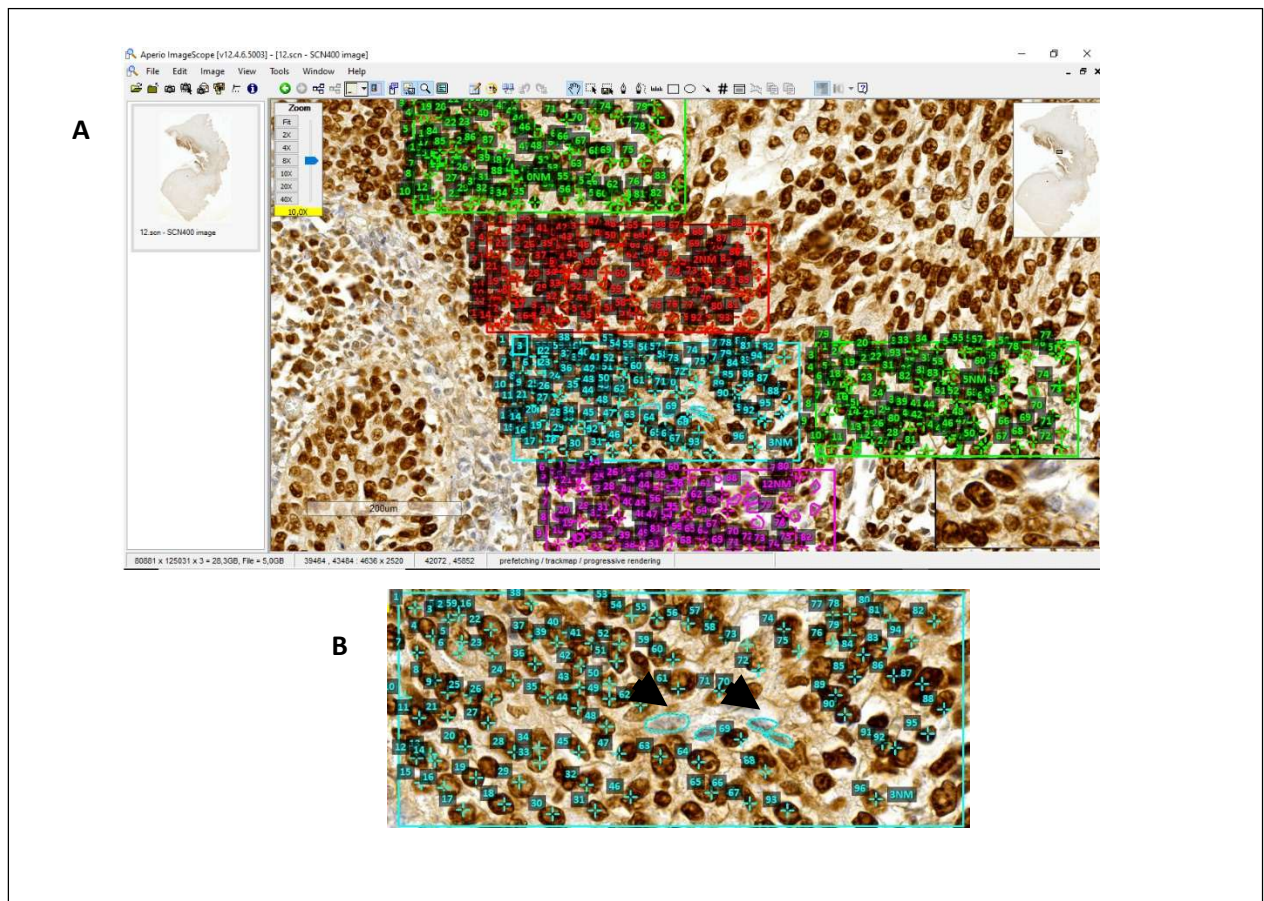


Figura 6: Imagem de câncer cervical capturada pelo software *Aperio ImageScope Leica Biosystems*. **A-** Observa-se a imagem capturada pelo Microscópio Aperio VERSA 8, *Leica Biosystems* de uma amostra de CCE mostrando cinco áreas de lesão (obtidas com a objetiva de 10X) com medidas variando entre 50.000 a 60.000 μ m, diferenciadas por cores. Foram contadas todas as células marcadas e não marcadas por MCM7 em cada área. As marcas mostram destaque numérico sobre cada célula. **B-** As células não marcadas foram contornadas, como

destacado na imagem (obtidas na objetiva de 40X) pelas setas pretas, e cada contorno equivale a uma célula.

A intensidade de marcação foi baseada na análise de dois observadores, utilizando o Microscópio Óptico convencional (descrito no item anterior) nas objetivas de 10X e de 40X. A graduação da intensidade de coloração nuclear marrom nas células tumorais, foi expressa seguindo um score de 0 a 4: 0- sem marcação; 1- intensidade fraca; 2- moderada; 3- forte; 4- muito forte (Quadro 4).

4.5.3- AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA p16INK4a

A avaliação da imunomarcação da proteína p16 foi realizada em todos os 59 casos de CCE. Nessa análise foi verificada a presença ou ausência de imunomarcação, caracterizada pela presença de cor marrom. Registra-se que para ser considerada positiva, a marcação deve ser forte e difusa, tanto no núcleo quanto no citoplasma das células tumorais. É importante destacar que na presença da proteína E7 do HPV, a proteína pRb se torna inativa, perdendo a sua capacidade de controle sobre p16, que se torna superexpressa nas células tumorais. Dessa forma p16 é considerado um biomarcador indireto da infecção pelo HPV (SERRA & CHETTY, 2018). Esse teste teve como objetivo detectar de maneira indireta a presença da infecção ativa pelo vírus HPV nas amostras de tecido avaliados nesse estudo.

4.5.4- AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA E7/HPV

A Avaliação da imunomarcação para a proteína E7 foi realizada nas amostras de câncer em que não foram observadas a imunomarcação para p16. Esse teste foi realizado afim de verificar se as amostras negativas para p16 seriam realmente negativas para o HPV de alto risco oncogênico, uma vez que não possível realizarmos os testes de DNA do HPV devido a falhas pré-analíticas na etapa de fixação das amostras. Dessa forma a IHQ para E7 foi realizado em 7 amostras. Foram consideradas positivos para a proteína os casos que apresentaram forte marcação citoplasmática e/ou nuclear.

4.6 – AQUISIÇÃO DE IMAGENS

A obtenção de imagens das amostras representativas de cortes histológicos de CCE corados pelo HE ou submetidos à IHQ se deu através do: **(i)** Fotomicroscópio *Olympus*, modelo BX51, utilizando a câmera fotográfica digital Q-Color 3 da *Olympus* nos aumentos de 10X, 20X e 40X. no Laboratório LABER coordenado pela Professora Fernanda Radicchi; **(ii)** Fotomicroscópio *Olympus* modelo Bx60, Camera U50 da *Olympus*, no Laboratório de Biologia Celular ; **(iii)** Fotomicroscópio *Zeiss Axiolab 1* equipado com uma Câmera digital *Zeiss Axiovision* (Carl Zeiss, NY, EUA), utilizando-se o Software Zen. Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia, ICB-UFMG, coordenado pela Profa. Cristina Guatimosim Fonseca.

4.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Prisma (*GraphPad Software Inc., CA, EUA-Versão 9.0.0*). Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Foram comparadas a expressão da proteína no núcleo e no citoplasma das células tumorais no caso de α -Inibina e β A, levando-se em consideração os fenótipos celulares, utilizando-se um método não paramétrico *Kruskall-Wallis* para comparar as medianas com intervalo interquartil. Por sua vez, a expressão proteica de MCM7 foi comparada somente no núcleo das células tumorais. Para a comparação entre grupos foi realizado também o método não paramétrico *Kruskall-Wallis* para comparar as medianas com intervalo interquartil. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para as análises de Prognóstico foram usados os testes *Kruskall-Wallis* para comparar as medianas com intervalo interquartil, e *One-way ANOVA*. Através desses testes foram comparadas as porcentagens de marcação nuclear por MCM7 com os critérios associados ao prognóstico. Dentre os critérios de prognóstico avaliados citam-se: idade da paciente, grau de diferenciação do tumor, profundidade da lesão, grau do estadiamento de FIGO, invasão linfonodal, presença de metástases direta e/ou a distância, e óbito em tempo inferior a 5 anos.

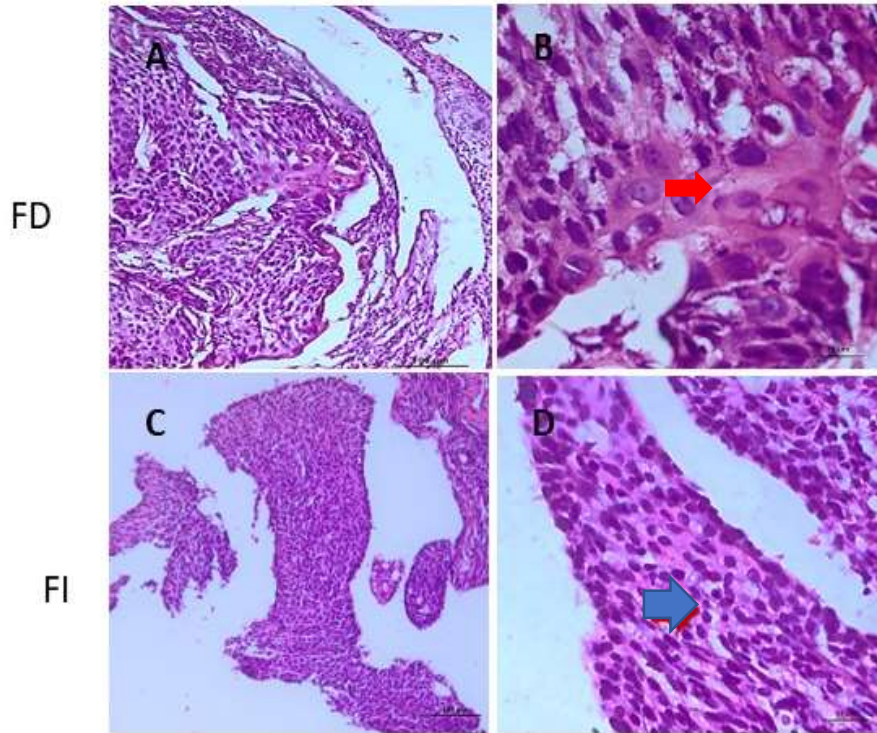
5- RESULTADOS

5.1 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Neste estudo foram analisados um total de 59 amostras de tecido cervical incluídas em parafina. Dessas, 20 foram classificadas como CCE pouco diferenciado (CCEP) e 39 como CCE moderadamente diferenciado (CCEM). Nenhum caso de CCE bem diferenciado pôde ser identificado no Banco de tecidos do Laboratório de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte nos períodos considerados. Registra-se que todas as amostras já haviam recebido um primeiro diagnóstico histopatológico na Instituição de origem. Entretanto uma segunda análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Patologia da Mama, do Departamento de Anatomia Patológica da FM da UFMG com todas as 59 amostras, para a confirmação do diagnóstico para fins desta pesquisa. Vale ressaltar que CCE geralmente exibem considerável heterogeneidade morfológica, apresentando células de origem epitelial com distintos padrões de maturação. Assim observou-se grupos de células com fenótipo diferenciado, apresentando núcleos de formato e tamanho variáveis e citoplasma abundante, compatíveis com maior grau de diferenciação epitelial, associados a grupo de células de fenótipo indiferenciado que apresentavam aspectos morfológicos característicos de células epiteliais imaturas, como núcleos arredondados, que ocupavam grande área no citoplasma celular, com formas e tamanhos mais homogêneos.

Imagens representativas dos diferentes graus de diferenciação das amostras de CCE avaliadas neste estudo, e obtidas de cortes de tecido cervical corados pelo HE com suas diferentes populações celulares são mostradas na Figura 7.

CCEM



CCEP

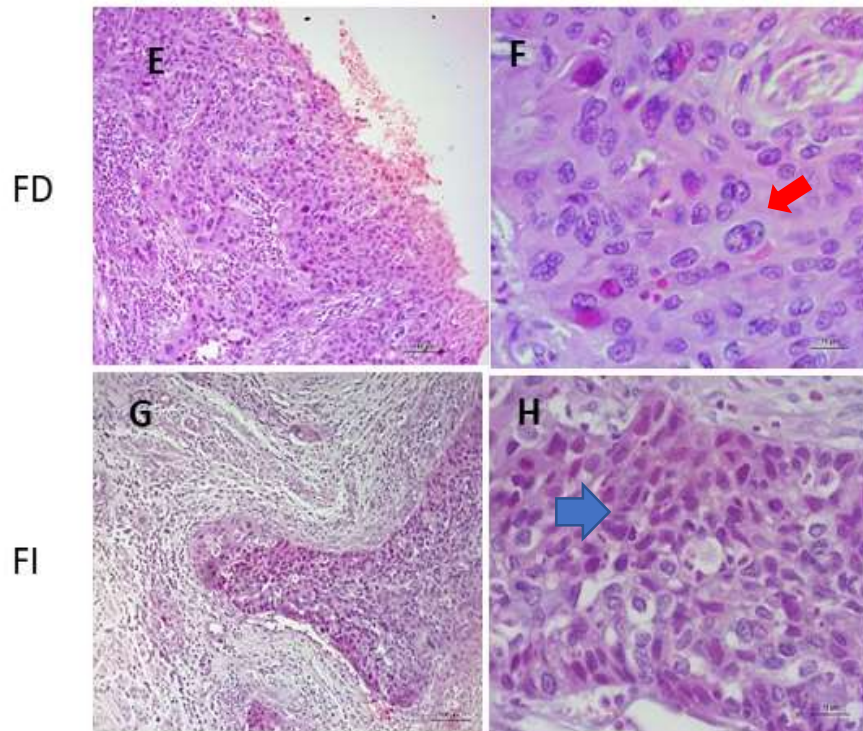


Figura 7: Fotomicrografias (H&E) representativas das lesões cervicais encontradas na *cohort* estudada. As fotomicrografias representam áreas de CCE moderadamente e pobremente diferenciados, apresentando populações celulares com fenótipos diferenciado e indiferenciado em ambas as lesões. As imagens foram obtidas de mesmo caso de CCEM e CCEP. **A-D** (100X-400X): Carcinoma de Células Escamosas moderadamente diferenciado (CCEM) apresentando áreas tumorais contendo células com fenótipos distintos. As células com maior grau de diferenciação (**10B**) apresentam citoplasma amplo, núcleos de formas e tamanhos variados e por vezes áreas de queratinização (seta vermelha). Já as células menos diferenciadas (**10D**), apresentam citoplasma escasso, núcleos ocupando quase todo o citoplasma, com formas e tamanhos mais homogêneos (seta azul). **E-H** (100X-400X) Carcinoma de Células Escamosas pouco diferenciado (CCEP), que também apresentam populações com fenótipos diferenciados e indiferenciados. As células com maior grau de diferenciação (**10F**) apresentam citoplasma amplo, núcleos de formas e tamanhos variados (seta vermelha). Já as células menos diferenciadas (**10H**), apresentam citoplasma escasso, núcleos ocupando quase todo o citoplasma, com formas e tamanhos mais homogêneos (seta azul). FD= Fenótipo diferenciado; FI= Fenótipo Indiferenciado

5.2- ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA α -INIBINA NAS AMOSTRAS DE CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO

A α -inibina é altamente expressa no núcleo de células com fenótipo mais diferenciado

Para essa fase do estudo 33 casos foram inicialmente selecionados. Entretanto as análises foram realizadas em 29 amostras. Um caso foi excluído por se tratar de Carcinoma de tuba uterina. Ainda, devido a problemas pré-analíticos que interferem na reação de Imunohistoquímica, e ao esgotamento das amostras processuais, em 3 amostras não foi possível realizar a análise uma vez que os cortes sempre soltavam da lâmina no decorrer da etapa de reativação à 100°C. Muito provavelmente esse fato tem relação com a etapa de fixação dos tecidos antes de sua inclusão em parafina, que afetou a posterior aderência nas lâminas silanizadas. Para o alcance de fixação ideal é importante avaliar o tipo de fixador utilizado, o seu tamponamento em pH ideal e o tempo de permanência da amostra tecidual no agente fixador (RAMOS-VARA, 2005). Alterações e/ou erros ocorridos nessas etapas, podem dificultar as análises Imunohistoquímicas posteriormente realizadas.

O perfil epidemiológico das 29 pacientes dessa fase do estudo revelou que as idades variaram de 25 a 75 anos (média de $48,3 \pm 17,3$ anos). A faixa etária predominante das 29 mulheres portadoras de CCE incluídas nessa fase foi de 40 a 50 anos o que corresponde a 13 pacientes (40,6%). Com relação ao grau de diferenciação dos carcinomas analisados, 12 foram classificados como pouco diferenciado (CCEP), que correspondiam a 41% das amostras,

enquanto 17 foram classificados como moderadamente diferenciado (CCEM), correspondendo a 59% dos casos.

A avaliação da imunomarcção de todas as lâminas foi realizada por pelo menos dois Morfologistas, e baseada nos parâmetros citados anteriormente. As amostras de tecido foram analisadas por Microscopia Óptica, nas objetivas de 10X e 40X.

Vale ressaltar que, nas 26 amostras selecionadas na fase II desse estudo não foi possível realizar os testes Imunohistoquímicos, pois o anticorpo anti α -inibina se esgotou na primeira fase, não sendo possível adquirir um novo lote deste anticorpo até a finalização da 2ª fase do estudo.

Ao iniciarmos a fase de interpretação das marcações enzimáticas, verificamos que em algumas amostras de CCE (12) era possível observar a presença de áreas de tecido cervical escamoso normal, livres de lesão. Essas regiões geraram então nosso grupo de “controle interno do experimento”. Observou-se marcação de forte intensidade para α -Inibina no núcleo e no citoplasma das células basais normais, além de marcação nuclear mais fraca em células do estrato espinhoso (Figura 8).

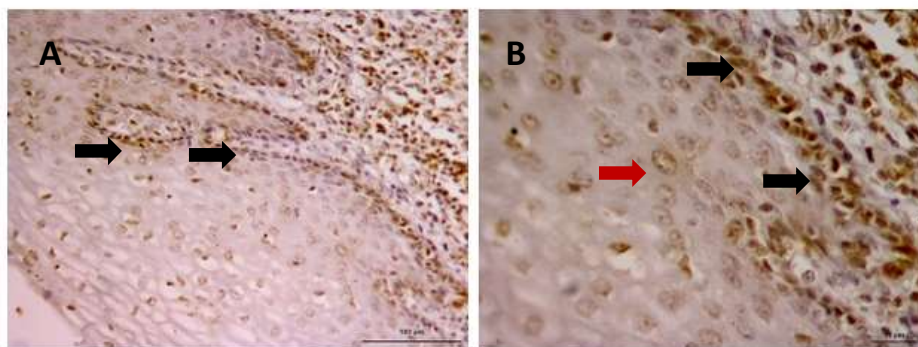


Figura 8: Imunomarcção da proteína α -inibina em áreas de epitélio cervical não alterado. Em A (200X) e B (400X) observa-se marcação com α -inibina de forte intensidade no núcleo e no citoplasma das células basais normais (setas pretas), além de marcação de intensidade mais fraca nuclear do estrato espinhoso (seta vermelha).

Ao avaliarmos a imunorreatividade para a α -inibina nas células escamosas tumorais, percebemos também a marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma de todas as células tumorais. Com o intuito de se analisar o padrão de marcação da α -Inibina em áreas de tumor com distintos graus de diferenciação do CCE, dois parâmetros foram avaliados: **i)** porcentagem de células imunorreativas para α -Inibina e, **ii)** intensidade da marcação das células pelo anticorpo.

Como já descrito anteriormente, os CCE exibem considerável heterogeneidade morfológica, apresentando células com padrões de maturação diferentes. Dessa forma é possível observar em uma mesma amostra de tecido, células com fenótipo diferenciado (apresentando núcleos de formato e tamanho variáveis e citoplasma abundante), associadas às células de fenótipo indiferenciado, que apresentam aspectos morfológicos característicos de células imaturas (com núcleos arredondados, ocupando grande área no citoplasma celular, com formas e tamanhos mais homogêneos). Destaca-se, que durante a fase de análise da imunomarcção por IHQ, foi observado que os ninhos tumorais compostos por células morfológicamente mais diferenciadas apresentavam diferenças relevantes quanto ao padrão de imunomarcção, em relação ao padrão observado em ninhos compostos por células de fenótipo indiferenciado, e que, por essa razão, tais áreas foram analisadas separadamente. A partir dessa importante observação, analiticamente foram considerados 2 distintos grupos celulares denominados Fenótipo diferenciado (FD) e Fenótipo indiferenciado (FI). Os parâmetros foram então analisados separadamente para cada fenótipo celular presente nas amostras de CCE classificadas como moderadamente (Tabela 2) e pobremente (Tabela 3) diferenciadas.

A Tabela 2 apresenta os resultados de imunomarcção para α -Inibina obtidos para os casos de CCEM (17) considerando-se as 2 populações de células tumorais, FD e FI, presentes nas amostras.

Observamos alta porcentagem, de casos com marcação celular superior a 75% (Score 4) no núcleo (65% das amostras) e principalmente no citoplasma (88% das amostras) das células com fenótipo diferenciado. Com relação ao parâmetro intensidade de células marcadas, 12 (em 17) casos apresentaram marcação moderada (Score 2) ou forte (Score 3) no núcleo das células com fenótipo diferenciado o que correspondeu a 70% das amostras analisadas. Células de fenótipo indiferenciado exibiram menor número de células com marcação nuclear nos Scores 3 e 2.

Tabela 2: Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para α -Inibina em amostras de CCEM (N=17)

| PARÂMETROS | LOCAL DA MARCAÇÃO POR FENÓTIPO CELULAR | SCORE 0 | SCORE 1 | SCORE 2 | SCORE 3 | SCORE 4 |
|---------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| % DE MARCAÇÃO | NÚCLEO FD | 0 (0%) | 2(12%) | 2(12%) | 2(12%) | 11(65%) |
| | FI | 6(35%) | 0(0%) | 0(0%) | 3(18%) | 8(47%) |

| | | | | | | | |
|-------------------------|------------|----|--------|--------|--------|--------|---------|
| | CITOPLASMA | FD | 0(0%) | 1(6%) | 0(0%) | 1(6%) | 15(88%) |
| | | FI | 6(35%) | 0(0%) | 0(0%) | 2(12%) | 9(53%) |
| INTENSIDADE DE MARCAÇÃO | NÚCLEO | FD | 0(0%) | 4(24%) | 6(35%) | 6(35%) | 1(6%) |
| | | FI | 6(35%) | 3(18%) | 3(18%) | 2(12%) | 3(18%) |
| | CITOPLASMA | FD | 0(0%) | 9(53%) | 7(41%) | 0(0%) | 1(6%) |
| | | FI | 6(35%) | 5(29%) | 5(29%) | 0(0%) | 1(6%) |

Legenda: %Células marcadas de acordo com os Scores 0 = sem marcação; 1 = marcação em até 25%; 2 = marcação entre 26 e 50%; 3 = marcação entre 51 a 75%; 4 = marcação acima de 75%. **Intensidade de marcação observada de acordo com os Scores:** 0 = ausência de marcação; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte. FD = fenótipo diferenciado; FI = fenótipo indiferenciado.

Nas micrografias da Figura 9 são apresentadas as imagens obtidas de uma amostra representativa de CCEM, onde é possível observar ninhos tumorais com células de fenótipo diferenciado e indiferenciado, com padrões específicos de marcação marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB) no núcleo e no citoplasma. Na amostra de CCEM considerada, observa-se elevada porcentagem de células marcadas (núcleo e citoplasma), tanto na população FD (9 A-C) quanto FI (9 E-G). Nas células de fenótipo diferenciado (à esquerda na imagem) a intensidade de marcação citoplasmática é frequentemente moderada além de intensidade de marcação nuclear de forte intensidade, enquanto que nas células representando o fenótipo indiferenciado (à direita na imagem) as marcações tanto do núcleo quanto do citoplasma mostram intensidade mais fraca.

Dessa forma é possível afirmar que nos casos de CCEM, a porcentagem de células marcadas é maior nas células com FD, que apresentam ainda elevada intensidade de marcação nuclear.

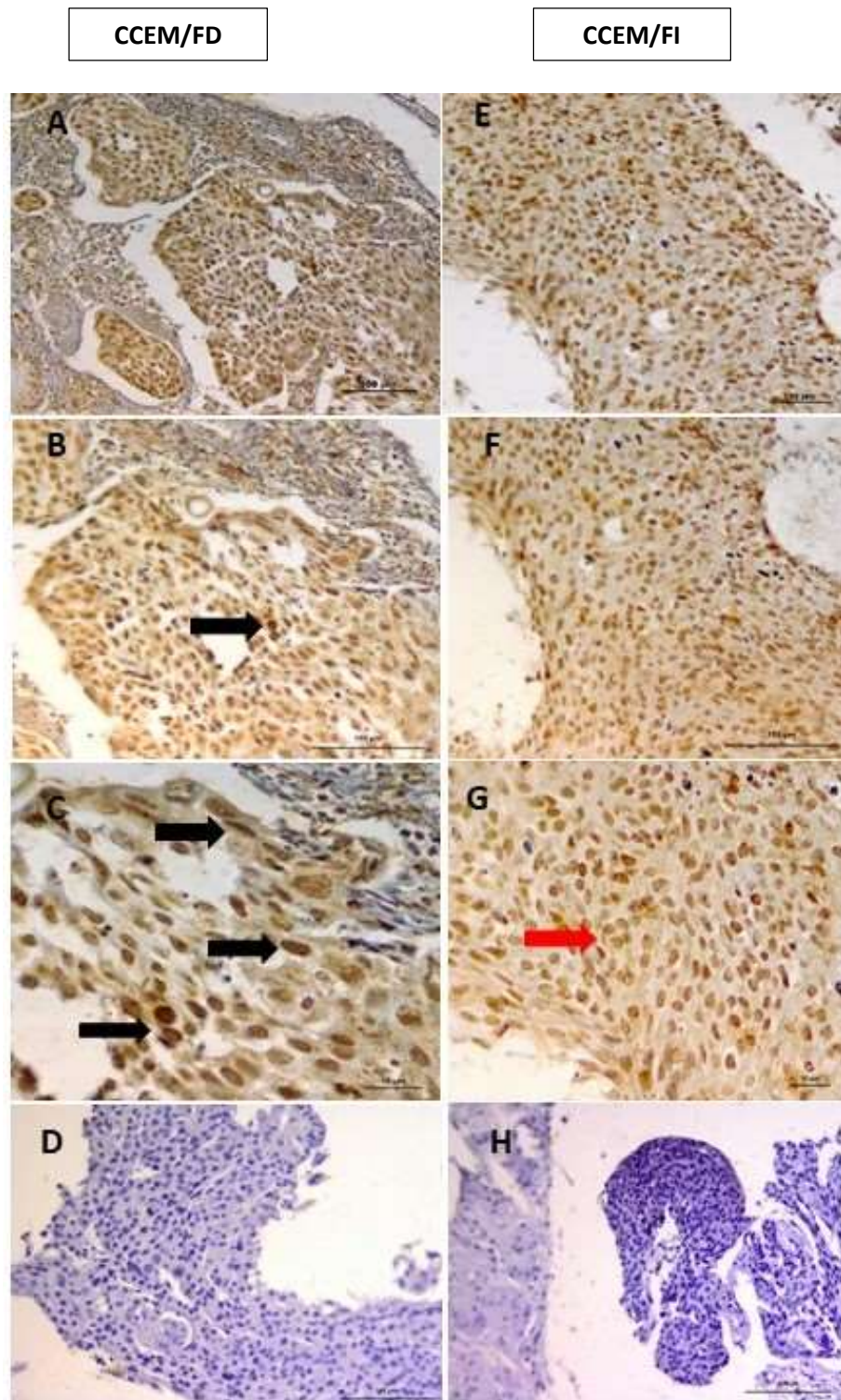


Figura 9: Imunomarcção da proteína α -inibina em amostra de Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM), representando as células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. As figuras A, B e C (aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente), representam a Imunomarcção para α -inibina no núcleo e no citoplasma de células escamosas com **FD: Observar a presença de massa tumoral no estroma do tecido cervical formada por células com núcleos de diferentes tamanhos, por vezes irregulares e com citoplasma amplo. Marcação nuclear de forte intensidade (setas pretas). O citoplasma das células apresenta marcação**

moderada de coloração marrom, em todas as células atípicas. As figuras **E**, **F** e **G** (aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente), representam a Imunomarcação para α -inibina no núcleo e no citoplasma de células escamosas com **FI**: Observar a presença de massa tumoral no estroma do tecido cervical formada por células com núcleos de tamanhos regulares e com escassez de citoplasma. Marcação nuclear de intensidade fraca /moderada (seta vermelha). O citoplasma escasso das células apresenta marcação moderada de coloração marrom em todas as células atípicas. As figuras **D** e **H** (aumento de 200X) são controles negativos da reação de imunohistoquímica, obtidos pela omissão do anticorpo primário.

Os resultados de marcação para α -Inibina obtidos nas células com fenótipo diferenciado e indiferenciado nas amostras de CCEP avaliadas estão apresentados na Tabela 3.

Com relação à porcentagem de células marcadas verificou-se que ambos os fenótipos FD (58%) e FI (50%) apresentaram proporção equivalente de núcleos marcados com o *Score* 4 (marcação acima de 75% das células tumorais). Houve maior porcentagem de amostras de CCEP que apresentaram *Score* 4 de marcação citoplasmática (75% para o FD e 58% para o FI). Especialmente no FD, a marcação citoplasmática foi maior (75%) do que a nuclear (58%).

Em relação ao parâmetro intensidade de marcação, observamos uma redução no número de amostras de CCEP com índice de marcação 2 (moderado) e 3 (forte), na subpopulação com FD. Verificamos um aumento da intensidade de marcação para α -inibina em células do fenótipo indiferenciado (FI) no CCEP, com 34% e 50% das células exibindo *Scores* 2 e 3 de marcação nuclear e citoplasmática (Tabela 3), em comparação à intensidade nuclear (30%) e citoplasmática (29%) apresentadas por células com FI no CCEM (Tabela 2).

Curiosamente, células tumorais com FD apresentaram menor porcentagem de marcação nuclear e citoplasmática com *Scores* 2 e 3 (42% e 34%, respectivamente; Tabela 3), no CCEP do que células com FD no CCEM (nuclear 75%, citoplasmática 41%; Tabela 2).

Tabela 3: Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para α -Inibina em amostras de CCEP (N=12)

| PARÂMETROS | LOCAL DA MARCAÇÃO POR FENÓTIPO CELULAR | SCORE 0 | SCORE 1 | SCORE 2 | SCORE 3 | SCORE 4 | |
|-------------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| % DE MARCAÇÃO | NÚCLEO | FD | 3(26%) | 1(8%) | 1(8%) | 0(0%) | 7(58%) |
| | | FI | 5(42%) | 0(0%) | 0(0%) | 1(8%) | 6(50%) |
| | CITOPLASMA | FD | 3(26%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 9(75%) |
| | | FI | 5(42%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 7(58%) |
| INTENSIDADE DE MARCAÇÃO | NÚCLEO | FD | 3(26%) | 3(26%) | 5(42%) | 0(0%) | 1(8%) |
| | | FI | 5(42%) | 0(0%) | 2(17%) | 2(17%) | 3(26%) |
| | CITOPLASMA | FD | 3(26%) | 5(42%) | 2(17%) | 2(17%) | 0(0%) |
| | | FI | 5(42%) | 1(8%) | 4(33%) | 2(17%) | 0(0%) |

Legenda: %Células marcadas de acordo com os Scores: 0 = sem marcação; 1 = marcação em até 25%; 2 = marcação entre 26 e 50%; 3 = marcação entre 51 a 75%; 4 = marcação acima de 75%. **Intensidade de marcação observada de acordo com os Scores:** 0 = ausência de marcação; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte. FD = fenótipo diferenciado; FI = fenótipo indiferenciado.

A Figura 10 exibe fotomicrografias obtidas de amostra de câncer com diagnóstico histológico de CCEP, onde é possível observar células com fenótipo diferenciado e indiferenciado, com marcação marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB) no núcleo e no citoplasma.

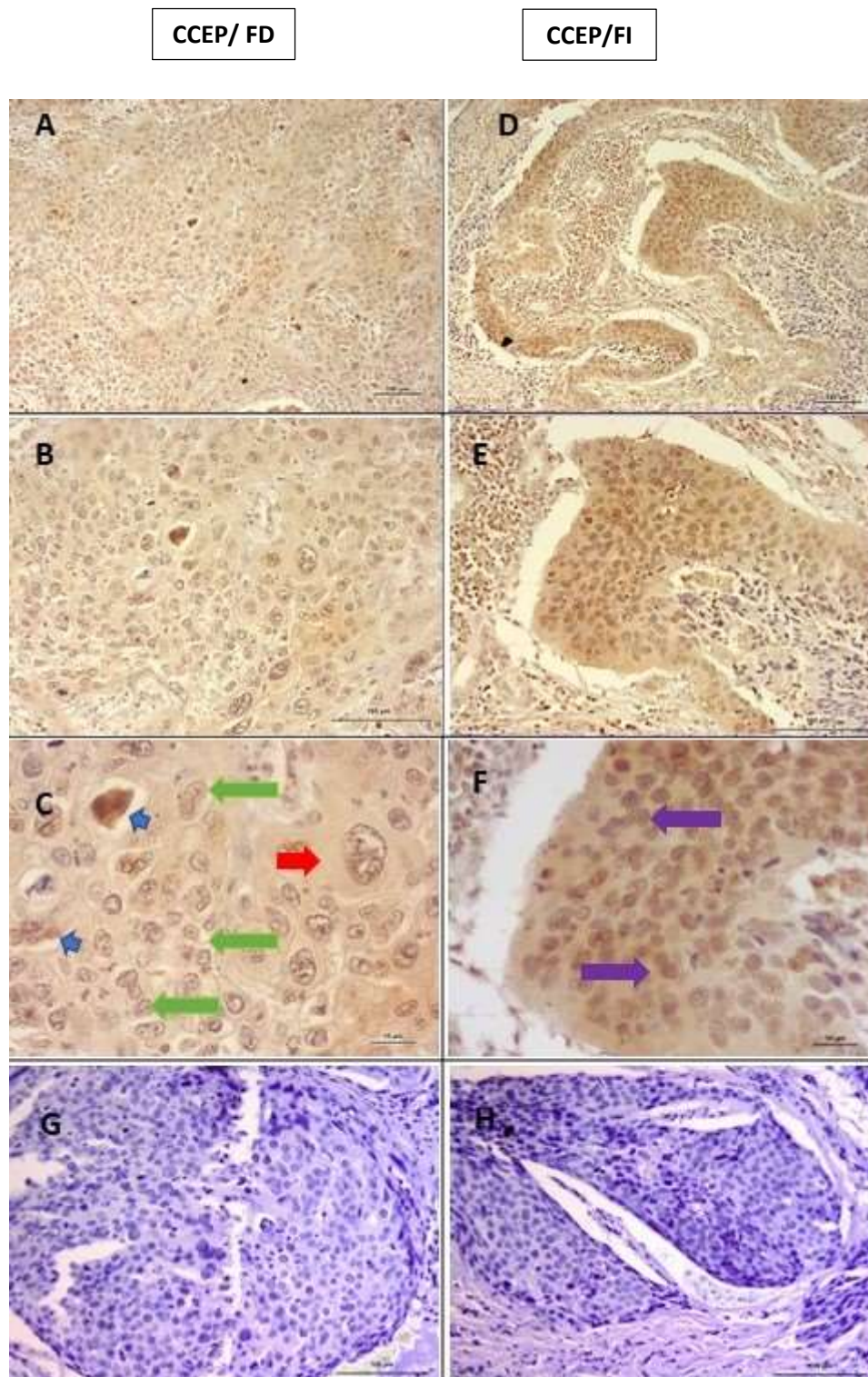


Figura 10: Imunomarcção da proteína α -inibina em amostra de Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP), representando as células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. As figuras A, B e C, nos aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente, representam a imunomarcção para α -inibina no núcleo e no citoplasma de células escamosas com **FD: observar a presença de massa tumoral no estroma do tecido cervical formada por células com núcleos de diferentes tamanhos, eventualmente irregulares e com citoplasma amplo. Observa-se grande número de células marcadas no citoplasma com intensidade moderada (seta**

vermelha). Marcação nuclear é observada nesta imagem em poucas células, com intensidade fraca/moderada (setas azuis). Há um predomínio de núcleos sem marcação (setas verdes). As figuras **D**, **E** e **F** nos aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente, representam a Imunomarcção para α -inibina no núcleo e no citoplasma de células escamosas com **FI**: Observar a presença de massa tumoral no estroma do tecido cervical formada por células com núcleos de tamanhos regulares com escassez de citoplasma. O citoplasma das células apresenta marcação moderada/forte de coloração marrom em todas as células atípicas. Verifica-se marcação nuclear de intensidade moderada/forte (setas roxas). As figuras **G** e **H** (aumento de 200X) são controles negativos da reação de imunohistoquímica, obtidas pela omissão do anticorpo primário.

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos pelas análises estatísticas utilizando-se um método não paramétrico (*Mann Whitney test*- mediana com intervalo interquartil). Foram realizadas comparações entre a porcentagem de células marcadas no núcleo e citoplasma, nos casos de CCEM e CCEP, considerando os fenótipos diferenciado (FD) e indiferenciado (FI). Foi observado significância estatística nos casos de CCEM, onde houve uma maior porcentagem de células com fenótipo diferenciado (FD) com marcação no citoplasma, em comparação com as de fenótipo indiferenciado (FI) ($p < 0,05$). As mesmas análises anteriormente citadas, foram realizadas para o parâmetro intensidade de marcação. Não foi observado significância estatística entre elas.

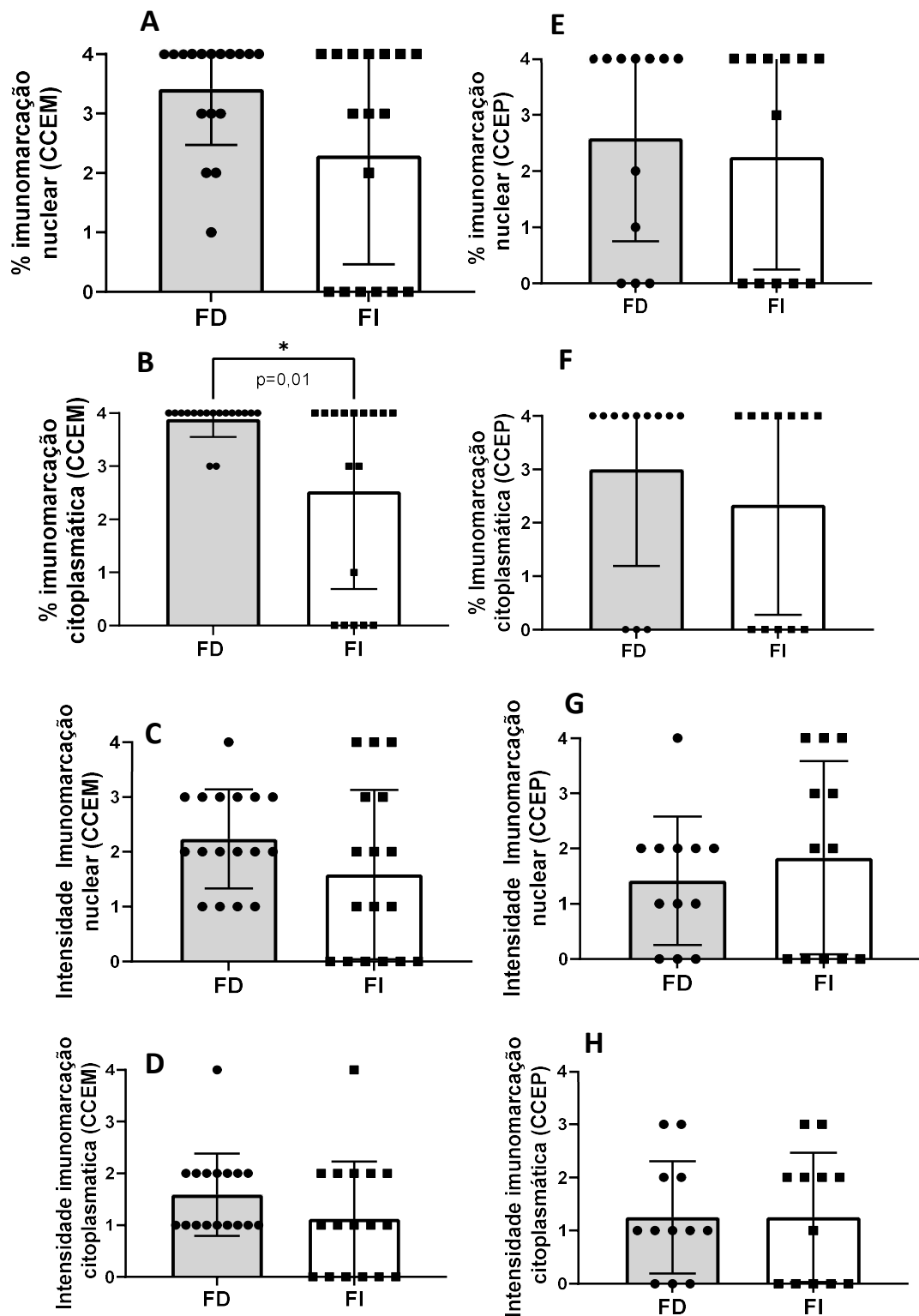


Figura 11: Análises estatísticas (Teste t-Mann-Whitney com mediana) da imunomarcagem da proteína α -inibina. Em amostras de Carcinoma de células escamosas moderadamente e pouco diferenciado, foram comparadas a porcentagem de imunomarcagem e a intensidade nas células de fenótipo diferenciado com aqueles de fenótipo indiferenciado. Observou-se significância estatística na porcentagem de imunomarcagem citoplasmática no CCEM, nas células de fenótipo diferenciado em relação ao fenótipo indiferenciado ($p < 0,05$) (11B).

A Figura 12 apresenta os dados referentes à análise comparativa da intensidade de imunomarcção nuclear nas células de fenótipo diferenciado (12A) e indiferenciado (12B) no CCEM em relação ao CCEP, por método não paramétrico (*Mann-Whitney test*- mediana com intervalo interquartil). Verificou-se que houve redução do Score da intensidade de marcação nuclear nas células de FD no CCEP, quando comparado às células FD do CCEM (12A) ($p < 0,05$). Não foi encontrada significância estatística na intensidade de marcação nuclear de células tumorais de fenótipo FI entre amostras de CCEM e CCEP (12B).

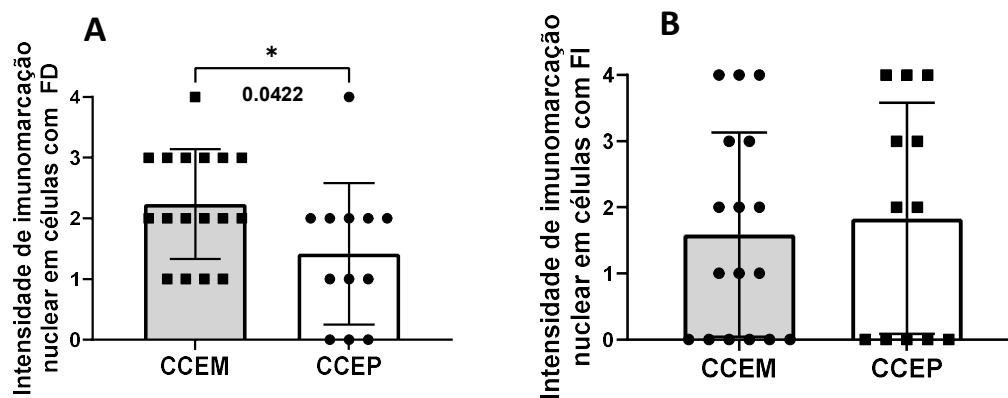


Figura 12: Análises estatísticas (Teste t-Mann-Whitney com mediana) da imunomarcção nuclear da proteína α -inibina nas células FD em CCEM e CCEP. Comparação da intensidade de imunomarcção nuclear nas células de fenótipo diferenciado e indiferenciado, em amostras de carcinoma de células escamosas moderadamente e pouco diferenciado. Observou-se significância estatística na análise referente às células de fenótipo diferenciado ($p < 0,05$); (12A).

5.3- ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA SUBUNIDADE βA NAS AMOSTRAS DE CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO

βA é altamente expresso no citoplasma de células com fenótipo mais diferenciado

Assim como observado para a imunomarcção de α -inibina, foi possível visualizar a presença de áreas de tecido cervical escamoso normal, livres de lesão. Tais áreas foram utilizadas como “grupo controle interno” de estudo para βA , permitindo-nos analisar o perfil de expressão da proteína no tecido cervical normal. Observou-se forte marcação para βA no

núcleo e no citoplasma das células no terço basal do epitélio escamoso, enquanto no terço intermediário do tecido a marcação é apenas citoplasmática, e de baixa intensidade (Figura 13).

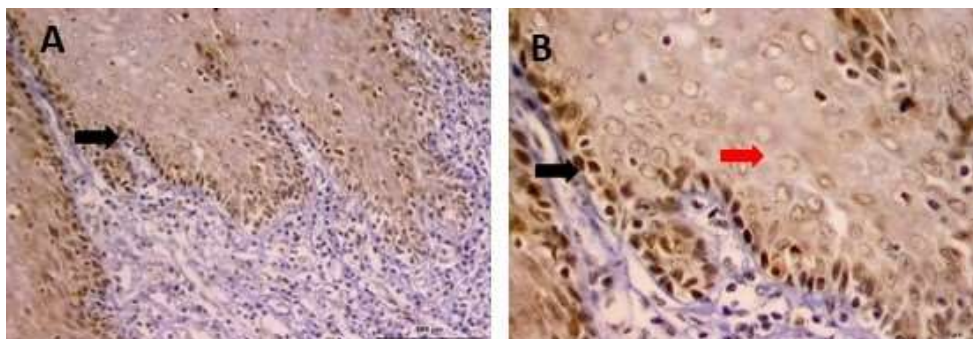


Figura 13: Imunomarcção da proteína β A em áreas de epitélio cervical não alterado. Em A (200X) e B (400X), observa-se marcação para β A no núcleo (seta preta) e citoplasma das células basais normais de forte intensidade. No estrato espinhoso (terço intermediário) além de observa-se apenas marcação citoplasmática de intensidade fraca (seta vermelha).

Para as análises de imunomarcção para a proteína β A foram usados os mesmos parâmetros descritos para a α -inibina. As análises foram realizadas nas células de fenótipos diferenciado e indiferenciado separadamente, de acordo com o grau de diferenciação do tumor, como mostrado as Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Resultados dos parâmetros analisados na Imunohistoquímica para β A em amostras de CCEM (N=17)

| PARÂMETROS | LOCAL DA MARCAÇÃO POR FENÓTIPO CELULAR | | SCORE 0 | SCORE 1 | SCORE 2 | SCORE 3 | SCORE 4 |
|-------------------------|--|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | % DE MARCAÇÃO | NÚCLEO | FD | 1(6%) | 8(47%) | 1(6%) | 3(18%) |
| FI | | | 7(41%) | 0(0%) | 4(24%) | 2(12%) | 4(24%) |
| CITOPLASMA | | FD | 0(0%) | 0(0%) | 1(6%) | 2(12%) | 13(76%) |
| | | FI | 6(35%) | 0(0%) | 1(6%) | 0(0%) | 10(59%) |
| INTENSIDADE DE MARCAÇÃO | NÚCLEO | FD | 1(6%) | 9(53%) | 2(12%) | 4(24%) | 1(6%) |

| | | | | | | |
|------------|----|--------|--------|---------|--------|--------|
| | FI | 7(41%) | 2(12%) | 4(24%) | 1(6%) | 3(18%) |
| CITOPLASMA | FD | 0(0%) | 1(6%) | 10(59%) | 4(24%) | 2(12%) |
| | FI | 6(35%) | 4(24%) | 3(18%) | 1(6%) | 3(18%) |

Legenda: %Células marcadas de acordo com os Scores 0 = sem marcação; 1 = marcação em até 25%; 2 = marcação entre 26 e 50%; 3 = marcação entre 51 a 75%; 4 = marcação acima de 75%. **Intensidade de marcação observada de acordo com os Scores:** 0 = ausência de marcação; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte. FD = fenótipo diferenciado; FI = fenótipo indiferenciado.

A Tabela 4 apresenta os dados do padrão de marcação para β A obtidos nos casos de CCEM. Em relação à porcentagem de células marcadas, existe uma evidente prevalência de células com FD em amostras de CCEM (17; 76% dos casos) apresentando marcação citoplasmática em acima de 75% das células atípicas. Destaca-se ainda que não foi observado nenhum caso onde a porcentagem de marcação citoplasmática fosse inferior a 25% de células. Da mesma forma, observou-se elevado número de amostras de CCEM (59%) apresentando maior Score (4) de marcação citoplasmática em células com fenótipo indiferenciado (FI). Por sua vez houve redução do Score de marcação no núcleo das células com fenótipo diferenciado com predomínio de marcação no Score 1 (correspondente a 25% de marcação). Tal redução também foi observada nas células com FI, onde grande número de amostras não exibiu marcação nuclear de β A (41% dos casos).

Com relação à intensidade podemos observar que 14 (de 17) amostras apresentaram uma intensidade de marcação entre moderada a forte no citoplasma das células com fenótipo diferenciado, o que corresponde a 83% dos casos de CCEM. Em contraste, a marcação citoplasmática fraca ou ausente em células com FI foi observada em quase 60% (10/17) das amostras de CCEM. Baixa intensidade de marcação nuclear para β A também foi verificada tanto em células tumorais com fenótipo diferenciado (10/17; 59%) quanto indiferenciado (9/11;53%)

Na Figura 14 são apresentadas as fotomicrografias de uma amostra diagnosticada como CCEM, onde é possível observar os ninhos de massa tumoral formado por células de fenótipo diferenciado e indiferenciado, com padrões distintos de marcação para β A de cor marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB), no núcleo e no citoplasma. Observa-se nas células com

fenótipo diferenciado marcação no citoplasma, de intensidade moderada, além de muitos núcleos sem marcação (14C setas pretas). Nas células com fenótipo indiferenciado observa-se marcação citoplasmática mais evidente do que a nuclear, e de intensidade moderada (14G setas vermelhas). No entanto há um predomínio de núcleos sem marcação (14G setas azuis).

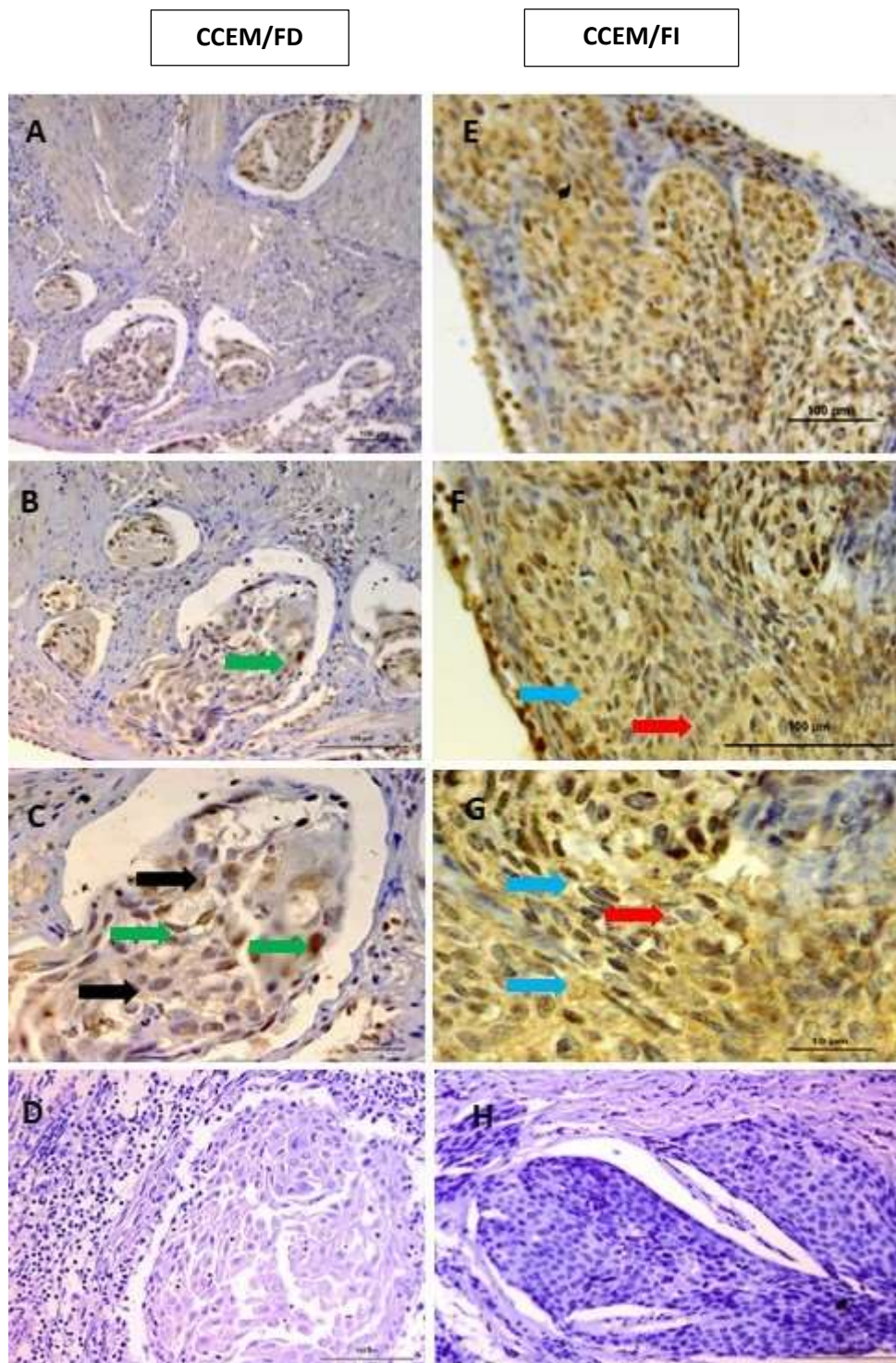


Figura 14: Imunomarcção da proteína β A em amostra de Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (CCEM), representando as células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. As figuras A, B e C, nos aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente, representam a Imunomarcção para β A no núcleo e no citoplasma das células com fenótipo diferenciado (FD). Observa-se a presença de massa tumoral no estroma do tecido cervical formada por células com núcleos de diferentes tamanhos, algumas vezes irregulares e com citoplasma amplo. Pode-se

observar um número grande de núcleos sem marcação (setas pretas), além de alguns outros marcados com intensidade moderada /forte (setas verdes). As figuras **E**, **F** e **G** representam a Imunomarcção para β A, no núcleo e no citoplasma das células com fenótipo indiferenciado (**FI**) nos aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente. Nessa grande população de células, observa-se marcação evidente de intensidade moderada, no citoplasma de todas as células tumorais (setas vermelhas), enquanto muitos núcleos não mostram marcação para β A (setas azuis). As figuras **D** e **H** (200X) representam os controles negativos da reação de imunohistoquímica, obtidos pela omissão do anticorpo primário.

A Tabela 5 mostra os dados relacionados à marcação de β A em amostras de CCEP, considerando-se as duas subpopulações de células tumorais FD e FI.

Tabela 5: Resultados dos parâmetros analisados no teste Imunohistoquímico para β A em CCEP (N=12)

| PARAMENTROS | LOCAL DA MARCAÇÃO POR FENÓTIPO CELULAR | SCORE 0 | SCORE 1 | SCORE 2 | SCORE 3 | SCORE 4 |
|----------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| % DE MARCAÇÃO | NÚCLEO FD | 3(26%) | 2(17%) | 3(26%) | 0(0%) | 4(33%) |
| | NÚCLEO FI | 5(42%) | 0(0%) | 1(8%) | 1(8%) | 5(42%) |
| | CITOPLASMA FD | 3(26%) | 0(0%) | 0(0%) | 1(8%) | 8(67%) |
| | CITOPLASMA FI | 5(42%) | 0(0%) | 0(0%) | 0(0%) | 7(58%) |
| INTENSIDADE MARCAÇÃO | NÚCLEO FD | 3(26%) | 4(33%) | 3(26%) | 2(17%) | 0(0%) |
| | NÚCLEO FI | 5(42%) | 0(0%) | 3(26%) | 2(17%) | 2(17%) |
| | CITOPLASMA FD | 3(26%) | 2(17%) | 1(8%) | 4(33%) | 2(17%) |
| | CITOPLASMA FI | 5(42%) | 0(0%) | 3(26%) | 2(17%) | 2(17%) |

Legenda: %Células marcadas de acordo com os Scores 0 = sem marcação; 1 = marcação em até 25%; 2 = marcação entre 26 e 50%; 3 = marcação entre 51 a 75%; 4 = marcação acima de 75%. **Intensidade de marcação observada de acordo com os Scores:** 0 = ausência de marcação; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte. FD = fenótipo diferenciado; FI = fenótipo indiferenciado.

Em relação à porcentagem de marcação para β A verificou-se prevalência de células com fenótipo diferenciado (FD) nas amostras de CCEP com maior Score de marcação citoplasmática (4), observado em 67% (8/12) das amostras. De forma semelhante, grande número de amostras de CCEP (58%; 7/12) apresentou Score máximo de marcação citoplasmática (4) nas populações de células tumorais imaturas (com FI). Contudo, a porcentagem de marcação nuclear de células com FD (42%; 5/12) e FI (43%; 5/12) apresentou Scores de 0 a 1 (Tabela 5).

Quanto à intensidade de marcação nuclear e citoplasmática das células tumorais com fenótipo FD e FI, destaca-se o grande número de amostras que apresentou marcação citoplasmática forte /muito forte (Scores 3 e 4) de células com FD (50%; 6/12). Porém houve predomínio de ausência ou de fraca marcação nuclear de β A em células com FD (59%; 7/12) e FI (42%; 5/12).

A Figura 15 exibe micrografias obtidas de uma amostra com diagnóstico histológico de CCEP, onde é possível observar células com fenótipo diferenciado e indiferenciado com marcação marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB) no núcleo e no citoplasma. Verifica-se nas células com fenótipo diferenciado marcação no citoplasma, de intensidade moderada (15B setas laranjas), além de muitos núcleos sem marcação (15C setas verdes). Nas células com fenótipo indiferenciado observa-se em geral marcação citoplasmática mais evidente do que a nuclear, com intensidade variável. No entanto há predomínio de núcleos sem marcação. Nessa amostra de CCEP, há moderada marcação citoplasmática (15F setas vermelhas) e ausência de marcação nuclear (15F setas roxas).

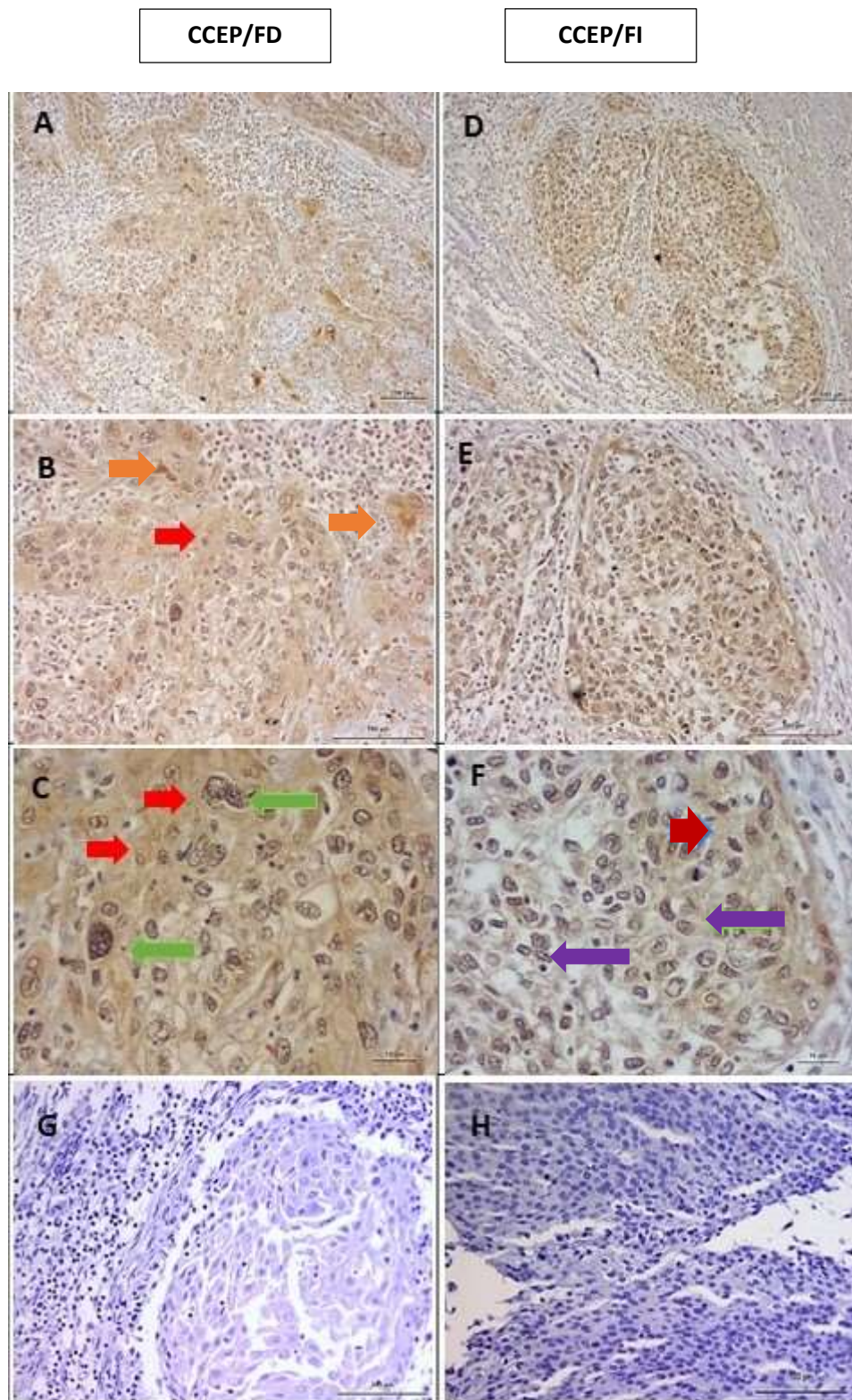


Figura 15: Imunomarcção da proteína β A em amostra de carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (CCEP), representando as células com fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. As figuras A, B e C, nos aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente, representam a Imunomarcção para β A no núcleo e no citoplasma das células com fenótipo diferenciado (FD).

Observa-se a presença de massa tumoral no estroma do tecido cervical formada por células da com núcleos de diferentes tamanhos, as vezes irregulares e com citoplasma amplo. Pode-se observar um número grande de núcleos sem marcação (setas verdes), além de alguns outros marcados com intensidade moderada (setas laranja). As figuras E, F e G representam a Imunomarcção para β A, no núcleo e no citoplasma das células com fenótipo indiferenciado (FI) nos aumentos de 100X, 200X e 400X, respectivamente. Nessa grande população de células, observa-se marcação evidente de intensidade moderada, no citoplasma de todas as células tumorais (seta vermelha), enquanto muitos núcleos não mostram marcação para β A (setas roxas). As figuras G e H (200X) são controles negativos da reação de Imunohistoquímica, obtidas pela omissão do anticorpo primário.

Os resultados de dados não paramétricos obtidos pelo *Mann Whitney test*- mediana com intervalo interquartil, estão representadas na Figura 16. Foram realizadas comparações entre a porcentagem de células marcadas no núcleo e no citoplasma, nos casos de CCEM e CCEP, considerando os fenótipos diferenciado (FD) e indiferenciado (FI). Não foi observada significância estatística nestas análises (Figuras 16A-D). Quando comparamos o parâmetro intensidade de marcação nuclear (16E e F) e citoplasmática (16G e H) nas células de FD e FI, nos casos de CCEM e no CCEP, observamos que houve significância estatística para a intensidade de marcação citoplasmática, nos casos de CCEM, entre os dois fenótipos analisados (16G); ($p < 0,05$). Não foi observado significância estatística para a intensidade de marcação citoplasmática nos fenótipos FD e FI nas amostras de CCEP (16H).

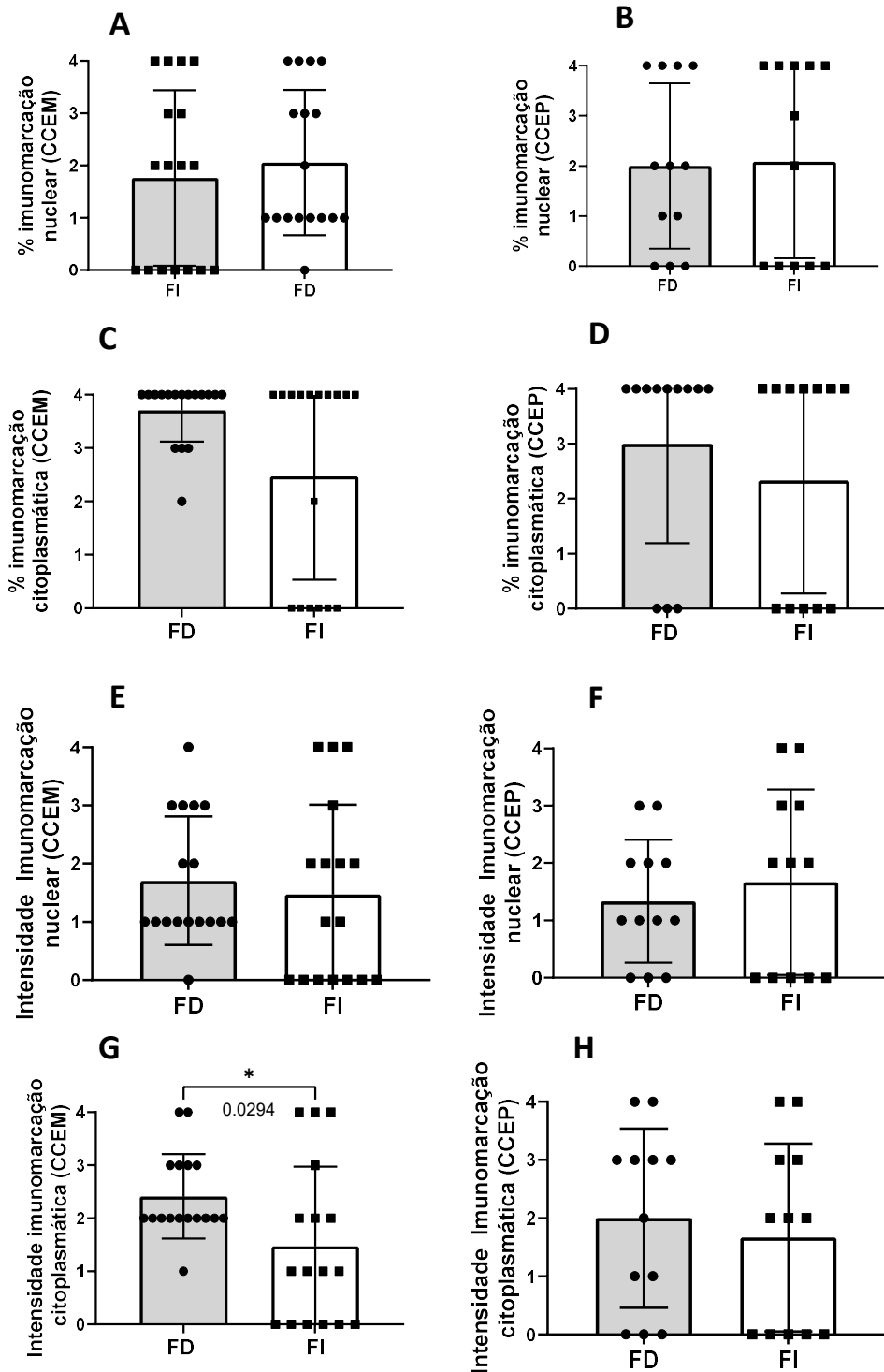


Figura 16: Análises estatísticas (*Mann Whitney test*- mediana) da imunomarcção da proteína β A nas células com fenótipos FD e FI. Comparação entre a porcentagem e a intensidade de marcação nuclear e citoplasmática nas células com fenótipo diferenciado e indiferenciado, nos casos de CCEM (16 A, C, E, G) e CCEP (16B, D, F, H). Foi observada

significância estatística nos casos de CCEM quando a comparamos a intensidade de marcação citoplasmática entre os fenótipos FD e FI ($p < 0,05$) (16G).

Na Figura 17, podemos observar os dados referentes à análise comparativa da intensidade de imunomarcação nuclear nas células de fenótipo diferenciado (A) e de fenótipo indiferenciado (B) no CCEM em relação ao CCEP. Verificou-se que não houve significância estatística nestas análises.

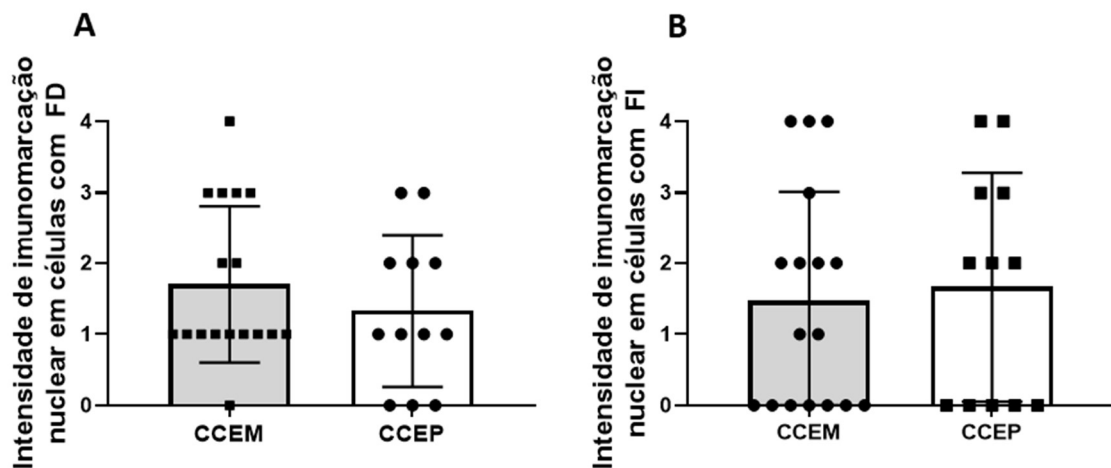


Figura 17: Análises estatísticas (*Mann Whitney test- mediana*) da imunomarcação da proteína βA nas células FD em CCEM e CCEP. Comparação da intensidade de imunomarcação nuclear nas células de fenótipo diferenciado (FD) e indiferenciado (FI), em amostras de carcinoma CCEM e CCEP. Não foi verificada significância estatística nas análises realizadas.

5.4- ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEINA MCM7 NAS AMOSTRAS DE CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO

5.4.1- MARCAÇÃO POR MCM7 E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO DAS PACIENTES

Marcação nuclear para MCM7 demonstrou associação direta com os fatores clínicos de prognóstico

Para composição do grupo amostral que seria submetido à avaliação do perfil de expressão da proteína MCM7 (N=59), as amostras de câncer foram obtidas em dois momentos

diferentes. Na primeira fase os laudos foram emitidos de janeiro de 2008 a dezembro de 2011 (n=33). Na segunda fase, os laudos correspondiam ao período de abril de 2019 a janeiro de 2021 (n=26), sendo numerados 59 casos. Desses, um caso foi excluído por se tratar de Carcinoma de tuba uterina. Devido a problemas pré-analíticos processuais, que interferem na reação de Imunohistoquímica, em 1 amostra não foi possível realizar a análise, uma vez que os cortes sempre soltavam da lâmina no decorrer da etapa de reativação à 100°C. Dessa forma, 57 amostras de CCE foram analisadas para MCM7.

Assim como nas amostras estudadas para as proteínas α -Inibina e β A, ao iniciarmos a fase de interpretação das marcações enzimáticas, verificamos que em algumas amostras de CCE (12) era possível observar a presença de áreas de tecido cervical escamoso normal, livres de lesão. Essas regiões geraram nosso grupo de controle interno do estudo. Observou-se marcação para MCM7 no núcleo das células basais e parabasais normais, de forte intensidade (Figura 18, setas pretas).

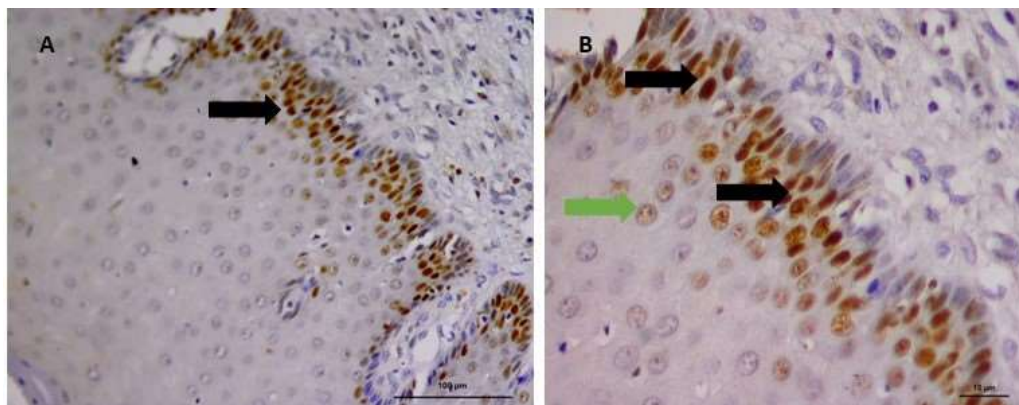


Figura 18: Imunomarcção para a proteína MCM7 em áreas de epitélio cervical não alterado. Em **A** (200X) e **B** (400X) observa-se marcação com MCM7 no núcleo das células basais e parabasais normais (setas pretas), de forte intensidade, além de leve marcação nuclear em raros núcleos das células do estrato espinoso (setas verdes).

Como já descrito, a quantificação da imunorreatividade para MCM7 nas células com alteração morfológica, que exibiam marcação nuclear, foi realizada após digitalização das amostras, por análise morfométrica. Foram contados, em 5 campos constituídos por tecido tumoral, cujas áreas mediam entre 50.000 a 60.000 micrometros, todas as células marcadas e não marcadas, no aumento de 400X. Essas contagens foram catalogadas e por fim obteve-se a média da contagem de células marcadas de cada uma das amostras, como demonstrada na Tabela 6. O perfil de distribuição das células, obtido por análise morfométrica, mostra que a média do número de células contadas (nos 5 campos de cada amostra) variou de 49 a 199 células, o que por sua vez corresponde ao valor médio de 118 ± 38 células, por amostra. A

porcentagem de células marcadas variou de 79,86% a 100%, o que corresponde a uma média de 95,9% \pm 4,74%. Dentre todos os 57 casos, observa-se que 31 exibiram elevado percentual de marcação entre (98% e 100%), o que corresponde a 54% dos casos de CCE.

Para avaliação do parâmetro intensidade de imunomarcação, as análises foram realizadas nas próprias lâminas, por Microscopia óptica, por meio das objetivas de 10X, para obter uma visão mais global da amostra, e depois confirmada em 5 campos, utilizando-se objetiva de 40X. Foram definidos cinco Scores de intensidade de marcação conforme descrito na Seção de Metodologia: 0= sem marcação; 1= fraca intensidade; 2= moderada; 3= forte; 4= muito forte.

O perfil de distribuição desses dados mostra que não houve nenhum caso de CCE que não apresentasse marcação, ou que esta fosse de fraca intensidade. Verificou-se predomínio de intensidade forte à muito forte (43 de 57 casos) o que correspondeu a 75,4% das amostras de CCE. Todos os dados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da análise morfométrica da Imunohistoquímica para MCM7 realizada nas amostras de CCE pouco e moderadamente diferenciado

| <i>Número do caso</i> | <i>mês/ano do diagnóstico</i> | <i>Total de células contadas</i> | <i>Total de células marcadas</i> | <i>%</i> | <i>Total de células não marcadas</i> | <i>%</i> | <i>Intensidade da marcação (Score)</i> | <i>Grau do tumor</i> |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|--|----------------------|
| 6 | 05/10 | 93 | 87 | 92,70% | 7 | 7,30% | 3 | 1 |
| 8 | 03/11 | 57 | 55 | 97,48% | 2 | 2,52% | 4 | 1 |
| 9 | 07/10 | 89 | 75 | 83,36% | 15 | 16,64% | 2 | 1 |
| 11 | 06/11 | 68 | 65 | 94,77% | 4 | 5,23% | 2 | 1 |
| 13 | 06/11 | 128 | 107 | 82,94% | 21 | 16,66% | 3 | 1 |
| 16 | 05/11 | 49 | 45 | 93,38% | 3 | 6,62% | 4 | 1 |
| 19 | 03/11 | 84 | 72 | 86,40% | 11 | 13,60% | 3 | 1 |
| 21 | 07/10 | 66 | 59 | 89,72% | 7 | 10,28% | 2 | 1 |
| 25 | 04/12 | 181 | 178 | 98,58% | 3 | 1,42% | 4 | 1 |
| 29 | 07/11 | 115 | 115 | 99,80% | 0 | 0,20% | 4 | 1 |
| 30 | 01/11 | 125 | 118 | 94,30% | 7 | 5,70% | 3 | 1 |
| 31 | 10/11 | 126 | 126 | 99,40% | 1 | 0,60% | 4 | 1 |
| 32 | 01/11 | 51 | 48 | 93,52% | 3 | 6,48% | 4 | 1 |
| 34 | 07/19 | 133 | 131 | 98,80% | 1 | 1,20% | 3 | 1 |
| 35 | 01/20 | 151 | 144 | 95,00% | 7 | 5,00% | 3 | 1 |
| 36 | 04/20 | 112 | 112 | 100,00% | 0 | 0,00% | 3 | 1 |
| 40 | 05/19 | 112 | 112 | 100,00% | 0 | 0,00% | 3 | 1 |
| 44 | 06/20 | 163 | 155 | 96,00% | 7 | 4,00% | 4 | 1 |
| 47 | 05/19 | 144 | 143 | 99,40% | 1 | 0,60% | 3 | 1 |
| 55 | 08/19 | 94 | 94 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 1 |

| | | | | | | | | |
|----|-------|-----|-----|---------|----|--------|---|---|
| 1 | 02/11 | 104 | 91 | 87,50% | 13 | 12,50% | 3 | 2 |
| 2 | 01/08 | 167 | 161 | 96,00% | 7 | 4,00% | 4 | 2 |
| 3 | 05/09 | 75 | 70 | 93,00% | 6 | 7,00% | 4 | 2 |
| 4 | 07/09 | 133 | 122 | 91,62% | 11 | 8,38% | 3 | 2 |
| 5 | 07/09 | 111 | 107 | 96,40% | 4 | 3,60% | 4 | 2 |
| 7 | 09/10 | 158 | 158 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |
| 10 | 03/11 | 123 | 119 | 96,10% | 5 | 3,90% | 2 | 2 |
| 12 | 09/11 | 95 | 90 | 95,46% | 4 | 4,54% | 3 | 2 |
| 15 | 05/11 | 83 | 75 | 89,78% | 8 | 10,22% | 2 | 2 |
| 17 | 07/08 | 52 | 41 | 79,86% | 10 | 20,12% | 2 | 2 |
| 18 | 06/09 | 60 | 59 | 97,30% | 2 | 2,70% | 3 | 2 |
| 20 | 02/11 | 143 | 135 | 94,84% | 8 | 5,16% | 3 | 2 |
| 22 | 09/11 | 146 | 144 | 98,72% | 2 | 1,28% | 2 | 2 |
| 23 | 07/08 | 109 | 106 | 96,64% | 4 | 3,36% | 4 | 2 |
| 24 | 07/09 | 137 | 133 | 97,18% | 4 | 2,82% | 3 | 2 |
| 26 | 12/12 | 193 | 184 | 95,00% | 9 | 5,00% | 4 | 2 |
| 28 | 12/11 | 199 | 197 | 98,92% | 2 | 1,08% | 4 | 2 |
| 33 | 06/10 | 92 | 92 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |
| 37 | 07/19 | 109 | 109 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |
| 38 | 01/21 | 81 | 80 | 98,86% | 1 | 1,14% | 2 | 2 |
| 39 | 12/19 | 112 | 112 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |
| 41 | 05/19 | 83 | 77 | 92,76% | 6 | 7,24% | 4 | 2 |
| 42 | 04/19 | 130 | 128 | 98,20% | 2 | 1,80% | 2 | 2 |
| 43 | 10/20 | 86 | 86 | 99,60% | 0 | 0,40% | 3 | 2 |
| 45 | 05/19 | 186 | 186 | 100,00% | 0 | 0,00% | 3 | 2 |
| 46 | 05/20 | 119 | 116 | 96,28% | 2 | 3,72% | 3 | 2 |
| 48 | 02/20 | 120 | 120 | 99,60% | 0 | 0,40% | 2 | 2 |
| 49 | 01/20 | 134 | 132 | 98,50% | 2 | 1,50% | 2 | 2 |
| 50 | 30/20 | 177 | 177 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |
| 51 | 10/20 | 104 | 104 | 99,40% | 1 | 0,60% | 2 | 2 |
| 52 | 07/19 | 134 | 131 | 97,00% | 3 | 3,00% | 2 | 2 |
| 53 | 03/19 | 82 | 82 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |
| 54 | 08/19 | 123 | 123 | 100,00% | 0 | 0,00% | 5 | 2 |
| 56 | 08/20 | 147 | 145 | 98,50% | 2 | 1,50% | 2 | 2 |
| 57 | 03/19 | 137 | 128 | 93,08% | 9 | 6,92% | 3 | 2 |
| 58 | 02/20 | 183 | 183 | 100,00% | 0 | 0,00% | 3 | 2 |
| 59 | 01/21 | 159 | 159 | 100,00% | 0 | 0,00% | 4 | 2 |

Legenda: grau 1= carcinoma pouco diferenciado; grau 2= carcinoma moderadamente diferenciado

A Figura 19 exibe fotomicrografias obtidas de amostras com diagnóstico histológico de CCEM e CCEP, onde é possível observar marcação exclusivamente nuclear para MCM7, evidenciada com marcação marrom pelo cromógeno Diaminobenzidina (DAB).

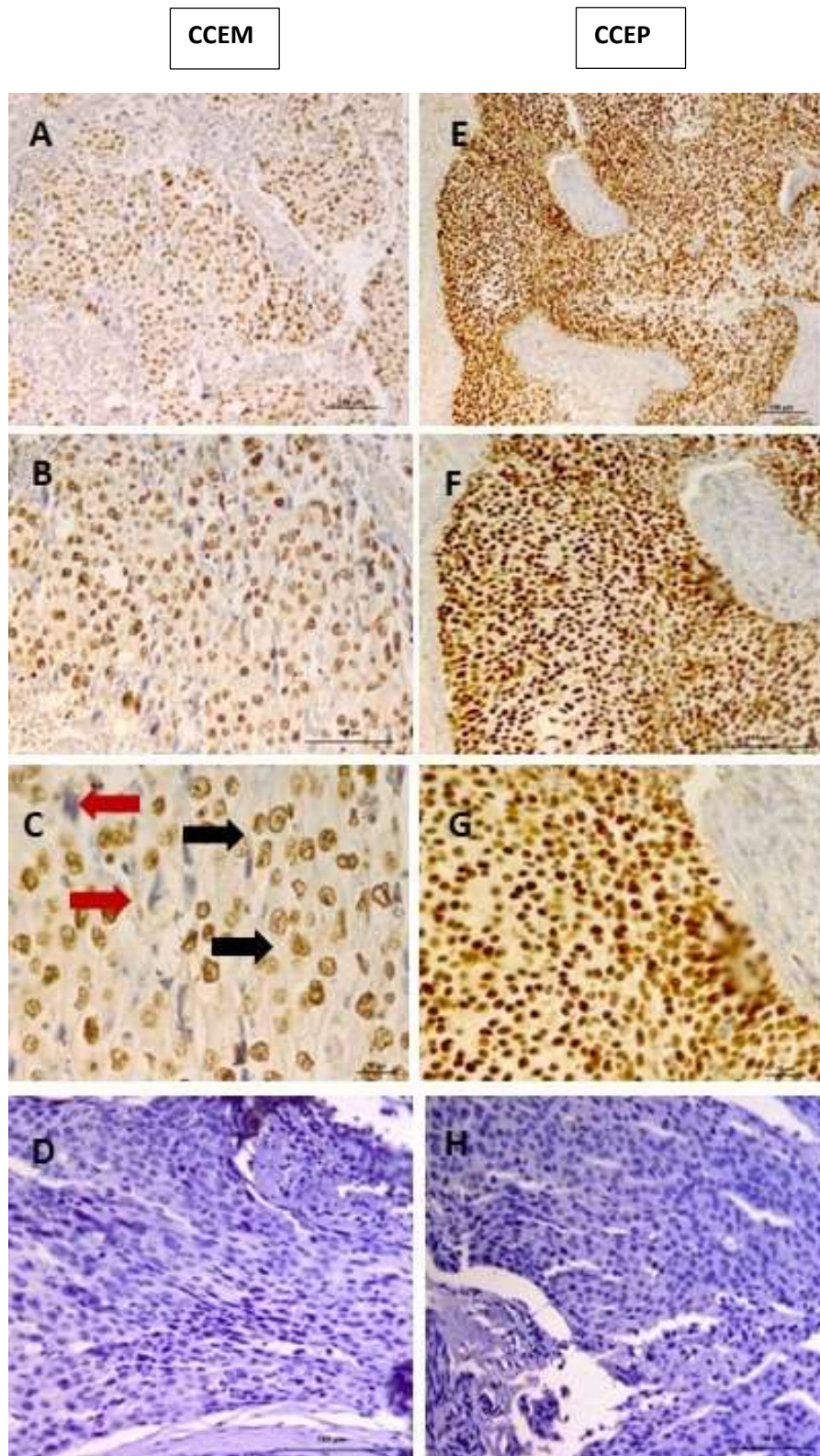


Figura 19: Imunomarcção da proteína MCM7 em amostras com diagnóstico de carcinoma de células escamosas moderadamente e pouco diferenciado, utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A Imunomarcção para MCM7 é observada nos núcleos das células epiteliais. As figuras A, B e C correspondem as imagens obtidas de CCE

moderadamente diferenciado nos aumentos de 100X, 200X e 400X respectivamente. Observar a presença de massas tumorais que invadiram o estroma do tecido cervical (**A, B**) formadas por células de origem epitelial com diferentes graus de atipias, com núcleos de formato irregular e tamanhos variados e com citoplasma amplo (setas pretas). Ainda é possível visualizar algumas células com ausência de marcação (setas vermelhas). As imagens (**E, F e G**) aumentos de (100X, 200X e 400X respectivamente) foram obtidas de CCE pouco diferenciado. Observar a presença de massas tumorais que invadiram o estroma cervical formadas por células epiteliais com característica de imaturidade, com núcleos pequenos de forma e tamanho regulares. As imagens (**D e H**) correspondem aos respectivos controles negativos da reação de Imunohistoquímica, em amostras de CCEM e CCEP, obtidas pela omissão do anticorpo primário.

5.4.2- DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES E ANALISE DO PROGNÓSTICO

O perfil epidemiológico das 57 pacientes revelou que as idades das participantes do estudo variaram de 25 a 92 anos (média de $48,4 \pm 14,5$ anos). A faixa etária predominante desse grupo foi de 40 a 45 anos o que corresponde a 19 pacientes (33,3%).

Tabela 7- Faixa etária das pacientes distribuídas de acordo com as Diretrizes de Rastreamento para o Carcinoma de Colo Uterino estabelecidas pelo Ministério da Saúde (INCA, 2016)

| <i>IDADE</i> | <i>n</i> | <i>%</i> |
|---------------------|----------|----------|
| <25 anos | 0 | 0 |
| 25 a 65 anos | 50 | 88 |
| >65 anos | 7 | 12 |

Com relação ao grau de diferenciação dos carcinomas, das 57 amostras analisadas, 20 foram classificados como pouco diferenciado (CCEP), que correspondiam a 35% das amostras, enquanto 37 foram classificados como moderadamente diferenciado (CCEM), correspondendo a 65% dos casos. Com o objetivo de investigar a associação entre o grau de diferenciação dos tumores e a porcentagem de células marcadas para MCM7, realizamos o *Mann Whitney test*-mediana com intervalo interquartil, não sendo observada significância estatística (Figura 20).

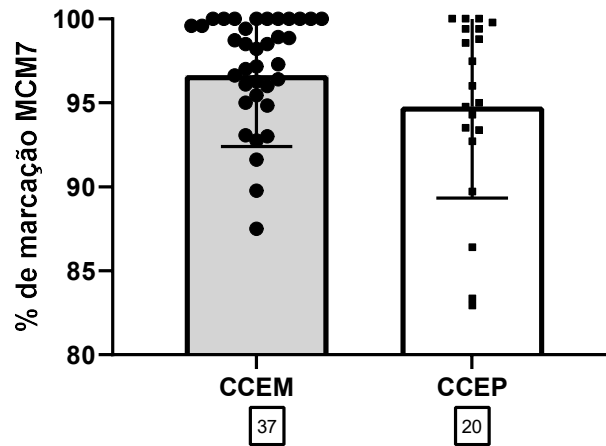


Figura 20: Comparação entre porcentagem de marcação para MCM7 e o grau de diferenciação da lesão: Observa-se distribuição dos valores de porcentagem de marcação sem significância estatística entre os dois diferentes graus de diferenciação dos tumores (*Mann Whitney test*- mediana com intervalo interquartil).

Com o objetivo de investigar a associação entre a porcentagem de células marcadas por MCM7 e a profundidade da lesão foi realizada a medida da profundidade das lesões nas 57 amostras de CCE, que variou de 1mm a 25mm (Média $7,2 \pm 5,25$). Destaca-se que nas biópsias excisionais, a medida foi realizada na maior área de lesão presente na amostra. A análise de Correlação de *Sperman* não demonstrou significância estatística entre a medida da profundidade da lesão e a porcentagem de marcação para MCM7. Os dados estão representados na Figura 21.

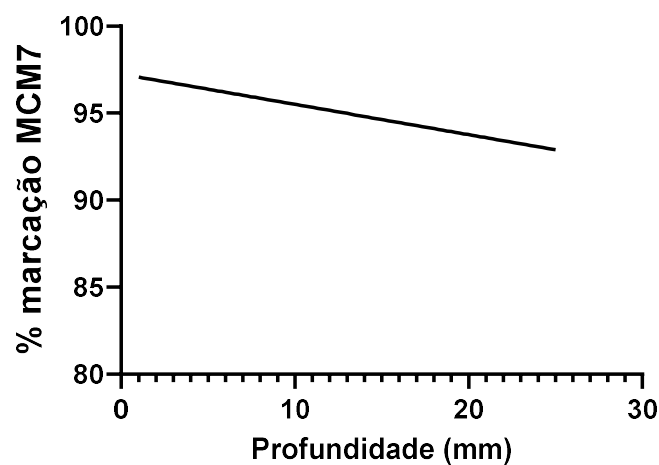


Figura 21:- Correlação da porcentagem de marcação para MCM7 com a profundidade da lesão: Após a avaliação da profundidade nas 58 amostras, não foi observada correlação

estatística entre a profundidade da lesão e a marcação par a MCM7 ($r= 0,03$) ; (Teste de *Sperman*).

Com o objetivo de investigar a associação entre a porcentagem de células marcadas e o grau de estadiamento de FIGO dos tumores foi realizado o teste estatístico *One way Anova* (*Kruskal-Wallis test* mediana com intervalo interquartil). No caso do estadiamento de FIGO, foi possível recuperar as informações em 30 prontuários. O grau de classificação variou de IA1 a IVA2. A tabela 8 mostra a distribuição das pacientes entre os graus I a IV.

Tabela 8- Distribuição das pacientes de acordo com o estágio de Classificação da FIGO

| FIGO | n | % |
|--------------|----------|----------|
| IA1 | 2 | 6,7 |
| IA2 | 1 | 3,3 |
| IB | 1 | 3,3 |
| IB1 | 9 | 30 |
| IB2 | 2 | 6,7 |
| IIB | 2 | 6,7 |
| IIIA | 1 | 3,3 |
| IIIB | 5 | 16,7 |
| IVA | 7 | 23,3 |
| TOTAL | 30 | 100 |

Observou-se maior porcentagem de casos de câncer cervical no estágio IB1(30%). Entretanto, 23% das pacientes já foram diagnosticadas no estágio IV, considerado de pior prognóstico. Foi observada significância estatística nas distribuições de casos dos referidos grupos ($p<0,05$). É possível observar que nas pacientes com estágio IV de CCE, a porcentagem de marcação de 6 dos 7 casos foi de 100%. O teste de múltiplas comparações demonstrou que a diferença foi significativa entre os graus I e IV, com valor de $p=0,02$ (Figura 22).

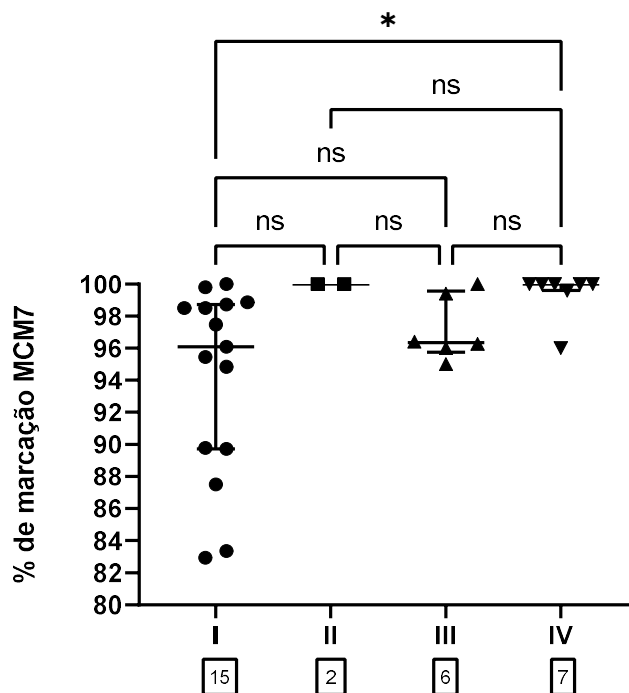


Figura 22:- Porcentagem de marcação para MCM7 de acordo com o grau de classificação da FIGO: Observa-se no estágio IV da FIGO grande concentração de casos de CCE com percentual de marcação de 100% das células tumorais. Destaca-se ainda o estágio I, que mostra uma distribuição variável desses percentuais. O teste de múltiplas comparações demonstrou diferença significativa entre os graus I e IV ($p=0,02$) (Teste *One Way Anova - Kruskal-Wallis test- mediana*)

Com o objetivo de investigar a possível associação existente entre a porcentagem de células marcadas por MCM7 e a invasão de linfonodos foi realizado o *Mann-Whitney test-mediana* com intervalo interquartil. Foi possível recuperar essa informação em 41 prontuários. A invasão linfonodal foi observada em 12 amostras, correspondendo a 29% dos casos. O teste demonstrou que nas pacientes onde houve invasão de células tumorais nos linfonodos, observou-se porcentagem de marcação por MCM7 superior a 95%, enquanto naquelas onde a invasão não foi observada, houve maior distribuição das porcentagens de marcação. Dessa forma foi observada significância estatística com $p=0,008$. (Figura 23).

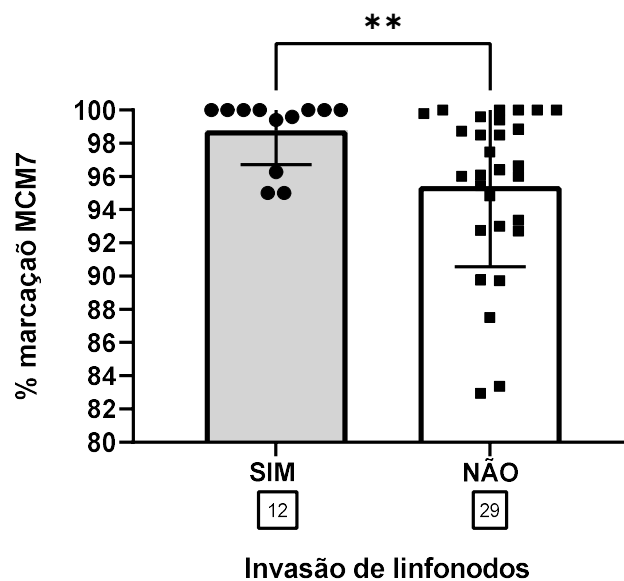


Figura 23:- Porcentagem de marcação para MCM7 e a presença de invasão linfonodal: Observa-se nos casos que evoluíram à óbito, um predomínio de amostras de CCE com porcentagem de marcação de 100% das células tumorais, enquanto nas demais pacientes a distribuição das porcentagens mostrou grande variação nos percentuais ($p < 0,05$); (Teste t. *Mann-Whitney* mediana com intervalo interquartil).

Com o objetivo de investigar a associação entre a porcentagem de células marcadas e a presença de Metástase direta e/ou à distância, foi realizado *Mann-Whitney test*- mediana com intervalo interquartil. A Tabela 9 apresenta os tipos de metástase encontradas assim como a indicação dos órgãos afetados. Destaca-se que a Metástase direta é aquela onde acontece a invasão de tecidos adjacentes ao tumor de origem. A Metástase a distância, por sua vez, caracteriza-se pela invasão das células tumorais em órgãos distantes o tumor primário. Dos 19 casos onde foi observada a presença de Metástase, 7 apresentaram porcentagem de marcação por MCM7 de 100% das células tumorais (37%). Ainda nesse grupo de pacientes, não foi observada nenhum caso com marcação inferior a 95%. Nos casos sem ocorrência de Metástase, observou-se maior distribuição dos valores de porcentagem de marcação, que variou de 82 a 100%. Dessa forma observou-se significância estatística da porcentagem de marcação de MCM7 entre os casos com presença e ausência de Metástase ($p < 0,05$) (Figura 24).

Tabela 9- Distribuição das pacientes de acordo com a presença de Metástase direta e à distância

| Número do Caso | Metástase (Extensão direta) | Metástase (distância) | Invasão Linfonodos | Óbito | Localização |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------|--------------------------|
| 35 | não | sim | sim | NI | Pulmão |
| 26 | sim | sim | sim | NI | Pulmão |
| 31 | sim | sim | sim | NI | Pélvica, Renal |
| 55 | sim | sim | sim | NI | Vagina e pulmão |
| 59 | sim | sim | sim | NI | Pulmão e Cérebro |
| 43 | sim | sim | sim | Sim | Vagina, Bexiga e Reto |
| 46 | sim | sim | sim | sim | Vagina, Bexiga e Pulmão |
| 53 | sim | sim | sim | sim | Bexiga, reto e Intestino |
| 33 | sim | sim | sim | sim | Vagina, Intestino |
| 50 | sim | sim | sim | sim | Bexiga e Pulmão |
| 37 | sim | sim | sim | sim | Bexiga e Reto |
| 40 | sim | sim | sim | não | Vagina, Pulmão e Osso |
| 20 | sim | não | não | NI | Bexiga |
| 5 | sim | não | não | NI | Pélvica |
| 54 | sim | não | não | NI | Bexiga |
| 23 | sim | não | não | NI | Cúpula vaginal |
| 2 | sim | não | não | não | Bexiga |
| 44 | sim | não | não | não | Pélvica |
| 56 | sim | não | | NI | Bexiga |

Legenda: NI= dados não informados

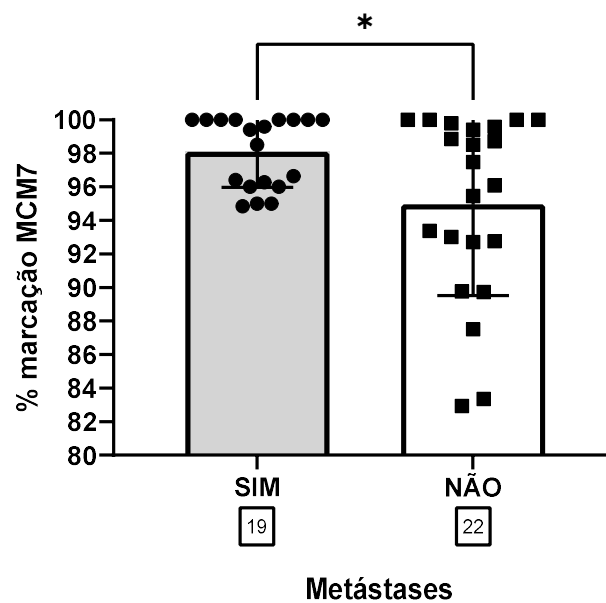


Figura 24:- Porcentagem de marcação para MCM7 e a presença de metástase direta e /ou a distância: Observa-se que nos casos de CCE onde houve metástase, há um predomínio da porcentagem de marcação em 100% nas células tumorais, enquanto naqueles onde não foi observada a metástase, a distribuição do percentual de marcação é variável. ($p < 0,05$); (*Mann-Whitney test*- mediana com intervalo interquartil.).

Com o objetivo de investigar a associação entre a porcentagem de células marcadas e a ocorrência de óbito em tempo inferior a 5 anos, realizamos também o teste de *Mann-Whitney test*- mediana com intervalo interquartil. Foi possível recuperar essa informação em 30 prontuários (Tabela 10). Em 6 das 30 pacientes foi registrado óbito em período inferior a 5 anos, o que correspondeu a 20% dos casos, com tempo médio de 13,8 meses. Ainda foi possível estabelecer uma relação entre o óbito e o estágio da doença, de modo que 5 pacientes (83%) já apresentavam o estágio IV no momento do diagnóstico. Observou-se ainda que, em 5 dessas pacientes, a porcentagem de marcação para MCM7 predominante foi de 100%, o que revelou significância estatística ($p < 0,05$) (Figura 25).

Tabela 10- Perfil dos casos de pacientes com CCE que apresentaram evolução para o óbito

| <i>Número do caso</i> | <i>Data do diagnóstico</i> | <i>Idade</i> | <i>% marcação</i> | <i>FIGO</i> | <i>Data do óbito</i> | <i>Tempo de sobrevivência (meses)</i> |
|-----------------------|----------------------------|--------------|-------------------|-------------|----------------------|---------------------------------------|
| 43 | 10/2020 | 43 | 99,6 | IVA | 11/202 | 9 |
| | | | | | 1 | |
| 46 | 05/2020 | 35 | 96,3 | IIIB | 04/202 | 23 |
| | | | | | 2 | |
| 53 | 03/2019 | 46 | 100,0 | IVA | NI | - |
| 33 | 06/2010 | 68 | 100,0 | IVA | 07/201 | 25 |
| | | | | | 2 | |
| 50 | 03/2020 | 60 | 100,0 | IVA | 08/202 | 5 |
| | | | | | 0 | |
| 37 | 07/2019 | 27 | 100,0 | IVA | 02/202 | 7 |
| | | | | | 0 | |

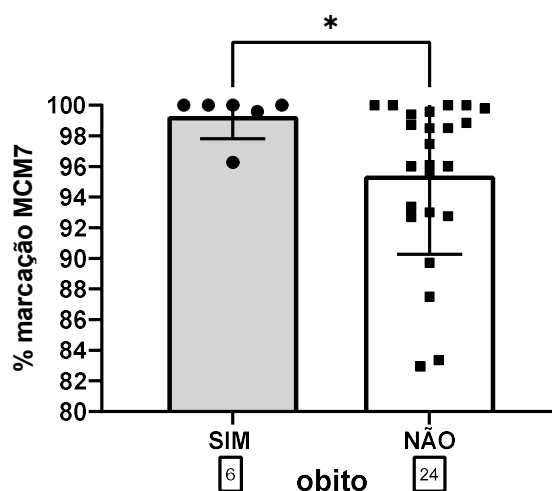


Figura 25:- Porcentagem de marcação para MCM7 e a ocorrência de óbito em tempo inferior a 5 anos: Observa-se predomínio de 100% de marcação em células tumorais nos casos de óbito em período inferior a 5anos. Já nos casos sem ocorrência de óbito, a porcentagem de marcação mostra variação nas porcentagens de marcação ($p < 0,05$); (*Mann-Whitney test*-mediana com intervalo interquartil)

5.5.- ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p16 e E7 do HPV NAS AMOSTRAS DE CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO

Com o objetivo de investigar de forma indireta a presença da infecção pelo HPV nas amostras de CCE, foi realizada Imunohistoquímica para p16. Em todas as amostras do estudo. A imunomarcação de p16 é considerada positiva quando acontece de maneira difusa e homogênea por toda a massa tumoral, como descrito na Seção de Metodologia. Marcações focais são consideradas negativas. Dos 58 casos de CCE, 7 (12%) foram negativos, enquanto 51 (88%) apresentaram resultado positivo para p16 (Figura 29A). A média da porcentagem de marcação para MCM7 nos casos p16 negativo foi de 96,8%, enquanto que os casos p16 positivo, apresentaram média de marcação de 96,5%.

Tabela 11: Distribuição dos casos p16+ e p16- nas amostras de CCE pouco e moderadamente diferenciados

| <i>Idade</i> | <i>% MCM7</i> | <i>p16</i> | <i>Profundidade (mm)</i> | <i>FIGO</i> | <i>Grau</i> |
|--------------|---------------|------------|--------------------------|-------------|-------------|
| 74 | 86,40% | 0 | 4 | IIIB | 1 |
| 40 | 98,58% | 0 | 1 | NI | 1 |
| 59 | 100,00% | 0 | 6 | NI | 2 |
| 46 | 100,00% | 0 | 5 | IVA | 2 |
| 41 | 100,00% | 0 | 6 | IVA | 2 |
| 32 | 93,08% | 0 | 8 | NI | 2 |
| 56 | 100,00% | 0 | 2 | NI | 2 |
| 42 | 89,72% | 1 | 25 | IB2 | 1 |
| 62 | 99,80% | 1 | 5 | IA2 | 1 |
| 60 | 94,30% | 1 | 15 | IB1 | 1 |
| 33 | 99,40% | 1 | 5 | IIIB | 1 |
| 38 | 93,52% | 1 | 3 | IB | 1 |
| 33 | 98,80% | 1 | 15 | NI | 1 |
| 45 | 95,00% | 1 | 15 | NI | 1 |
| 38 | 100,00% | 1 | 25 | NI | 1 |
| 76 | 100,00% | 1 | 5 | IIB | 1 |
| 31 | 96,00% | 1 | 7 | IVA | 1 |
| 92 | 99,40% | 1 | 6 | NI | 1 |
| 72 | 100,00% | 1 | 3 | NI | 1 |
| 46 | 87,50% | 1 | 7 | IB1 | 2 |
| 32 | 96,00% | 1 | 4 | IIIB | 2 |
| 50 | 93,00% | 1 | 3 | NI | 2 |
| 63 | 91,62% | 1 | 3 | NI | 2 |
| 75 | 96,40% | 1 | 3 | IIIB | 2 |

| | | | | | |
|----|---------|---|----|------|---|
| 53 | 100,00% | 1 | 3 | IIIB | 2 |
| 48 | 96,10% | 1 | 14 | IB1 | 2 |
| 32 | 95,46% | 1 | 2 | IB1 | 2 |
| 34 | 89,78% | 1 | 15 | IB2 | 2 |
| 30 | 79,86% | 1 | 15 | NI | 2 |
| 42 | 97,30% | 1 | 3 | IIB | 2 |
| 38 | 94,84% | 1 | 5 | IB1 | 2 |
| 57 | 98,72% | 1 | 4 | IA1 | 2 |
| 52 | 96,64% | 1 | 4 | NI | 2 |
| 37 | 97,18% | 1 | 4 | NI | 2 |
| 70 | 95,00% | 1 | 7 | IIIA | 2 |
| 45 | 98,92% | 1 | 5 | NI | 2 |
| 68 | 100,00% | 1 | 9 | IVA | 2 |
| 27 | 100,00% | 1 | 7 | IVA | 2 |
| 45 | 98,86% | 1 | 8 | IB1 | 2 |
| 53 | 92,76% | 1 | 3 | NI | 2 |
| 63 | 98,20% | 1 | 13 | NI | 2 |
| 43 | 99,60% | 1 | 4 | IVA | 2 |
| 46 | 100,00% | 1 | 1 | IB1 | 2 |
| 35 | 96,28% | 1 | 12 | IIIB | 2 |
| 58 | 99,60% | 1 | 15 | NI | 2 |
| 42 | 98,50% | 1 | 15 | IA1 | 2 |
| 60 | 100,00% | 1 | 4 | IVA | 2 |
| 55 | 99,40% | 1 | 6 | NI | 2 |
| 40 | 97,00% | 1 | 2 | NI | 2 |
| 36 | 98,50% | 1 | 10 | IB1 | 2 |
| 41 | 100,00% | 1 | 4 | IIB | 2 |

Legenda: NI= dados não informados. Grau de diferenciação: 1: CCE pouco diferenciado; 2: CCE moderadamente diferenciado

O *Mann-Whitney test*- mediana com intervalo interquartil também foi realizado para comparar as porcentagens de marcação de MCM7 entre os casos p16+ e p16-. Não foi observada significância estatística nessa análise (Figura 26).

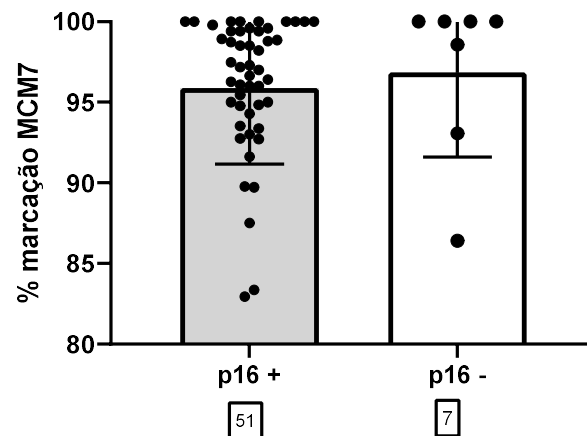


Figura 26:- Porcentagem de marcação para MCM7 e positividade de p16: O teste não mostrou significância estatística, porém percebe-se uma tendência de 100% de marcação de MCM7 em células tumorais nos casos com ausência de marcação para p16 (*Mann-Whitney test*-mediana com intervalo interquartil).

Em todos os casos de CCE onde a marcação para p16 foi negativo, realizamos análise Imunohistoquímica para a proteína E7 do HPV, afim de confirmar a ausência ou a presença de atividade do vírus (Figura 27).

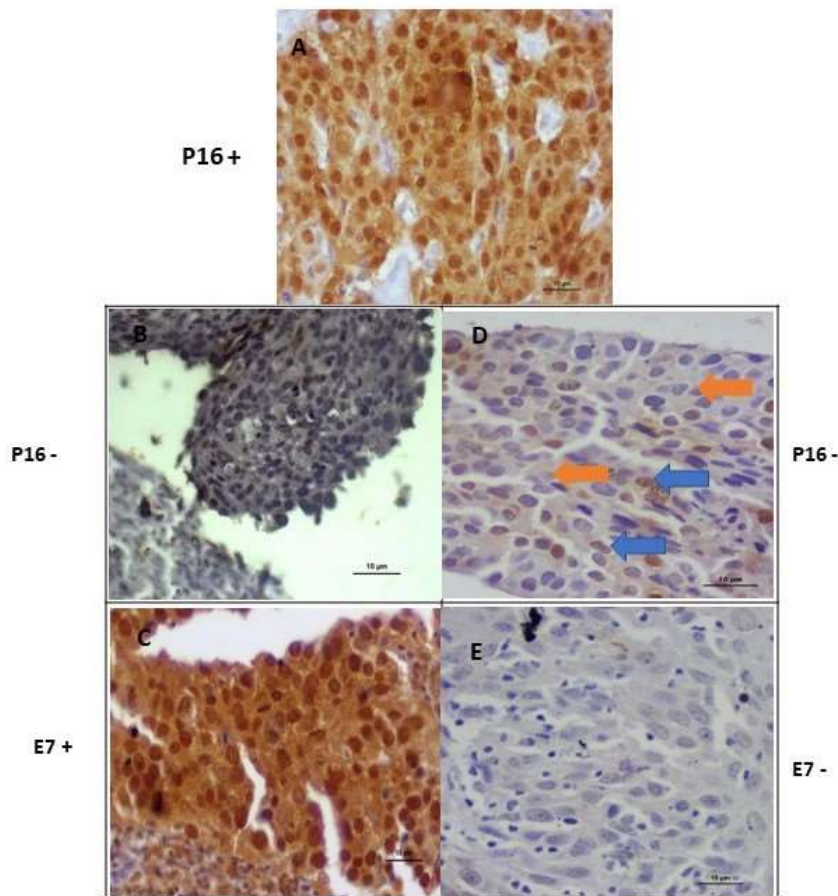


Figura 27: Imunomarcção das proteínas p16 e E7 do HPV em amostra de carcinoma de células escamosas utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica (400X): A :Imunomarcção positiva para p16 visualizada de forma difusa no núcleo e no citoplasma das células tumorais. B-Amostra (19). C- Amostra (19) com forte marcação para a proteína E7 do HPV no núcleo e n citoplasma das células tumorais. D- Representação da marcação focal para p16, onde observa-se presença de coloração marrom no núcleo e ou citoplasma em algumas células tumorais (setas azuis) associada a ausência de marcação para p16 em várias células da massa tumoral (setas laranja). E- Finalmente podemos ainda observar uma amostra negativa para E7 com total ausência de marcação.

Ressalta-se que das 7 amostras negativas para p16 que foram posteriormente testadas para E7, somente uma apresentou resultado positivo para E7 (Figura 27C). Destaca-se que essa amostra correspondia ao caso 19 do nosso estudo, cuja a porcentagem de marcação para MCM7 foi de 86,4% (Tabela 6). Dessa forma confirmou-se que das amostras de nosso *cohort* (N=59) 6 foram negativas para o HPV, uma vez que não apresentaram marcação para p16 e nem para a proteína E7 do HPV

DISCUSSÃO

Predizer o prognóstico do CC através do uso de biomarcadores foi um dos principais objetivos da presente tese, uma vez que estes podem 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). Portanto, nosso primeiro objetivo foi verificar a expressão tecidual de proteínas do eixo ativina/inibina, nas amostras de CCE. Iniciamos o estudo pela via de α -inibina. Nessa análise, 29 amostras de CCE foram investigadas por meio da técnica de Imunohistoquímica, sendo 12 classificadas como CCEP e 17 como CCEM., analisando separadamente as populações celulares de diferentes fenótipos presentes nos CCE.

Nossos dados demonstraram que tanto no CCEP como no CCEM houve predomínio da marcação para α -inibina em acima de 75% das células tumorais, para os dois diferentes fenótipos celulares. A imunomarcação foi observada no núcleo, mas principalmente no citoplasma das células. Porém destaca-se, que nas células de fenótipo diferenciado presentes nos CCEM, foi observada uma intensidade de imunomarcação nuclear moderada ou forte em 70% das amostras de tecido, enquanto que no citoplasma apesar de haver muitas células marcadas, a intensidade predominante foi fraca. Por outro lado, no CCEM, nas células com fenótipo indiferenciado, a porcentagem de casos com o mesmo padrão de intensidade de marcação nuclear (moderado/forte) citado esteve em torno de 40%. Esses dados demonstram que a imunomarcação para α -inibina foi expressa em menor intensidade no núcleo de células menos diferenciadas.

A atividade supressora de tumor da α -inibina, inibidor fisiológico das ativinas foi identificada pela primeira vez após a deleção funcional do gene da α -inibina em camundongos machos e fêmeas, resultando na formação de tumores estromais de gônada (MATZUK *et al.*, 1992). Estudo realizado por Mellor e colaboradores (1998) buscou avaliar a expressão do gene e a localização da α -inibina no Câncer de próstata. Demonstrou-se que o mRNA da subunidade α -inibina e a proteína não eram detectados em tecido tumoral de homens com Câncer de próstata pouco diferenciado e apresentando os graus histológicos de 4/5 na escala de Gleason, tumores com fenótipo mais agressivo. Em contraste, a expressão e a imunolocalização da α -inibina foram observadas em tecidos

dos mesmos pacientes sem anormalidades, e localizados adjacentes às áreas do tumor. Portanto, a perda da expressão do gene e da localização da subunidade α da Inibina, em câncer de próstata de alto grau sugere uma ação supressora de tumor dessa proteína na carcinogênese prostática (MELLOR *et al.*, 1998). Entretanto, outro estudo demonstrou um papel pró-tumorigênico e pró-metastático da α -inibina no câncer de próstata sugerindo que na ausência de andrógenos, níveis elevados de α -inibina poderiam estar conduzindo a fenótipos mais agressivos e metastáticos nos tumores de próstata (BALANATHAN *et al.*, 2009).

Dados da literatura também demonstraram que α -inibina tem um importante papel na carcinogênese endometrial, podendo apresentar uma função de supressor tumoral. Ao analisar por meio de Imunohistoquímica 49 amostras de tecido endometrial diagnosticadas como normal, hiperplásico e maligno, Mylonas e colaboradores (2003) verificaram que havia perda de marcação da proteína nos Adenocarcinomas endometrióides em comparação com o tecido normal e hiperplásico, mostrando ainda queda de intensidade de marcação nos Adenocarcinomas (MYLONAS *et al.*, 2003). Esses dados foram confirmados em outro estudo, onde a α -inibina foi sintetizada em uma relação decrescente na transição do tecido normal para o tumoral, sugerindo uma função supressora da proteína no carcinoma endometrial (WORBS *et al.*, 2007). O mesmo grupo avaliou a marcação por Imunohistoquímica da α -inibina, além da Inibina A e Inibina B em 302 amostras de endométrio, das quais 293 correspondiam ao carcinoma endometrial, e desses, 221 correspondiam a casos de Adenocarcinoma endometrióide. Neste estudo demonstrou-se que a perda da imunorreatividade para α -inibina resultou em menor sobrevivência para as pacientes com câncer endometrial (MYLONAS *et al.*, 2009). Os dados citados acima corroboram com a nossa hipótese de que, a evidente perda de expressão de α -inibina nos carcinomas pouco diferenciados - descritos como sendo de pior prognóstico - estaria relacionada à função supressora de tumor da proteína. Além disso, observou-se em nosso estudo perda na porcentagem de marcação por α -inibina nas células com fenótipo indiferenciado presentes nas massas de CCE, que poderia estar associada a uma função supressora tumoral de α -inibina também nos carcinomas escamosos do colo uterino.

Outra proteína avaliada nesse estudo, também participa do sistema Ativina/Inibina, a subunidade β A-inibina. Verificou-se que tanto no CCEM quanto no CCEP, elevado número de amostras exibiram marcação citoplasmática em acima de 75% das células de fenótipo diferenciado. Quanto à intensidade de marcação observou-se na

maioria das amostras de CCEM (em torno de 90%), uma variação de intensidade de moderada a muito forte no citoplasma das células de fenótipo diferenciado. Já no CCEP, verificou-se uma queda na porcentagem de células que apresentavam intensidade de marcação citoplasmática de moderada/muito forte (em torno de 70%) para o fenótipo celular diferenciado. Adicionalmente, foi observado no CCEP que em torno de 40% das amostras testadas sequer exibiram marcação nuclear ou citoplasmática nas células de fenótipo indiferenciado (FI). No CCEM, o teste estatístico revelou aumento na intensidade de marcação no citoplasma das células com FD em comparação com às de fenótipo indiferenciado. Dessa forma, nossos dados demonstram que β A-inibina, ao contrário de α -inibina, encontra-se preferencialmente localizada no citoplasma das células tumorais com FD, e que muitas vezes a proteína não se expressa no núcleo e nem no citoplasma das células com FI. Portanto, parece existir uma relação entre a produção da proteína β A e a diferenciação celular.

Alguns estudos têm mostrado uma atividade supressora de tumor relacionada às ativinas e inibinas. No estudo pioneiro desenvolvido por Petraglia e colaboradores (1998) foi avaliada por RT-PCR a expressão do mRNA de α -inibina, ativina β A e ativina β B em amostras de fluido cervical e soro. Foram analisadas dez amostras de CC (3 CCEM, 5 CCEP e 2 Adenocarcinomas) além de 25 amostras de Carcinoma endometrial (9 bem-, 9 moderadamente- e 7 pouco-diferenciados). A concentração das Inibinas A e B no fluido da cavidade uterina não mostrou diferença significativa, mas a concentração das Ativinas β A e β B no fluido de pacientes com carcinoma endometrial foi maior que a observada nos controles. Os autores também avaliaram a expressão dos 3 RNAm em amostras de soro coletadas das pacientes antes e após a retirada dos tumores endometriais, não sendo verificada diferença significativa entre os níveis séricos das Inibinas A e B nas pacientes *versus* controle. Porém os níveis de ativina A no soro das pacientes com carcinoma endometrial foram maiores do que os níveis séricos das pacientes controle, sendo observada queda acentuada da concentração de Ativina um mês após a retirada dos tumores, tanto endometrial quanto cervical. Esses dados sugerem que as células dos Carcinomas de endométrio e cervical secretam Ativina A na circulação (PETRAGLIA *et al.*, 1998). Nossos dados demonstraram uma maior imunomarcagem de β A no citoplasma das células tumorais com fenótipo diferenciado tanto no CCEM quanto no CCEP, com forte intensidade de marcação evidenciada principalmente no CCEM. No estudo de Petraglia e colaboradores (1998), acima de 70% (18/25) das amostras de carcinoma endometrial correspondiam a casos com maior grau de diferenciação, o que sugere que

grande parte das pacientes que apresentaram altos níveis séricos das subunidades β A eram portadoras de carcinomas mais diferenciados.

Níveis séricos mais elevados de Inibina A em pacientes com carcinoma de ovário altamente diferenciado em comparação com o pouco diferenciado foram observados em outro estudo, o que pode corroborar com a influência da Inibina A em processos de proliferação e diferenciação celulares (WALENTOWICZ *et al.*, 2014). Embora tenha sido analisado outro tipo de amostra clínica, os dados do trabalho anterior estão de acordo com os dados observados no nosso estudo, onde as células tumorais com maior grau de diferenciação apresentaram maior intensidade de imunomarcagem citoplasmática de β A.

Em um estudo recente realizado por nosso grupo foi demonstrado que a imunomarcagem nuclear e citoplasmática da subunidade β A no epitélio cervical diminui gradativamente nas NICs de grau I até o CCE, demonstrando um provável comprometimento das vias de controladas por Ativina A, AB e/ou Inibina A, a partir do processo de desenvolvimento das lesões (NIC I), que parecem permanecer prejudicadas durante todo o processo de progressão (PAYANO *et al.*; 2023). Desse modo podemos hipotetizar que a Ativina A, AB e/ou Inibina A possam desempenhar uma função central na prevenção da tumorigênese do epitélio cervical, dado o papel essencial da Ativina A como um supressor tumoral nos estádios iniciais da carcinogênese em vários tipos de células (TSUCHIDA *et al.*; 2009). Portanto em nosso estudo, a perda de expressão da subunidade β A em células de fenótipo indiferenciado, pode sugerir que tumores mais agressivos como o CCEP, perderiam a capacidade de diferenciação mediada pela proteína e seguiriam uma via de maior proliferação celular.

Com o objetivo de analisarmos uma classe de proteínas associadas a proliferação celular, selecionamos para o estudo a proteína MCM7. Dados da literatura reportam que algumas subunidades do complexo MCM poderiam participar de outros processos celulares além da proliferação, estando também envolvidas em eventos de invasão e metástase (LAU *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2014). Nessa fase do Projeto, as análises foram realizadas em 57 pacientes.

Sabe-se que a atividade das proteínas MCMs, incluindo a MCM7 é essencial para o controle da replicação do DNA na divisão celular e, portanto, a localização dessas proteínas nas células é nuclear (BELL & DUTTA, 2002; BLOW & DUTTA, 2005; NEVES & KWOK, 2017; PARKER, 2017; ISHIMI, 2018). Em relação à expressão nuclear de MCM7 em tecido livre de lesão, nossos resultados são concordantes com estudos prévios que mostraram que a expressão de MCM 2, 5 e 7 foi restrita a regiões

proliferativas normais da epiderme, da cérvix, do intestino e de tecidos linfóides (HIRAIWA *et al.*, 1997; TODOROV *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 1999; BRAKE *et al.*, 2003; ZHANG, 2013). Sabe-se que em uma célula em divisão, as MCM2-7 são as únicas proteínas presentes em todos os estádios da mitose, e são estritamente reguladas nas fases de terminação do alongamento do genoma (YU S, *et al.*, 2020).

O estudo morfométrico realizado nos casos de CCE demonstrou que apesar de haver diferença entre o número de células contadas nas amostras analisadas, o número de células atípicas marcadas foi elevado em todas as amostras, com média de marcação em torno de 96%. O predomínio de intensidade de marcação variou de forte à muito forte o que correspondeu a 75,4% das amostras de CCE. Alguns trabalhos avaliaram a expressão de MCM7 como marcador de proliferação em diversos tipos de neoplasias como o câncer de cólon (NISHIHARA *et al.*, 2008), de próstata (PADMANABHAN *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; LAITINEN *et al.*, 2008), de endométrio (LI *et al.*, 2005), da cavidade oral (TAMURA, 2010), de esôfago (ZHONG, *et al.*, 2015), de laringe (ALMADORI *et al.*, 2017), do fígado (QU *et al.*, 2017) e do estômago (adenocarcinoma gástrico) (YANG, 2018). Contudo, poucos trabalhos analisaram a produção de MCM7 em tecidos cervicais de humanos (BRAKE *et al.*, 2003; MIDDLETON *et al.*, 2003; ZHANG, J. *et al.*, 2013) e de camundongos (BRAKE *et al.*, 2003; HONEYCUTT *et al.*, 2006). Em trabalho anterior realizado em nosso grupo por Lobato e colaboradores (2012) demonstrou uma correlação significativa entre a presença do DNA HPV e as lesões intraepiteliais positivas para MCM7. Ainda nesse estudo verificou-se que a expressão de MCM7 foi significativamente associada à progressão das lesões intraepiteliais cervicais, indicando que a utilização desse biomarcador pode ser útil em identificar e distinguir as lesões intraepiteliais de baixo grau e de alto grau. No presente estudo, avaliamos o perfil de expressão de MCM7 e sua associação com o prognóstico do CCE.

Gai e colaboradores (2019) demonstraram que o estágio clínico avançado, a invasão vascular e/ou parametrial e a metástase em linfonodos foram considerados os fatores associados a piores prognósticos do câncer cervical. Por outro lado, o prognóstico não teve correlação significativa com idade, invasão do miométrio, tamanho do tumor e grau histológico de diferenciação. Dessa maneira, partindo do parâmetro idade observamos que a faixa etária média das pacientes de nossa *cohort* foi $48,4 \pm 14,5$ anos no momento do diagnóstico do câncer. Esses dados são similares ao reportado por Aleksioska-Papestiev e colaboradores (2018) e Alemany e colaboradores (2014), onde as idades médias das pacientes na época do diagnóstico do CCU foram de 44,4 e 51,2 anos,

respectivamente. Juntos esses dados demonstram que o diagnóstico do câncer de colo é mais frequente em mulheres após os 40 anos, e que o mesmo pode ter se desenvolvido ao longo da sua vida reprodutiva.

Quanto ao grau de diferenciação das lesões foi observado em nossa *cohort* um predomínio de CCEM, (65% dos casos de CCE) que correspondem normalmente a aproximadamente 60% dos casos de CCE (NUCCI & OLIVA, 2009). A análise estatística entre o grau de diferenciação das lesões e a porcentagem de células marcadas para MCM7 não mostrou significância, de modo que em nosso estudo o grau de diferenciação dos tumores, quando comparado à porcentagem de imunomarcação por MCM7, não foi considerado um fator prognóstico. Outro estudo também do nosso grupo, investigou morfometricamente a marcação de MCM7 em amostras de CCE classificadas como CCEM e CCEP. Dada a expressiva marcação de MCM7 em grande número de células tumorais, não foi possível identificar a associação entre o número de células marcadas para MCM7 e o grau de diferenciação do tumor. Porém, observou-se que o grupo CCEP apresentou maior número de amostras com elevada quantidade de células marcadas para MCM7, quando comparado às amostras do grupo CCEM (PEIXOTO, 2015). Nesse tipo de carcinoma (CCEP) há um predomínio de células com maior potencial de proliferação, exibindo menor variação de atipias celulares quando comparado às amostras de CCEM (KOSS 2006; PAULINO-JÚNIOR *et al.*, 2011).

Outro parâmetro do nosso estudo relacionado ao prognóstico do câncer cervical foi a análise entre a profundidade da lesão e a porcentagem de marcação por MCM7, que não mostrou significância estatística. A profundidade de invasão estromal representa uma ferramenta essencial a ser incluída no Laudo patológico, não apenas para fins de estadiamento, mas também por seu potencial papel como fator prognóstico no câncer cervical (ZANNONI *et al.*, 2021). O risco de metástase linfonodal em lesões com profundidade de invasão de até 3 mm é inferior a 1%, mas este risco aumenta significativamente com níveis mais profundos de invasão (ROBERT, 1990). Vale ressaltar que em nossas amostras originárias de biópsias excisionais, a medida da profundidade foi realizada na maior área de lesão presente na amostra, o que poderia não corresponder à profundidade exata da lesão (RASPOLINI *et al.*, 2108). Esse fato poderia ser considerado um fator limitante para esse parâmetro de análise.

A avaliação da porcentagem de marcação para MCM7 e o grau de estadiamento da lesão, baseado na classificação da FIGO mostrou significância estatística, entre os grupos I e IV. Nossos dados revelaram que, em aproximadamente 1/3 dos casos de CCE,

as pacientes estavam no estágio IB1 no momento do diagnóstico. O estágio IB, baseado na atualização da FIGO de 2018 inclui três subgrupos com base no tamanho do tumor na maior dimensão: estágio IB1 (≤ 20 mm), estágio IB2 (>20 mm a ≤ 40 mm) e estágio IB3 (> 40 milímetros) (GENNIGENS, *et al.* 2021). O estágio FIGO IB1 é considerado de baixo risco quando comparado aos seguintes critérios diagnósticos: invasão do estroma cervical inferior a 50% e ausência de linfonodos suspeitos. O tratamento padrão é a realização de histerectomia radical. A linfadenectomia pélvica deve sempre ser incluída na cirurgia devido à alta frequência de acometimento linfonodal (BHATLA *et al.*; 2021). Outro grupo que se destacou em nosso estudo, observado em acima de 20% das pacientes foi o estágio IV que revelou que essas pacientes se encontravam em estágio avançado (IV) quando foram diagnosticadas. De acordo com dados da literatura, em um elevado número de casos a doença é diagnosticada em fase avançada, nomeadamente FIGO IB2 a IVA (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO *et al.*, 2015). O método padrão para o tratamento dessas pacientes é irradiação, quimioterapia e braquiterapia. Apesar da implementação desse tratamento radical, quase metade das mulheres apresenta recidivas no trato genital e linfonodos regionais (ZÓŁCIAK-SIWIŃSKA *et al.*, 2012, BHATLA *et al.*, 2021). Nossos dados corroboram com essa afirmação, uma vez que muitas das pacientes que apresentaram pior desfecho das lesões foram diagnosticadas em estágio mais avançado do CCE.

A invasão de linfonodos foi outro parâmetro estudado e que também demonstrou relevância estatística, quando associado à porcentagem de marcação para MCM7. Do mesmo modo, a presença de metástase direta ou a distância também demonstrou resultados semelhantes. Em ambas as situações, a porcentagem de células tumorais marcadas para MCM7 não esteve inferior a 95% nos casos onde houve a invasão linfonodal e metástase. Quando analisamos os casos de óbito em período inferior a 5 anos pós-diagnóstico, também encontramos significância estatística entre a ocorrência de óbito e a porcentagem de marcação para MCM7. Destaca-se que a maioria das pacientes que vieram a óbito estava no estágio IV da FIGO quando foram diagnosticadas, e apresentaram em sua maioria porcentagem de marcação para MCM7 de 100% das células tumorais.

Estudos da literatura têm relatado a associação entre algumas proteínas representantes da família MCM, incluindo MCM7, com quadros de maior gravidade de cânceres de origem diversas. Um estudo de meta-análise avaliou o valor prognóstico das MCMs (MCM 2, 5 e 7) em vários tipos de câncer como de pulmão, colorretal, laringe, próstata, mama, entre outros (GOU *et al.*, 2018). Entretanto nenhum dos artigos da meta-

análise foi direcionado à avaliação da proteína MCM7 ao prognóstico do CCE do colo uterino. Segundo os dados da meta-análise, o aumento da expressão de MCM7 mostrou-se muito associado a menores taxas de sobrevida, no caso dos carcinomas de pulmão. Outra importante associação citada no trabalho foi a relação de elevada expressão de MCM7 e a invasão de linfonodos no carcinoma escamoso de esôfago. Destaca ainda, que em experimentos *in vitro* realizados em linhagens celulares obtidas de carcinoma esofágico, a baixa expressão de MCM7 inibiu significativamente a proliferação celular, a formação de colônias e a migração. Na meta-análise foi reportado que no Meningioma os níveis de expressão de MCM7 foram mais altos nos tumores de grau II de pior prognóstico, quando comparados aos de grau I. Dados semelhantes foram descritos para a neoplasia Urotelial (GOU *et al.*, 2018).

QU e colaboradores (2017) analisaram a expressão de MCM7 e Ciclina D1 em 153 amostras de pacientes portadores de carcinoma hepatocelular e demonstraram tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que a elevada expressão do mRNA para MCM7 foi significativamente correlacionada a quadros de pior prognóstico. Ainda, através de Imunohistoquímica, os autores verificaram que pacientes que apresentavam menor taxa de sobrevida exibiam os maiores valores para o score de imunomarcção (representado pelo produto da porcentagem de células marcadas versus a intensidade de marcação) das amostras de tumor. Da mesma forma, Almadori e colaboradores (2016), estudando por IHQ amostras de carcinoma escamoso de laringe de 61 pacientes verificaram que os fenótipos associados ao maior grau de progressão estavam relacionados aos pacientes com maior imunomarcção para MCM7, principalmente nos casos em que havia também superexpressão da proteína HER-1. A proteína HER-1 favorece a fosforilação da isoforma p56 da tiroxina-quinase Lyn, que, por sua vez fosforila a MCM7, que é então recrutada para o complexo de origem de replicação (ORI) dando início à replicação desordenada do DNA. A ação indireta de HER-1 sobre a atuação de MCM7 ilustra outro importante via de ação da subunidade MCM7. É importante destacar que o CCE de laringe apresenta muitas semelhanças clínico- histopatológicas com o CCE do colo uterino.

Outro importante objetivo desse estudo foi classificar as lesões como dependentes ou independentes da infecção pelo HPV (WHO, 2020). Apesar de a grande maioria dos tumores epiteliais cervicais estarem relacionados à infecção pelo HPV, já é reconhecido que uma proporção pequena desses tumores, representados principalmente por adenocarcinomas (mas também com casos descritos de carcinomas cervicais escamosos)

não está associada à infecção viral e carrega um comportamento clínico mais agressivo, com desfechos piores do que os carcinomas relacionados ao HPV (PARK *et al.*, 2022). Entretanto a OMS reconhece que é impossível distinguir-se morfológicamente os dois tipos de lesões (YOSHIDA *et al.*, 2021).

O CCE independente do HPV é raro, com incidência variando de 5 a 7% segundo dados da literatura e mostra uma taxa mais alta de metástases linfonodais, com consequente redução da sobrevida global e livre de doença, em comparação com o CCE associado ao HPV (CARUNCHIO *et al.*, 2014; NICOLAS, *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-LEE *et al.*, 2022). No estudo de meta-análise realizado por XING e colaboradores (2021) a incidência de positividade para o HPV em trabalhos realizados nos intervalos de 1990–1999, 2000–2005 e 2006–2010 foi de 85,9%, 87,9% e 92,9%, respectivamente. A tendência de queda dos resultados negativo para a presença do HPV pode estar relacionada a melhorias nos testes de detecção do HPV, e na maior acurácia nos processos de classificação do câncer não-cervical, já que outro ponto importante com relação aos tumores de colo uterino classificados como HPV-negativos, seria a má interpretação morfológica das lesões. Os cânceres não-cervicais mal interpretados como câncer cervical primário podem incluir o envolvimento cervical de um carcinoma endometrial ou a presença de metástases distantes de outros tumores primários, negativos para o HPV. Petry e colaboradores (2017) relataram que aproximadamente dois terços dos carcinomas cervicais HPV-negativos não eram primários do colo do útero.

Os cânceres cervicais HPV-negativos vêm se mostrando um subconjunto tumoral biologicamente distinto, que segue uma via patogénica que difere dos cânceres cervicais associados ao HPV. No entanto, atualmente ainda não existem diferenças descritas na literatura, em relação às estratégias de tratamento entre os tumores associados e aqueles independentes do HPV (SANTORO *et al.*, 2023).

A baixa sensibilidade de alguns métodos de detecção do HPV, quando aplicados a tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, provavelmente é a causa da baixa prevalência do HPV em CCEs observada em alguns estudos. Outro ponto diz respeito aos testes de HPV direcionados a *L1*, que poderiam ser menos confiáveis do que aqueles direcionados aos oncogenes *E6/E7*, pois a expressão de *L1* pode ser perdida durante a integração viral, enquanto que a expressão dos genes *E6/E7* estaria sempre presente nos vírus de alto risco oncogénico (XING *et al.*, 2021). Por essa razão, a Imunohistoquímica para p16 seria uma estratégia metodológica importante para garantir a veracidade do diagnóstico de CCE verdadeiramente negativo para o HPV, e não os falso-negativos

ocasionados por falhas nas técnicas de detecção do DNA viral (BARRETO *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-CARUNCHIO *et al.*, 2014; XING *et al.*, 2021; YOSHIDA *et al.*, 2021).

Em nosso estudo não foi possível realizar a detecção do HPV por técnicas baseadas na detecção do DNA viral, devido à qualidade das amostras parafinadas. Dessa forma, a Imunohistoquímica para p16 foi realizada em todas as amostras. Sete (7) pacientes foram evidenciadas como p16 negativas, e após a contraprova com a Imunohistoquímica para a proteína E7 do HPV, esse número foi reduzido para 6, uma vez que uma das pacientes demonstrou resultado positivo para E7. Vale ressaltar que essa paciente em questão apresentou porcentagem de marcação para MCM7 na amostra tumoral de 86%. De acordo com os parâmetros de prognóstico avaliados nesse estudo, todas as pacientes que apresentaram quadros associados a pior prognóstico exibiram porcentagem de marcação para MCM7 superior a 95%. Dessa forma, apesar do teste estatístico não ter mostrado significância talvez devido ao pequeno ‘N’ amostral, verificou-se uma tendência de marcação para MCM7 em 100% das células tumorais nas pacientes que foram p16 negativo, e conseqüentemente, pertencentes ao grupo HPV-negativo, considerado de pior prognóstico.

Vale ressaltar que não foi possível em nosso estudo recuperar as informações referentes ao grau de estadiamento da FIGO, de todas as pacientes que foram p16 negativo. Contudo, todas as pacientes em que tal informação foi obtida apresentaram grau III ou superior no momento do diagnóstico. Esses dados estão de acordo com a literatura, que descreve que o câncer cervical HPV-negativo apresenta estágio da FIGO avançado ao diagnóstico, o que pode explicar sua maior progressão e mortalidade (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO *et al.*, 2014; NICOLAS, *et al.*, 2019).

Alguns estudos vêm mostrando que na região de cabeça e pescoço, os tumores HPV-positivos têm um prognóstico significativamente melhor do que os tumores HPV-negativos, que se relaciona a uma melhor resposta ao tratamento rádio e quimioterápico. Tal fato já acarretou avanços nos protocolos de diagnóstico adotados em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, que incluem a detecção do HPV e/ou coloração Imunohistoquímica para p16 como biomarcadores de prognóstico (FAKHRY *et al.*, 2008; ALOS *et al.*, 2009; LASSEN *et al.*, 2009). Da mesma forma, os carcinomas da vagina e vulva positivos para o HPV mostraram um melhor prognóstico do que os tumores negativos para o HPV (ALONSO *et al.*, 2012; NOOIJ *et al.*, 2017).

Como destacado, alguns trabalhos têm mostrado que uma pequena porcentagem do câncer de colo surge por uma via independente do HPV. Esses tumores HPV-negativos

são diagnosticados em estádios avançados, apresentam maior prevalência de metástases linfonodais e têm prognóstico ruim em relação aos casos HPV-positivos (RODRÍGUEZ-CARUNCHIO *et al.*, 2014; NICOLÁS *et al.*, 2019; XING *et al.*, 2021). Portanto, entender os mecanismos envolvidos em sua tumorigênese contribuirá para a seleção de terapias adequadas para esse agressivo subgrupo do câncer do colo do útero (XING *et al.*, 2021). Alguns genes como *TP53*, *ARID1A*, *PTEN*, *ARID5B*, *CTNNB1*, *CTCF* e *CCND1* foram identificados como significativamente mutados em cânceres HPV-negativos, com papéis funcionais convergentes na progressão do ciclo celular (YOSHIDA *et al.*, 2021). Este fenótipo mutacional dos cânceres cervicais HPV-negativos poderia explicar uma maior capacidade de evolução tumoral, com aumento do potencial de crescimento e metástase, que levariam a um pior prognóstico.

Dessa forma, os estudos ainda não permitem afirmar se os carcinomas cervicais HPV-negativos se desenvolveriam de forma independente da infecção pelo vírus, ou se foram inicialmente HPV-positivos e posteriormente se tornaram independentes do vírus (XING *et al.*, 2021). Mais evidências clínicas e análises moleculares são necessárias para elucidar o espectro de anormalidades moleculares presentes no carcinoma de colo HPV-negativo. Ressalta-se que dada a baixa frequência desses tumores, mesmo os grandes centros de Referência em Patologia do Colo Uterino só conseguem identificar um número muito pequeno de mulheres com essas neoplasias. Assim, grandes estudos Multicêntricos serão necessários para confirmar o pior prognóstico observado nesse subconjunto de cânceres cervicais (NICOLÁS *et al.*, 2021)

7- CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos nesse estudo, podemos concluir até o momento que:

- A α -inibina está relacionada com vias de diferenciação celular, havendo potencialmente uma função de supressor tumoral nos CCE do colo uterino. Ressalta-se ainda, que essa função estaria associada à presença da proteína no núcleo das células tumorais.
- A atividade de β A em células de CCE também está potencialmente associada a vias de diferenciação neoplásicas, entretanto sua localização é mais citoplasmática. Foi observado no CCEM que houve perda de marcação citoplasmática de células tumorais de fenótipo indiferenciado., o que poderia favorecer o desenvolvimento de tumores mais diferenciados.
- MCM7 é um potente marcador de células tumorais, principalmente devido à alta taxa de proliferação dessas células.
- A imunomarcação para MCM7 mostrou associação direta com os fatores clínicos de prognóstico para o CCE, demonstrando que elevada porcentagem de células marcadas para a proteína estaria relacionada aos casos de pior desfecho clínico.

8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.A.; BUI, N.H.B.; RAJAPAKSHE, K. *et al.* **Distinct TP63 Isoform-Driven Transcriptional Signatures Predict Tumor Progression and Clinical Outcomes.** *Cancer Res.* Jan 15;78(2):451-462. 2018.

AHMED, S.M; AL, H.; REID, W.M. *et al.* **The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects.** *Scand J Immunol* 56(2):204-11. 2002

AKSOY, P; GOTTSCHALK, E.Y.; MENESES, P.I. **HPV entry into cells. Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 13–22, abr. 2017.

ALBERTS B. **Biologia Molecular da Célula.** Ed. Artmed. 2010.

ALMADORI, G.; COLI, A.; DE CORSO, E. *et al.* **Nuclear HER3 expression improves the prognostic stratification of patients with HER1 positive advanced laryngeal squamous cell carcinoma.** *J Transl Med.* Sep 27;19(1):408. 2021.

ALONSO, I.; FELIX, A.; TORNE, A. *et al.* **Human papillomavirus as a favorable prognostic biomarker in squamous cell carcinomas of the vagina.** *Gynecol Oncol.* 125:194–9.2012.

ALOS, L.; MOYANO, S.; NADAL, A. *et al.* **Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome.** *Cancer* 115:2701–9.2009.

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.* 42(16):2815-2820. 2006

ANGELICO, G.; SANTORO,A.; INZANI F. *et al.* **An Emerging Anti-p16 Antibody-BC42 Clone as an Alternative to the Current E6H4 for use in the Female Genital Tract Pathological Diagnosis: Our Experience and a Review on p16ink4a Functional Significance, Role in Daily-Practice Diagnosis, Prognostic Potential, and Technical Pitfalls.** *Diagnostics (Basel).* Apr 16;11(4):713. 2021

ALEKSIOSKA-PAPESTIEV, I; CHIBISHEVA, V.; MICEVSKA, M. *et al.* **Prevalence of Specific Types of Human Papiloma Virus in Cervical Intraepithelial Lesions and Cervical Cancer in Macedonian Women.** *Med. Arch. (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)*, 72, 1, 26–30, 2018.

ALEMAN-MUENCH GR & SOLDEVILA G. **When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity.** *Immunol Cell Biol.* Feb;90(2):137-48. 2012.

ALEMANY, L. **Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007.** *Int. J. Cancer*, 135, 1, 88–95, 2014.

ALOS, L.; MOYANO, S.; NADAL, A. *et al.* **Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome.** *Cancer.* 115:2701–9.2009

- APPIAH, E.; TANAM, F.; NELSON, W. *et al.* **Activin and inhibin signaling: From regulation of physiology to involvement in the pathology of the female reproductive system.** *Cytokine*. Sep;133:155-165. 2020.
- ARBYN, M.; WEIDERPASS, E.; BRUNI, L. *et al.* **Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis.** *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2): e191-e203. Epub 2019 Dec 4. Erratum in: *Lancet Glob Health*. 2022 Jan;10(1):e41
- BALANATHAN, P.; WILLIAMS, E.D.; WANG. *et al.* **Elevated level of inhibin-alpha subunit is pro-tumourigenic and pro-metastatic and associated with extracapsular spread in advanced prostate cancer.** *Br J Cancer*. Jun 2;100(11):1784-93. 6. 2009.
- BARRETO, C.L.; MARTINS, D.B.; DE LIMA, J.L. *et al.* **Detection of Human Papillomavirus in biopsies of patients with cervical cancer, and its association with prognosis.** *Arch Gynecol Obstet*. 288:643-8. 2013.
- BEARFIELD, E.; JAUNIAUX, N.; GROOME, I.L. *et al.* **Muttukrishna, The secretion and effect of inhibin A, activin A and follistatin on first-trimester trophoblasts in vitro,** *Eur J Endocrinol* 152 : 909-916. 2005.
- BELL, S.P.; DUTTA, A. **DNA Replication In Eukaryotic Cells.** *Annu. Rev. Biochem.* 71:333-74. 2002.
- BEN, W.; YANG, Y.; YUAN, J. *et al.* **Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of host microRNAs in cervical cancer.** *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. v. 54, n. 4, p. 364-370, 2015.
- BERGAUER, F.; BRUNING, A.; SHABANI, N. *et al.* **Inhibin/activin-betaE subunit in normal and malignant human cervical tissue and cervical cancer cell lines.** *J Mol Histol*. 2009.
- BERG, K.B. & SCHAEFFER, D.F. **Tumor budding as a standardized parameter in gastrointestinal carcinomas: More than just the colon.** *Mod. Pathol*. 31:862-872. 2018.
- BHATLA, N.; AOKI, D.; SHARMA, D.N. *et al.* **Cancer of the cervix uteri.** *Int J Gynaecol Obstet*.;143 Suppl 2:22-36. 2018.
- BLANCHON, S & DEMRET, C. **The Regulatory E2 Proteins of Human Genital Papillomavirus are pro-apoptotic.** *Biochimie*; 85: 813-819. 2003.
- BLOISE, E.; CIARMELA, P.; DELA CRUZ, C, LUISI, S. *et al.* **Activin A in Mammalian Physiology.** *Physiol Rev*. Jan 1;99(1):739-780. 2019.
- BLOW, J.J & DUTTA, A. **Preventing re-replication of chromosomal DNA.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. June; 6(6): 476-486. 2005.
- BLOW J.J & HODGSON, B. **Replication licensing - defining the proliferative state?** *Trends Cell Biol*.;12:72-78. 2002.
- BOSCH, F. X & de SANJOSÉ, S. **Human papillomavirus in cervical cancer.** *Current Oncology Reports*.; 4(2):175-83. 2002

BOXBERG, M.; JESINGHAUS, M.; DORFNER C. *et al.* **Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: Proposal for an adjusted grading system.** *Histopathology*. 70:1125–1137. 2017.

BRAKE, T.; CONNOR, J.P.; PETEREIT, D.G, LAMBERT, P.F. **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*. 63:8173–80. 2003.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer** José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016.

BRUNI, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B. *et al.* **ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World.** Barcelona: *HPV Information Centre*; 2019.

BURK, D. **Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer.** *Nature*, v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017.

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

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. *Nature*. Mar 16;543(7645):378-384. 2017

CANFELL, K.; KIM J.J.; BRISSON, M. *et al.* **Mortality impact of achieving WHO cervical cancer elimination targets: a comparative modelling analysis in 78 low income and lower-middle-income countries.** *Lancet*. 22;395(10224):591-603. 2020.

CAO, H.; WANG, S.; ZHANG, Z. *et al.* **Prognostic Value of Overexpressed p16INK4a in Vulvar Cancer: A Meta-Analysis.** *PLoS One*. Mar 31;11(3):e0152459. 2016

CAROZZI, F.; CONFORTINI, M.; PALMA, P.D. *et al.* **Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: A nested substudy of the NTCC randomised controlled trial.** *Lancet Oncol*, v.9, 937–945. 2008

CHAN, C.K.; AIMAGAMBETOVA, G.; UKYBASSOVA T. *et al.* **Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination-Review of Current Perspectives.** *J Oncol*. 2019.

CHEUNG, J.L, LO, K.W, CHEUNG, T.H. *et al.* **Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia.** *J Infect Dis*. 2006; 194(12):1706-12. Epub Nov 3. 2006.

CIARMELA, P.; BLOISE, E.; GRAY PC. *et al.* **Activin-A and myostatin response and steroid regulation in human myometrium: disruption of their signalling in uterine fibroid.** *J Clin Endocrinol Metab*. Mar;96(3):755-65. 2011.

CLIFFORD, G.; FRANCESCHI, S.; DIAZ, M. *et al.* Chapter 3: **HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases.** *Vaccine*. v. 24, n. 3, p. S26-S34, 2006.

- COHEN, P.A.; JHINGRAN, A.; OAKNIN, A. *et al.* **Cervical cancer** *The Lancet*, Volume 393, Issue 10167, 169 – 182. 2019.
- COLIE, C.; MICHEL, K. G.; MASSAD, L. S. *et al.* **Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia-2 in HIV-Positive Women of Reproductive Age.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* v. 79, n. 5, p. 573-579, 2018.
- CONSOLARO, M.E.L & ENGLER, M.S.S. **Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas/** - São Paulo: Roca, 2014.
- CUZICK, J.; CADMAN, L.; MESHER, D. *et al.* **Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population.** *Br. J. Cancer.* 108, 908–913. 2013.
- DA COSTA, F. K. M.; WEIGERT, S.P.; BURCI, L. *et al.* Os desafios do enfermeiro perante a prevenção do câncer do colo do útero. **RGS**, v. 17, n. 1, p. 55-62, 2017.
- DAS, M.; PRASAD, S. B.; YADAV. *et al.* **Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis.** *PloS one.* v. 8, n. 7, p. e69607, 2013.
- DASARI, S.; WUDAYAGIRI, R.; VALLURU, L. **Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment.** *Clin Chim Acta.* 445:7-11. 2015.
- DEPUYDT, C.E.; JONCKHEERE, J.; BERTH, M. *et al.* **Serial type-specific human papillomavirus (HPV) load measurement allows differentiation between regressing cervical lesions and serial virion productive transient infections.** *Cancer Med.* Aug;4(8):1294-302. 2015.
- DE SANJOSE. **Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study.** *The Lancet Oncology*, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010.
- DE SANJOSE, S.; ALEMANY, L.; ORDI J. *et al.* **Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva.** *Eur J Cancer.* 49:3450–61. 2013.
- DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M.A. **The natural history of human papillomavirus infection.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Feb; 47:2-13. 2018.
- DHAR, S.K.; DELMOLING. L.; DUTTA, A. **Architecture of the human origin recognition complex.** *J. Biol. Chem.* 276:29067–29071. 2001.
- DONG, B., SUN, P., RUAN, G. *et al.* **Type-specific high-risk human papillomavirus viral load as a viable triage indicator for high-grade squamous intraepithelial lesion: a nested case- control study.** *Cancer management and research.* v. 10, p. 4839–4851, 2018.
- DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L. *et al.* **The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses.** *Vaccine.* v. 30, n. 5, p.55-70, 2012.
- DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H. *et al.* **Human papillomavirus molecular biology and disease association.** *Medical Virology.* v. 25, p. 2 -23, 2015.
- DOORBAR J. **Host control of human papillomavirus infection and disease.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Feb;47:27-41. 2018.

- DUDDERIDGE, T.J.; MCCRACKEN, S.R.; LODDO, M. *et al.* **Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer.** *Br J Cancer.*96: 1384-1393. 2007.
- ELDAR-GEVA, T.; SPITZ, I.M.; GROOME, N.P. *et al.* **Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome.** *Hum Reprod.* Dec;16(12):2552-6. 2001.
- FAKHRY, C.; WESTRA, W.H.; LI, S. *et al.* **Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial.** *J Natl Cancer Inst.* 100:261–9.2008.
- FERREIRA, M.C.; WITZ, C.A.; HAMMES LS. *et al.* **Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum.** *Mol Hum Reprod.* May;14(5):301-7:2008
- FERLAY, J; SOERJOMATARAM, I; DIKSHIT, R. *et al.* **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012.** *Int J Cancer;*136(5): E359-86. 2015.
- FLORIO, P.; SEVERI, F.M.; LUISI, S. *et al.* **Endometrial expression and secretion of activin A, but not follistatin, increase in the secretory phase of the menstrual cycle.** *J Soc Gynecol Investig.* May;10(4):237-43:2003.
- FRANCO, M.; BUONAGURO PAUZA, D.; TORNESELLO, M.L *et al.* **Cancer Diagnostic and Predictive Biomarkers.** *BioMed Research International*, vol. 2014.
- FREEMAN, A.; MORRIS, L.S.; MILLS, A.D. *et al.* **Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy.** *Clin. Cancer Res.* 5, 2121–2132. 1999.
- FUJIOKA, S.; SHOMORI, K.; NISHIHARA, K, *et al.* **Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): prognostic implication.** *Lung Cancer.* 65: 223–9.2009.
- FUJIWARA, K.; MONK, B.; DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M. **Adenocarcinoma of the uterine cervix: why is it different?** *Curr Oncol Rep.* Dec;16(12):416. 2014.
- GAI, J.; WANG, X.; MENG, Y. *et al.* **Clinicopathological factors influencing the prognosis of cervical cancer.** *J buon.* Jan-Feb;24(1):291-295. 2019.
- GENNIGENS, C.; DE CUYPERE, M.; HERMESSE, J. *et al.* **Optimal treatment in locally advanced cervical cancer.** *Expert Rev Anticancer Ther.* Jun;21(6):657-671. 2021.
- GOU, K.; LIU, J.; FENG, X. *et al.* **Expression of Minichromosome Maintenance Proteins (MCM) and Cancer Prognosis: A meta-analysis.** *J Cancer.* Apr 6. 9(8):1518-1526. 2018.
- GRAHAM, S.V. **The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review.** *Clin Sci (Lond);* 131(17):2201-2221. 2017.
- GRAHAM, S.V. **Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation.** *Viruses.* Aug 30;9(9):245. 2017.

- GROVES, I. J. & COLEMAN, N. **Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next-generation sequencing studies taught us?** *J Pathol.* v. 245, p. 9–18, 2018.
- HALEC, G.; ALEMANY, L.; QUIROS, B. *et al.* **Biological relevance of human papillomaviruses in vulvar cancer.** *Mod Pathol.* 30:549–62. 2017.
- HARPER, D.M.; VIERTHALER; S. L. **Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females.** ISRN *Obstet Gynecol.*, 2011:457204, 2011.
- HELDIN, C.H. & MOUSTAKAS A. **Role of Smads in TGF β signaling.** *Cell Tissue Res.*, 347, 1, 21–36, 2012.
- HOPPE-SEYLER, K.; BOSSLER, F.; BRAUN. *et al.* **The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets.** *Trends Microbiol.* Feb;26(2):158-168. 2018.
- HONEYCUTT, K.A.; CHEN, Z.; KOSTER, M.I. *et al.* **Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis.** *Oncogene.*25:4027–32. 2006.
- HOWIE, H.L., KATZENELLENBOGEN, R.A, GALLOWAY, D.A. **Papillomavirus E6 proteins.** *Virology* 384, 324-334, 2009
- HUANG, K.; LI, L.A.; MENG Y.G. *et al.* **p16 expression in patients with cervical cancer and its prognostic significance: meta-analysis of published literature.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*; 183:64–9.2014.
- ISHIMI; Y. **Regulation of MCM2-7 function.** *Genes Genet Syst.* 2018 Nov 10;93(4):125-133.. Epub 2018 Oct 23. Erratum in: *Genes Genet Syst.* 2019;94(3):139.
- INCA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer** José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, 2016.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Cancer Today.** DispoScore em:< <https://www.iarc.who.int/news-events/iarc-marks-cervical-cancer-awareness-month-2023/>> Data source: GLOBOCAN 2023.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2022. DispoScore em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/numeros/estimativa>
- JESINGHAUS, M.; STREH, J.; BOXBERG M. *et al.* **Introducing a novel highly prognostic grading scheme based on tumor budding and cell nest size for squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *J. Pathol. Clin. Res.* 4:93–102. 2018.
- JESINGHAUS, M.; BOXBERG, M.; KONUKIEWIT, B. *et al.* **A novel grading system based on tumor budding and cell nest size is a strong predictor of patient outcome in esophageal squamous cell carcinoma.** *Am. J. Surg. Pathol.* 41:1112–1120. 2017.
- JIN, L. & XU, Z. **Recent advances in the study of HPV-associated carcinogenesis.** *Virologica Sinica.* v. 30, n. 2, p. 101-106, 2015.

JONES, R.L.; FINDLAY, J.K.; FARNWORTH, P.G. *et al.* **Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion.** *Endocrinology*. Feb;147(2):724-32.2006

JÜCKSTOCK, J.; BRÜNING, A.; BLANKENSTEIN T. *et al.* **Immunolabeling of the inhibin- β a and - β B Subunit in Normal and Malignant Human Cervical Tissue and Cervical Cancer Cell Lines.** *Int. J. Gynecol. Cancer*. 20; 7; 15. 2010.

KADAJA, M. **Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery.** *Embo J*, v. 26, p. 2180-2191, 2007.

KAITU'U-LINO, T. J.; PHILLIPS, D.J.; MORISON, N.B. *et al.* **A new role for activin in endometrial repair after menses.** *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1904-11: 2009.

KALOF, A.N.; EVANS, M.F.; SIMMONS-ARNOLD L. *et al.* **p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia.** *Am J Surg Pathol*. 29(5):674-9. 2005.

KANEKO, H. **Activin.** *In: Handb. Horm. [s.l.] Elsevier Inc.*, 295–297; 33B-2-33B-2. 2016

KIM, Y.T. & ZHAO M. **Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma.** *Yonsei Med J*. 46(5):597-613.2005.

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

KWOK, H.F.; ZHANG, S.D.; MCCRUDDEN, C.M. *et al.* **Prognostic significance of minichromosome maintenance proteins in breast cancer.** *Am J Cancer Res.*; 5 (1): 52-71, 2014.

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

LASSEN, O.; ERIKSEN, J.G, HAMILTON-DUTOIT, S. *et al.* **Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *J Clin Oncol* 27:1992–8.2009

LAU, K.M; CHAN, Q.K; PANG, J. *et al.*: **Minichromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion.** *Oncogene*, 29(40):5475-5489. 2010.

LANGENDIJK, J.A.& PSYRRI, A. **The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma:Implications for treatment strategies and future clinical studies.** *Ann. Oncol.*, 21, 1931–1934. 2010.

LEE, J.,; CHUNG, Y.; RHEE S. *et al.* **Untold story of human cervical cancers: HPV-negative cervical cancer.** *BMB Rep*. Sep;55(9):429-438. 2022.

LEI, J; PLONER,A; LAGHEDEN, C. *et al.* **High-risk human papillomavirus status and prognosis in invasive cervical cancer: A nationwide cohort study.** *PLoS Med*. 2018 Oct 1;15(10): 2018.

- LEHTINEN, M.; BAUSSANO, I.; PAAVONEN, J. *et al.* **Eradication of human papillomavirus and elimination of HPV-related diseases—scientific basis for global public health policies.** *Expert Ver Vaccines*; 18(2):153–160]. 2019.
- LEWIS, J.S.; THORSTAD, W.L.; CHERNOCK, R.D. *et al.* **p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma:an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status.** *Am J Surg Pathol.* Aug;34(8):1088-96. 2010.
- 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.* 46: 307–13. 2005.
- LIN, J; ALBERS, A.E.; QIN J. *et al.* **Prognostic significance of overexpressed p16INK4a in patients with cervical cancer: a meta-analysis.** *PLoS One*, Sep 4;9(9):e106384. 2014
- LOBATO, S.; TAFURI, A.; FERNANDES, P.A. *et al.* **Minichromosome maintenance 7 protein is a reliable biological marker for human cervical progressive disease.** *J Gynecol Oncol.* 2012; 23 (1): 11-15
- LONGATTO FILHO, A.; LAX, S.F.; YANG, B. **Tumos of the female genital system.** *In: Bartlett, J. M. S.; Shaaban, A.; Schmitt, F. Molecular Pathology: A Practical Guide for the Surgical Pathologist and Cytopathologist.* Cambridge: Cambridge University Press, p. 174 - 188. 2015.
- LUO, J.H. **Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster.** *World J Clin Oncol.* Feb 10;2(2):120-4. 2011.
- MACCALLUM, D.E & HALL P.A. **The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67.** *J Pathol.* Jul;191(3):286-98. 2000.
- MACIAS, M.J.& MARTIN-MALPARTIDA P; MASSAGUÉ J. **Structural determinants of SMAD function in TGF- β signaling.** *Trends Biochem. Sci.*, 40, 6, 296–308, 2015.
- MAKANJI, Y.; ZHU, J.; MISHRA, R. *et al.* **Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review.** *Endocr Rev.* Oct;35(5):747-94. 2014.
- MARTIN, C. M. & O'LEARY, J. J. **Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers.** *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* v. 25, n. 5, p. 605-615, 2011.
- MATZUK, M.; FINEGOLD, M.J.; SU, J.G. *et al.* **Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice.** *Nature.* Nov 26;360(6402):313-9. 1992.
- MCBRIDE, A.A & WARBURTON, A. **The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers.** *PLoS Pathog.* 2017 Apr 6;13(4): 2017.
- MCCLUGGAGE, W.G. **Towards developing a meaningful grading system for cervical squamous cell carcinoma.** *J Pathol Clin Res.* 2018 Apr;4(2):81-85. Epub 2018 Mar 30
- MCLAUGHLIN-DRUBIN, M.E. & MUNGER K. **The human papillomavirus E7 oncoprotein.** *Virology* 384, 335-344. 2009.
- MELLOR, S.L.; RICHARDS, M.G.; PEDERSEN, J.S. *et al.* **Loss of the expression and localization of inhibin alpha-subunit in high grade prostate cancer.** *J Clin Endocrinol Metab.* Mar;83(3):969-75.1998.

- MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN S. *et al.* **Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers.** *J Virol.* Oct;77(19):10186-201. 2003.
- MOODY, C. **Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes.** *Viruses.* Sep 19;9(9):261. 2017.
- MOODY, C.A. & LAIMINS L.A. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** *Nature Reviews. Cancer* 10, 550-560: 2010.
- MYLONAS, I.; MAKOVITZKY, J.; RICHTER, D.U, K. *et al.* **Expression of the inhibin- α subunit in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis.** *Gynecol Oncol.* Apr;93(1):92-7. 2004.
- MYLONAS, I.; WORBS, S.; SHABANI, N. *et al.* **Inhibin- α subunit is an independent prognostic parameter in human endometrial carcinomas: analysis of inhibin/activin- α , - β A and - β B subunits in 302 cases.** *Eur J Cancer.* May;45(7):1304-1314. 2009.
- NACHAJOVA, M.; BRANY, D.; DVORSKA, D. **Telomerase and the process of cervical carcinogenesis.** *Tumor Biol.* v. 36, p. 7335–7338, 2015.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **CERVICAL CANCER TREATMENT**– Health Professional Version. <http://www.cancer.gov/types/cervical/hp/cervical-treatment>, 2016.
- NEVES, H. & KWOK, H.F. **In sickness and in health: The many roles of the minichromosome maintenance proteins.** *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017 Aug;1868(1):295-308. 2017.
- NICOLÁS, I.; SACO, A.; BARNADAS E. *et al.* **Prognostic implications of genotyping and p16 immunostaining in HPV-positive tumors of the uterine cervix.** *Mod Pathol.* Jan;33(1):128-137. 2020. Epub 2019 Sep 6.
- NICOLAS, I.; MARIMON, L.; BARNADAS E. *et al.* **HPV-negative tumors of the uterine cervix.** *Mod Pathol* 32 (8):1189–96. 2019.
- NISHIHARA, K.; SHOMORI, K.; FUJIOKA, S. *et al.* **Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance.** *Int J Oncol.* 33: 245–52. 2008.
- NOGUEIRA-RODRIGUES, A.; FERREIRA, C.G.; BERGMANN, A. *et al.* **Comparison of adenocarcinoma (ACA) and squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix in a sub-optimally screened cohort: a population-based epidemiologic study of 51,842 women in Brazil.** *Gynecol Oncol.*;135(2):292-6., 2014.
- NOOIJ, L.S.; TER, HAAR NT.; RUANO D. *et al.* **Genomic Characterization of Vulvar (Pre)cancers Identifies Distinct Molecular Subtypes with Prognostic Significance.** *Clin Cancer Res.* 2017.
- NOWINSKA, K.; CHMIELEWSKA, M.; PIOTROWSKA A. *et al.* **Correlation between levels of expression of minichromosome maintenance proteins, Ki-67 proliferation antigen and metallothionein I/II in laryngeal squamous cell cancer.** *Int J Oncol.* Feb;48(2):635-45. 2016.

NWACHUKWU, C.R.; HARRIS, J.P.; CHIN, A. *et al.* **Prognostic Significance of P16 Expression and P53 Expression in Primary Vaginal Cancer.** *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 38, 588–596, 2019.

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

PAL, A & KUNDU, R. **Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 21 jan. 2020.

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

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

PARK, K.J.; SELINGER, C.I.; ALVARADO-CABRERO I. *et al.* **Dataset for the Reporting of Carcinoma of the Cervix: Recommendations From the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR).** *Int J Gynecol Pathol.* Nov 1;41(Suppl 1):S64-S89. 2022.

PARKER, M.W.; BOTCHAN, M.R.; BERGER, J.M. **Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes.** *Crit Rev Biochem Mol Bio.*;52(2):107-144. 2017.

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

PAYANO, V.J.H.; LOPES, L.V.D.A.; PEIXOTO, L.R.; *et al.* **Immunostaining of β A-Activin and Follistatin Is Decreased in HPV(+) Cervical Pre-Neoplastic and Neoplastic Lesions.** *Viruses* .15, 1031. 2023.

PEIXOTO, L. **Minichromosome maintenance protein (MCM)-7 e sua correlação com o papilomavírus humano na patogênese do câncer do colo do útero.** Dissertação (Mestre em Biologia celular) – Instituto de Ciências Biológicas- ICB- Universidade Federal de Minas Gerias- UFMG. Belo Horizonte, p. 112. 2021.

PEREIRA, A.C.; DO CARMO, E.D.; SILVEIRA, V.A.S. *et al.* **O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide.** *Revista Brasileira de Cancerologia*; 52(3): 257-262. 2006.

PETRAGLIA, F.; FLORIO, P.; LUISI, S. *et al.* **Expression and secretion of inhibin and activin in normal and neoplastic uterine tissues. High levels of serum activin A in women with endometrial and cervical carcinoma.** *J Clin Endocrinol Metab.* Apr;83(4):1194-200. doi: 10.1210/jcem.83.4.4689. 1998.

PETRY, K.U.; LIEBRICH, C.; LUYTEN, A. *et al.* **Surgical staging identified false HPV-negative cases in a large series of invasive cervical cancers.** *Papillomavirus Res.* Dec; 4:85-89. 2017..

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

POETSCH, M.; SCHUART, B.J.; SCHWESINGER G. *et al.* **Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and non-metastatic carcinomas.** *Mod Pathol.* 20:1069–77:2007.

PORTER, S.S.; STEPP, W.H.; STAMOS, J.D. *et al.* **Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus.** *Virus Res.* Mar 2;231:10-20. 2017.

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

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.* 202(10):731-7. 2006.

RAKISLOVA, O.; ALEMANY, L.; SACO A. *et al.* **Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: a study of 1.594 cases.** *Int J Cancer.* 141:2517–27: 2017.

RASPOLINI, M.R., LAX, S.F.; MCCLUGGAGE, W.G. **The central role of the pathologist in the management of patients with cervical cancer: ESGO/ESTRO/ESP guidelines.** *Virchows Arch* 473, 45–54;2018.

REFAAT, B. & LEDGER, W. **The expression of activins, their type II receptors and follistatin in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in pseudo-pregnancy.** *Hum Reprod.* Dec;26(12):3346-54. 2011.

RIOU, G.; FAVRE, M.; JEANNEI D. *et al.* **Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA.** *Lancet* 335(8699):1171–4. 1990.

RISBRIDGER; G.P.; BALL, E.M.; WANG, H. *et al.* **Re-evaluation of inhibin alpha subunit as a tumour suppressor in prostate cancer.** *Mol Cell Endocrinol.* 225:73Y76. 2004.

ROBERT, M.E & FU, Y.S. **Squamous cell carcinoma of the uterine cervix--a review with emphasis on prognostic factors and unusual variants.** *Semin Diagn Pathol.* Aug;7(3):173-89. 1990.

ROBBINS, *et al.* **Patologia básica.** Tradução de Claudia Coana, *et al.*] - Rio de Janeiro: Elsevier, 928 p. 2013.

RODRÍGUEZ-CARUNCHIO, L.; SOVERAL, I.; STEENBERGEN, R.D. *et al.* **HPV-negative carcinoma of the uterine cervix: a distinct type of cervical cancer with poor prognosis.** *BJOG.* 2015 Jan;122(1):119-27. doi: 10.1111/1471-0528.13071. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25229645.

ROGERS, A., WINTER D.C., HEENEY A. *et al.* **Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer.** *Br. J. Cancer.* 115:831–840. 2016.

ROMAN, A & MUNGER, K. **The papillomavirus E7 proteins.** *Virology,* 445, 1–2, 138–168: 2013.

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

- ROURA, E.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA M. *et al.* **Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort.** *Int J Cancer*; **135**: 453. 2014
- SANTANA, M.F.; PEREIRA, J.C.; BACELAR, B.S. **Impacto sócio-econômico do câncer na vida de pacientes, do sexo feminino, após o diagnóstico da doença.** FIEP BULLETIN - Volume 80 - Special Edition - ARTICLE II) 2010.
- SANTORO, A.; INZANI, F.; ANGELICO, G. *et al.* **Recent Advances in Cervical Cancer Management: A Review on Novel Prognostic Factors in Primary and Recurrent Tumors.** *Cancers (Basel)*. Feb 10;15(4):1137. 2023.
- SCHIFFMAN, M.H., & BRINTON, L.A. **The Epidemiology of Cervical Carcinogenesis.** *Cancer*. Nov 15;76(10 Suppl):1888-901. 1995.
- 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.* (119): 158-166. 2011.
- SCHOLZEN, T. & GERDES. J. **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** *J Cell Physiol.* Mar;182(3):311-22. 2000
- SCULLY, C & BAGAN, J. **Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications.** *Oral Dis.* Sep;15(6):388-99. 2009.
- SELLORS, J.W.R. **Colposcopia e Tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes.** *Washington, D.C.:* OPAS, 2004
- SERRA S & CHETTY R. **p16.** *J Clin Pathol.* Oct;71(10):853-858. 2018.
- SERRANO, O.A.; CETINA, L.; CORONEL. J. *et al.* **Emerging drugs for the treatment of cervical cancer.** *Expert Opin Emerg Drugs*;20:165-82.; 2015.
- SERRANO M. **The tumor suppressor protein p16INK4a.** *Exp Cell Res* ; 237:7–13.1997.
- SHUKLA, S.; MAHATA, S.; SHISHODIA, G. *et al.* **Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer.** *The Indian journal of medical researchKIO.* v. 139, n. 4, p. 531–43, 2014.
- SMALL, W. J.R.; BACON, M.A.; BAJAJ, A. *et al.* **Cervical cancer: A global health crisis.** *Cancer.* Jul 1;123(13):2404-2412. 2017.
- STRIMBU, K & TAVEL, J.A. **What are biomarkers?** *Curr Opin HIV AIDS.* Nov;5(6):463-6. 2010.
- SYED, V. **TGF- β Signaling in Cancer.** *J Cell Biochem.* Jun;117(6):1279-87. 2016.
- TALLON, B, MONTEIRO, D, SOARES, L. *et al.* **Tendências da mortalidade por câncer de colo no Brasil em 5 anos (2012-2016).** *Saúde em Debate* Saúde debate 44 (125) 27. Jul 2020
- TAMURA, T.; SHOMORI, K.; HARUKI, T. *et al.* **Minichromosome maintenance-7 and geminin are reliable prognostic markers in patients with oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical study.** *Oral Pathol Med.*, 39: 328– 334. 2010.

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

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

TERUMI, C.; LAWRENCE, T.; KLEN, M.S. *et al.* **Cervical cancer in Brazil: a retrospective on public policies for women's health ;** *J Bras Econ Saúde*;9(1): 137-47. 2017

THOMPSON & THOMPSON. *et al.* **Genética médica.** Tradução Luciane Faria de Souza Pontes *et al.* - Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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.*; 39(2):154-66. 2008

TOMMASINO, M. **The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis.** *Seminars in Cancer Biology.* 26, 13-21. 2014.

TODOROV, I.T., WERNESS, B.A., WANG, H. *et al.* **HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues.** *Laboratory Invest.* 78, 73–78. 1998.

TRINGLER B.; GUP, C.J.; SINGH, M. *et al.* **Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia.** *Hum Pathol.* Jun;35(6):689-96. 2004.

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

TSUCHIDA, K.; NAKATANI, M.; MATSUZAKI T. *et al.* **Novel factors in regulation of activin signaling.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 225; 1–2; 1–8. 2004.

TSUCHIDA, K.; NAKATANI, M.; HITACHI K. *et al.* **Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions.** *Cell Commun Signal.* Jun 18;7:15. 2009.

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

VAN DER WEELE P.; VAN LOGCHEM E; WOLFFS, P.; VAN DEN BROEK *et al.* **Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women.** *J Clin Virol.* 2016 Oct;83:6-11.2016.

WALENTOWICZ, P.; KRINTUS, M.; SADLECKI, P. *et al.* **Serum inhibin A and inhibin B levels in epithelial ovarian cancer patients.** *PLoS One.* Mar 5;9(3):e90575. 2014.

WALTON KL & MAKANJI Y, HARRISON CA. **New insights into the mechanisms of activin action and inhibition.** *Mol Cell Endocrinol.* Aug 15;359(1-2):2-12. 2012.

- WANG, X., HUANG, X., ZHANG, Y. **Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer.** *Frontiers in microbiology.* v. 9, n. 2896, 2018.
- WEELE, P. V.; LOGCHEM, E. V.; WOLFFS. *et al.* **J. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women.** *Journal of Clinical Virology.* v. 83, p. 6-11, 2016.
- WELT, C.K.; TAYLOR, A.E, FOX, J. *et al.* **Follicular arrest in polycystic ovary syndrome is associated with deficient inhibin A and B biosynthesis.** *J Clin Endocrinol Metab.* Oct;90(10):5582-7. 2005.
- WHARTON, S.B.; MALTBY, E.; JELLINEK, D.A. *et al.* **Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p, 19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed non-proliferating cells.** *Acta Neuropathol (Berl)* 113: 119-127. 2007
- WHO Classification of Tumours Editorial Board . Female Genital Tumours.** 5th ed. Volume 4 *International Agency for Research on Cancer*; Lyon, France: 2020.
- WORBS, S.; SHABANI, N.; MAYR, D. *et al.* **Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers.** *Oncol Rep.* Jan;17(1):97-104. PMID: 17143484. 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Executive board, session 144; document EB144/28, 30 January, 2019.
- YOSHIDA, H.; SHIRAISHI, K.; KATO T. **Molecular Pathology of Human Papilloma Virus-Negative Cervical Cancers.** *Cancers (Basel).* Dec 17;13(24):6351. 2021.
- YU, S.; WANG, G.; SHI Y. *et al.* **MCMs in Cancer: Prognostic Potential and Mechanisms.** *Anal Cell Pathol (Amst).* Feb 3;2020
- ZANNONI, G.F.; TRAVAGLINO, A.; RAFFONE, A. *et al.* **Depth of Stromal Invasion as the Most Prognostically Relevant Regression System in Locally Advanced Cervical Cancer after Neoadjuvant Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis Grading.** *Diagnostics (Basel).* ep 26;11(10):1772. 2021.
- ZARE, S.Y., AISAGBONHI, O., HASTEH, F. *et al.* **independent validation of tumor budding activity and cell nest size as determinants of patient outcome in squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *Am. J. Surg. Pathol.* 44:1151–1160. 2020.
- ZHANG, J.; WANG, L.; QIU, M. *et al.* **The protein levels of MCM7 and p63 in evaluating lesion severity of cervical disease.** *Int J Gynecol Cancer.*;23(2):318-324. 2013
- ZHANG, J. & LU, C. X. **Spontaneous Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia 2: A Meta-analysis.** *Gynecol Obstet Invest.* v. 3, p. 1-6, 2019.
- ZHANG, J.; ZHANG, H.; XIU, Y. *et al.* **N. Prognostic Significance of P16^{INK4a} Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis.** *Biomed Res Int.* Jul 19; 2018:8345893. 2018.
- ZHENG, W.; LUO, M.P.; WELT, C. *et al.* **Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer.** *Gynecol Oncol.* Apr;69(1):23-31. 1998.

ZHENG, T.; CHEN, M.; HAN, S. *et al.* **Plasma minichromosome maintenance complex component 6 is a novel biomarker for hepatocellular carcinoma patients.** *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology.* 44(13):1347-1356. 2014.

ZHENG, R.R.; HUANG, M.; JIN, C. *et al.* **Cervical cancer systemic inflammation score: a novel predictor of prognosis.** *Oncotarget.* Mar 22;7(12):15230-42. 2016

ZHOU, Y.M.; ZHANG, X.F.; CAO, L; Li B. *et al.* **MCM7 expression predicts post-operative prognosis for hepatocellular carcinoma.** *Liver Int .* 32: 1505–1509. 2012.

ZOLCIAK-SIWINSKA, A.; JONSKA-GMYREK, J.; STANIASZEK J. *et al.* **HDR brachytherapy combined with interstitial hyperthermia in locally advanced cervical cancer patients initially treated with concomitant radiochemotherapy: a phase I study.** *Int J Hyperthermia.* 28(8):715. 202012. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23126254

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

MATERIAL SUPLEMENTAR

ANEXO 1- PATOGÊNESE E EVOLUÇÃO DAS LESÕES CERVICAIS

O modelo atualmente mais aceito para o desenvolvimento do câncer cervical postula que o mesmo ocorra a partir das lesões escamosas intraepiteliais (LEIs), histologicamente denominadas Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). Essa classificação representa o principal modelo teórico de identificação morfológica de lesões precursoras do câncer cervical. Tais lesões são caracterizadas microscopicamente como lesões proliferativas que apresentam células com diferentes graus de atipias e maturações anormais, que podem estar presentes em parte ou em toda a espessura do epitélio escamoso cervical (ZUR HAUSEN, 2002).

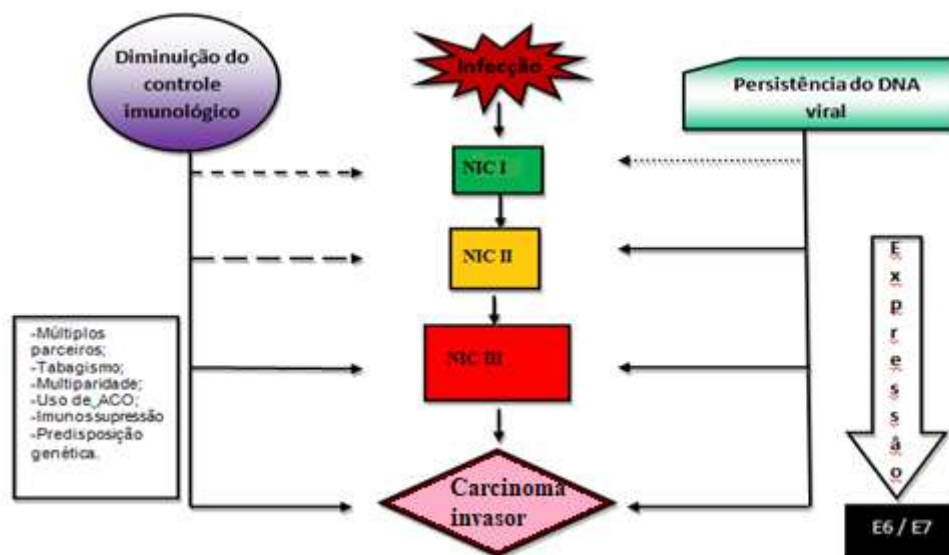


Figura S1- Fatores envolvidos na progressão das Lesões Escamosas Intraepiteliais ao Carcinoma Invasor. A infecção persistente pelo HPVs de AR associada a diversos fatores predisponentes está relacionada à progressão das lesões intraepiteliais, que podem evoluir até os Carcinomas invasores. **Fonte:** Zur Hausen, 2002 - Modificado.

Epidemiologistas tem demonstrado que o risco de desenvolver câncer do colo está intimamente relacionado ao comportamento sexual, o que justifica a grande associação com a infecção pelo vírus 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 S1). Sabe-se também que a infecção pelo HPV é essencial, mas não suficiente para a evolução

do câncer (BOSCH & de SANJOSÉ, 2002). Embora a infecção persistente pelo HPV seja a causa necessária para o desenvolvimento do CCE, 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,) poderiam contribuir para o aumento da probabilidade de progressão das lesões intraepiteliais cervicais em direção ao carcinoma invasor (THOMISON, *et al*, 2008; BOSCH & SANJOSÉ, 2002).

Histologicamente, a localização dessas alterações ao longo da extensão do tecido determina a existência de três graus de lesões precursoras: NIC I, com distúrbios celulares comprometendo o terço inferior do epitélio; NIC II, com alterações celulares alcançando os dois terços inferiores do epitélio; NIC III ou Carcinoma *in situ*, com distúrbios celulares atingindo toda a espessura do epitélio (NUCCI & OLIVA)

Os eventos mais importantes na progressão das NICs ao câncer cervical, são geralmente resultado da desregulação na expressão das oncoproteínas transformantes E6 e E7 e dos HPVs de AR, decorrente do fenômeno de Integração, que levaria **(i)** ao aumento da proliferação celular nas camadas inferiores do epitélio, **(ii)** à interrupção do programa de diferenciação das células da camada supra-basal do epitélio escamoso e à reentrada dessas células no ciclo celular, o que resulta na simultânea replicação dos genomas celulares e virais, e **(iii)** à instabilidade do sistema de reparo em reverter mutações e outras alterações no DNA celular. Associadas a esses eventos, alterações na transcrição de genes virais e do hospedeiro, e a amplificação persistente do DNA viral contribuiriam para a geração de instabilidade genômica, e facilitariam a progressão das células infectadas para um crescimento invasivo (MCBRIDE & WARBURTON, 2017; KADAJA *et al.*, 2007; ZUR HAUSEN, 2002).

As LEIs podem regredir, persistir ou progredir, dependendo da resposta imune de cada paciente. Muitos trabalhos têm demonstrado resultados de regressão, persistência e progressão dessas lesões (ZHANG & LU, 2019; COLIE *et al.*, 2018). A história natural das lesões mostra que as lesões do tipo NIC I regredem espontaneamente na maioria dos casos. Porém lesões de alto grau (NIC II ou NIC III) possuem chances maiores de progressão ao câncer cervical. Aproximadamente 20% das NICs I progridem para NIC II, 30% destas lesões irão progredir para NICIII e 40% dessas lesões irão progredir ao câncer invasivo (ZHANG & LU, 2019).

ANEXO II- A BIOLOGIA DO VIRUS HPV

O HPV é um vírus com DNA circular, apresentando cerca de 8000 pares de bases que codificam oito genes, que são classificados de acordo com seus padrões de expressão como precoces (do inglês *Early-region*) que codificam as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 envolvidas na replicação viral e transformação celular, e os tardios (do inglês *Late-region*) que expressam L1 e L2, proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral, encapsulamento do DNA viral, entrada e tráfico celular do HPV. Por último existe ainda uma região reguladora longa (LCR – do inglês *Long Control Region*), que possui função de regular a duplicação e a expressão gênica do HPV, e na qual se encontra a Origem de Replicação Viral (ORI); Figura S2 (GROVES & COLEMAN, 2018; GRAHAM, 2017; RICHARDS *et al.*, 2014; DOORBAR, 2012;).

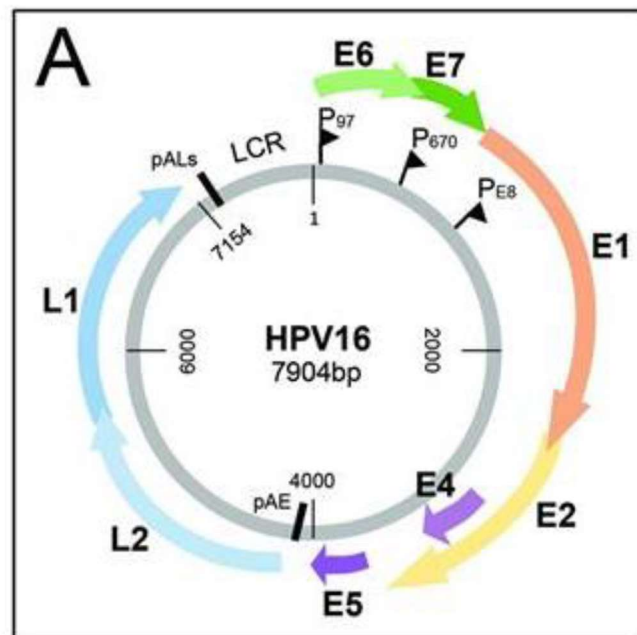


Figura S2: Representação esquemática do genoma do HPV. A região precoce está representada na imagem em diferentes cores compostas pelos genes regulatórios E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A região tardia que apresenta os genes L1 e L2 representados em azul na imagem, e por último, representada de cinza, a região reguladora longa (LCR – do inglês *Long Control Region*). **Fonte:** Adaptado de GRAHAM, 2017.

O HPV tem sua classificação baseada de acordo com a homologia de nucleotídeos do gene de L1 (DE VILLIERS *et al.*, 2004). Neste sentido, o HPV é dividido nos gêneros

Alpha, *Beta*, *Gamma*, *Nu* e *Mu* (Figura S3). Mais de 200 genótipos foram descritos, sendo o número de cada subtipo referente a ordem de sua descoberta (DOORBAR, 2012; DE VILLIERS, 2013; VAN). O gênero *Alphapapillomavirus* possui mais de 40 espécies descritas, apresentando tropismo por tecido epitelial.

Os tipos específicos de papilomavírus são classificados segundo o seu tropismo em cutaneotrópicos e mucosotrópicos e causam lesões com patologias clínicas distintas (DOORBAR *et al.*, 2015; EGAWA *et al.*, 2015).

Com relação a oncogenicidade são classificados em tipos de alto e baixo-risco (EGAWA & DOORBAR, 2017; DE SANJOSE, 2018). Os subtipos considerados de baixo-risco (BR), (destacando-se 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) provocam mais comumente lesões benignas, incluindo verrugas genitais, plantares e palmares, bem como outras lesões de pele.

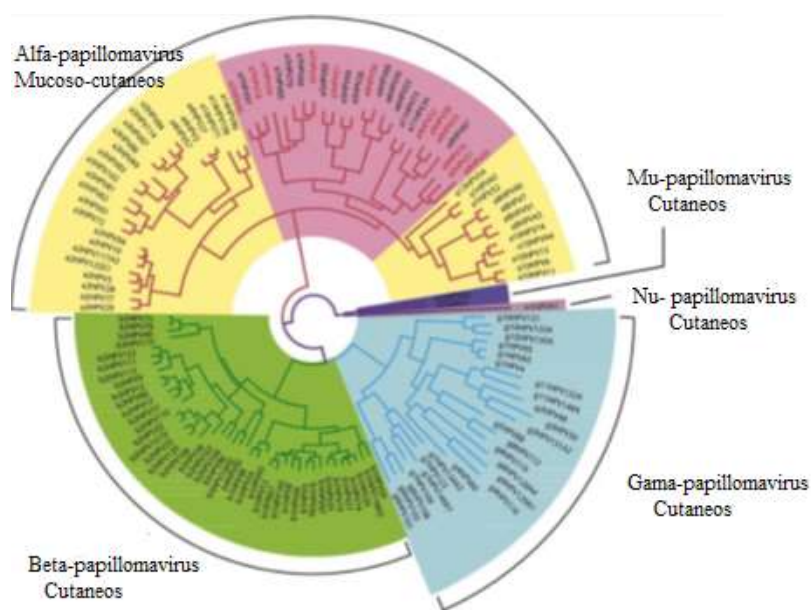


Figura S3: Árvore filogenética dos Papilomavírus Humano (HPVs). Os HPVs são divididos em cinco gêneros: *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Nu-papillomavirus* e *Mu-papillomavirus*. O gênero *Alpha-papillomavirus* (representado de amarelo e rosa) é o de maior relevância clínica por causar lesões mais recorrentes. Na porção destacada em amarelo estão representados os tipos virais de baixo-risco oncogênico que infectam a pele e mucosas, e em rosa, os HPVs de alto-risco oncogênico relacionados com o desenvolvimento de lesões pré-invasivas e do câncer. **Fonte:** Adaptado de EGAWA & DOORBAR, 2017.

Os subtipos de alto-risco (AR) são representados principalmente pelos genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59. No caso específico dos HPVs de alto-risco, é descrita na literatura uma variação na distribuição geográfica do vírus. Entretanto os

subtipos 16 e 18 possuem maior predominância e são relatados em cerca de 70% das neoplasias malignas do colo do útero (PIROG *et al.*, 2014; DE SANJOSE *et al.*, 2010).

Os HPVs dependem da diferenciação dos queratinócitos para a sua replicação. O acesso do vírus às suas células alvo depende de microfissuras presentes no tecido, que expõem as células da camada basal do epitélio escamoso estratificado. A captação e a penetração do vírus na célula acontecem por um mecanismo de endocitose semelhante à micropinocitose, iniciando assim o ciclo viral (RICHARDS *et al.*, 2014; DOORBAR, 2012).

Uma vez dentro da célula, a acidez do endossomo favorece a liberação do DNA viral do capsídeo. A perda do capsídeo viral dentro da célula basal do hospedeiro permite que o DNA do vírus seja transportado para o núcleo, onde irá sofrer a ação de fatores nucleares da célula hospedeira, que interagem com a região LCR do vírus, ativando a replicação e a transcrição virais. O vírus utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para se replicar a partir da divisão de células e da diferenciação do epitélio. Os Papilomavírus devem replicar o seu genoma e empacotá-lo em partículas virais, formando novos vírions infecciosos, sendo necessária a produção da proteína E4, associada à maturação viral e à alteração da matriz intracelular, além das proteínas L1 e L2 do capsídeo, que são responsáveis por montar as novas partículas virais que estarão prontas para serem liberadas. Esse é o ciclo clássico do HPV para a produção de vírus, ou ciclo produtivo; (Figura S4) (DIGIUSEPPE *et al.*, 2016; RICHARDS *et al.*, 2014; DOORBAR, 2012, HORVATH *et al.*, 2010; BLACHON & DEMRET, 2003).

A integração do genoma de HPVs AR é frequentemente descrita nos casos de CCE. Durante o evento de integração, o DNA viral é linearizado o que resulta na perda de alguns genes virais, dentre eles o gene *E2*. Nesses casos, a proporção entre *E1/E2* é modificada, favorecendo assim a perda de controle da expressão dos genes virais *E6* e *E7*. Os genes *E6* e *E7* codificam oncoproteínas que podem estimular a proliferação e a transformação das células hospedeiras, cooperando sinergicamente na imortalização celular, levando ao desenvolvimento do CCE (Figura S4). Ambas consistem em proteínas multifuncionais que podem associar-se a proteínas reguladoras do ciclo celular. Mais especificamente, as interações celulares desencadeadas por *E6* e *E7* são respectivamente a degradação da proteína supressora de tumor p53 e a inibição da Proteína do Retinoblastoma (pRb,) contribuindo com a proliferação celular descontrolada, supressão de apoptose e aumento na atividade da telomerase; (PAL & KUNDU, 2020; BURK *et al.*, 2017).

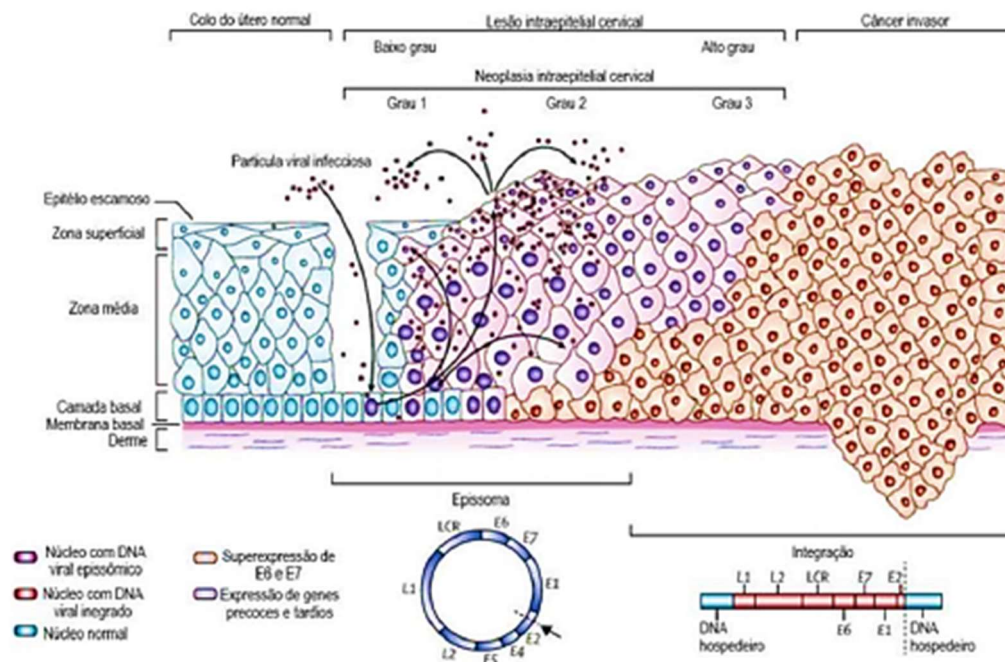


Figura S4. Ciclo de vida do HPV e progressão das lesões intraepiteliais. A figura mostra a exposição das células basais do epitélio por microfissuras, que dessa forma são infectadas pelo HPV. O DNA viral na forma episossomal é transportado ao núcleo da célula hospedeira (núcleos roxos). Nas camadas mais superficiais do epitélio o vírus inicia seu processo de replicação. A progressão de lesões de alto grau para o câncer invasor está associada com o rompimento do episossoma na porção *E2* do genoma e à integração do DNA viral ao do hospedeiro (núcleos vermelhos), levando à superexpressão das oncoproteínas *E6* e *E7*. **Fonte:** Adaptado de CROSBIE *et al.*, 2013.

ANEXO III- AÇÕES DE PREVENÇÃO E CONTROLE DO CANCER DE COLO UTERINO

O câncer do colo do útero (CCE) é considerado como um problema de Saúde pública no Brasil, por se tratar de uma enfermidade de grande impacto na sociedade, com altas taxas de prevalência e letalidade entre as mulheres, que muitas vezes ainda estão num período bastante produtivo de suas vidas (DA COSTA *et al.*, 2017).

Uma característica desse tipo de câncer é a sua consistente associação em todas as regiões do mundo, com o baixo Score 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 consistentemente relacionado a vários indicadores de menor poder socioeconômico, incluindo o Score de educação, a renda e a falta de ocupação. Alguns fatores relacionados ao comportamento sexual são considerados de risco para o desenvolvimento do CCE, 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 de cronificação da infecção pelo vírus do Papiloma Humano (PARIKH, 2003).

As ações para a prevenção do câncer de colo do útero no país ocorrem basicamente por meio de três pilares: educação em saúde, detecção precoce das lesões precursoras mediante seu rastreamento, e vacinação de grupos indicados (BRASIL, 2016).

A Educação em saúde é um pilar importante nessa tríade, e compreende a realização de campanhas educativas voltadas para a prevenção das doenças, o que torna fundamental o conhecimento e a busca de auxílios nas Unidades de Saúde e centros educativos, com estratégias visando a cobertura da comunidade e apontando as principais ações necessárias, voltadas para públicos alvo e diminuindo os casos de óbitos no Brasil (SILVA *et al.*, 2017)

O segundo pilar seria o exame citopatológico, considerado a forma mais eficaz de rastreamento precoce do CCE, mas para isso é muito importante atingir de forma satisfatória a maior cobertura possível da população alvo, no âmbito da Atenção Primária, para que assim se obtenha redução significativa da incidência e da mortalidade por câncer do colo do útero. Segundo dados da literatura, as perspectivas para o que se considera de “eliminação da doença” - ou seja, quando a taxa de câncer cervical é reduzida ao mínimo e não é mais considerada prevalente na população- é atualmente definida como uma taxa abaixo de 4 casos por 100.000 mulheres ao ano (LEHTINEN, *et al.*, 2019).

Em 2018, a OMS lançou uma convocação mundial para a tentativa de eliminação do câncer cervical, de modo que o controle da doença não seria mais o objetivo principal, mas sim a remoção da circulação de um dos principais agentes biológico carcinogênico conhecido no mundo, o HPV. Um bom exemplo de sucesso nessa campanha é observado na Austrália, onde um plano com esse foco já foi colocado em prática, a partir de métodos de triagem diferentes: rastreamento citológico a cada 2 anos para mulheres com idade inicial entre 18-20 anos indo até aos 69 anos e realização do teste de HPV primário, a cada 5 anos, para mulheres de 25-69 anos. Além disso, houve grande investimento nas campanhas de vacinação em massa, inclusive incluindo os meninos, em 2013, já utilizando a vacina Nonavalente desde 2018. Com isso espera-se que a eliminação da doença possa ser atingida naquele Continente até 2028/35 (HALL, *et al.*, 2019; WHO, 2019).

No Brasil, segundo as Diretrizes do Ministério da Saúde, o método de rastreamento utilizado na prevenção do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras é o exame citológico, também conhecido como Papanicolaou. Segundo LOPES & RIBEIRO (2019) este é um exame simples, seguro e “acessível”, ofertado no Brasil gratuitamente nas Unidades Básicas de Saúde. Os dois primeiros exames devem ser realizados com intervalo anual, a partir dos 25 anos de idade, e se ambos os resultados forem negativos, os próximos devem ser realizados a cada 3 anos. Os exames periódicos devem seguir até os 64 anos de idade. Para mulheres com mais 64 anos de idade e que nunca se submeteram ao exame citopatológico, deve-se realizar dois exames com intervalo de um a três anos. Se ambos os exames forem negativos, essas mulheres podem ser dispensadas de exames adicionais (ASHTARIAN *et al.*, 2017; BRASIL, 2016;). Mas infelizmente, ainda nos dias de hoje, muitas mulheres não realizam o exame por motivos como: medo, vergonha, ansiedade, ignorância, dificuldade de acesso aos Serviços de Saúde, falta de informação e falta de confiança no profissional de saúde (LOPES & RIBEIRO, 2019).

O terceiro pilar para a prevenção do Câncer cervical seria a vacinação contra o HPV. O monitoramento dos Programas de vacinação é fundamental para avaliar o seu desempenho, quanto a cobertura e o impacto do uso das vacinas, e sua relação com os índices de desenvolvimento e progressão das doenças relacionadas ao HPV. Desde o licenciamento das vacinas em 2006, os Programas de vacinação foram progressivamente introduzidos em muitos países, principalmente visando jovens meninas adolescentes de 10 a 14 anos (BRUNI *et al.*, 2016).

Anos após sua implementação, a vacina contra o HPV demonstrou sua eficácia sobre três principais desfechos, sendo o primeiro deles relacionado a diminuição da infecção pelo Papilomavírus humano, que é condição determinante para a ocorrência de câncer cervical e lesões intraepiteliais de alto grau. O segundo diz respeito à incidência de verrugas anogenitais. A literatura foi ampla em demonstrar a eficácia da vacina contra o HPV, na redução da incidência de condilomas observada em países como a República Tcheca, Austrália, Dinamarca, Suécia, Nova Zelândia, EUA e aqui mesmo no Brasil. E finalmente, o terceiro aspecto relacionado à eficácia da vacina contra o HPV está associado à redução de lesões cervicais de alto grau, que apresentam maior chance de progressão ao câncer de colo uterino. Estudos realizados na Austrália e na Dinamarca demonstraram associação estatisticamente significativa entre a vacinação e a queda na prevalência das lesões de alto grau (BALDUR-FELSKOV *et al.*, 2014; CROWE, *et al.*, 2014; BAANDRUP, *et al.*, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde, dados publicados em 2018 sobre a cobertura vacinal contra a infecção pelo HPV no país, revelaram que 4 milhões de meninas entre 9 e 14 anos completaram o esquema vacinal, correspondendo a 41,8% da população feminina nessa faixa etária. Já entre os meninos de 11 a 14 anos, apenas 911 mil receberam as duas doses da vacina, correspondendo a apenas 12,7% dessa população-alvo. Cabe a ressalva de que, na época do levantamento realizado, a vacina estava disponível para meninos há apenas um ano – em 2017. Em relação à população de meninas vacinadas, ainda que a cobertura de 41,8% alcançada seja um avanço, ela está distante da meta de 70% estabelecido pelo Ministério da Saúde (PACHECO, 2019; MINISTERIO DA SAUDE, 2018).

Sendo assim, tornam-se necessárias ações para aumentar a adesão populacional à vacina contra o HPV. Algumas estratégias podem melhorar a cobertura vacinal infantil em países de baixa e média renda como oferecer maior informações os pais e outros membros da comunidade sobre a importância da vacinação, promover a integração da vacinação com outros Serviços de Saúde. Além disso, o modelo de Assistência Primária à Saúde (APS) do SUS permite estratégias mais ativas para aumentar a adesão, como a flexibilização do horário de funcionamento das Unidades Básicas de Saúde, a vacinação de casa em casa ou nas escolas, visitas domiciliares periódicas dos agentes comunitários de saúde, com o objetivo de verificar o *status* vacinal da população, e prover informações sobre a importância de prevenir a infecção pelo HPV (MESHER *et al.*, 2016; BRUNI *et al.*, 2019.)

Portanto, é necessário que haja uma real preocupação com a gravidade da doença por parte de todos os responsáveis nos níveis Federais, Estaduais e Municipais, com uma visão holística, integral e humanizada, visando garantir o acesso aos Serviços de Saúde, e uma assistência de qualidade proporcionada por profissionais qualificados, com uma infraestrutura adequada (SILVA *et al.*, 2017).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -MATERIAL SUPLEMENTAR

ASHTARIAN, H.; MIRZABEIGI, E.; MAHMOODI, E.; KHEZELI, M. **Knowledge about Cervical Cancer and Pap Smear and the Factors Influencing the Pap test Screening among Women.** *International journal of community based nursing and midwifery.* v. 5, n. 2, p. 188–195. 2017.

BAANDRUP, L; BLOMBERG, M; DEHLENDORFF, C; *et al.* **Significant decrease in the incidence of genital warts in young Danish women after implementation of a national human papillomavirus vaccination program.** *Sex Transm Dis.* Feb;40(2):130-5. 2013

BALDUR-FELSKOV, B; DEHLENDORFF, C; JUNGE, J; *et al.* **Incidence of cervical lesions in Danish women before and after implementation of a national HPV vaccination program.** *Cancer Causes Control.* 2014 Jul;25(7):915-22. 2014.

BLANCHON, S & DEMRET C. **The Regulatory E2 Proteins of Human Genital Papillomavirus are pro-apoptotic.** *Biochimie;* 85: 813-819. 2003.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016.

BRUNI, L; ALBERO, G; SERRANO, B; *et al.* **ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World.** Barcelona: *HPV Information Centre;* 2016.

BRUNI, L; SAURA-LÁZARO, A; MONTOLIU, A; *et al.* **HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010-2019.** *Prev Med.* 2021 Mar;144:106399. 2019.

BURK, D *et al.* **Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer.** *Nature,* v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017.

COLIE, C.; MICHEL, K. G.; MASSAD, L. S.; *et al.* **Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia-2 in HIV-Positive Women of Reproductive Age.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* v. 79, n. 5, p. 573-579, 2018.

CROSBIE, E.J; EINSTEIN, M.H; FRANCESCHI, S, KITCHENER, H.C. **Human papillomavirus and cervical cancer.** *Lancet.* 2013 Sep 7;382(9895):889-99. 2013

CROWE, E; PANDEYA, N; BROTHERTON, J.M; *et al.* **Effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccine for the prevention of cervical abnormalities: case-control study nested within a population based screening programme in Australia.** *BMJ.* Mar 4;348:g1458. 2014.

DA COSTA F. K. M; WEIGERT, S.P; BURCI, L. *et al.* Os desafios do enfermeiro perante a prevenção do câncer do colo do útero. **RGS**, v. 17, n. 1, p. 55-62, 2017.

DE VILLIERS, E.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; *et al.* **Classification of papillomaviruses.** *Virology.* v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE VILLIERS & ETHEL-MICHELE. **Cross-roads in the classification of papillomaviruses.** *Virology*, v. 445, n. 1–2, p. 2–10, out. 2013.

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

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

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

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

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

HALL, M.T; SIMMS, K.T; LEW, J.B; *et al.* **The projected timeframe until cervical cancer elimination in Australia: a modelling study.** *Lancet Public Health.* ; 4(1):e19–e27. 2019.

HORVATH, C.A; BOULET, G.A; RENOUX, V.M. *et al.* **Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview.** *Virol J* 7: 11. 2010.

LEHTINEN, M; BAUSSANO, I; PAAVONEN, J; *et al.*; **Eradication of human papillomavirus and elimination of HPV-related diseases—scientific basis for global public health policies.** *Expert Ver Vaccines*; 18(2):153–160]. 2019.

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

LOPES & RIBEIRO. **Cervical cancer control limiting factors and facilitators: a literature review.** *Cien Saude Colet.* Sep 9;24(9):3431-3442. 2019

KADAJA, M.; *et al.* **Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery.** *Embo J*, v. 26, p. 2180-2191, 2007.

MCBRIDE AA, WARBURTON A. **The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers.** *PLoS Pathog.* Apr 6;13(4):e1006211. 2017.

MESHER, D; SOLDAN, K; LEHTINEN, M; *et al.* **Population-Level Effects of Human Papillomavirus Vaccination Programs on Infections with Nonvaccine Genotypes.** *Emerg Infect Dis.* Oct;22(10):1732-40. 2016.

PACHECO, F.C; FRANÇA, G.V.A; ELIDIO, G.A; *et al.* **Trends and spatial distribution of MMR vaccine coverage in Brazil during 2007-2017.** *Vaccine.* May 6;37(20):2651-2655. 2019

PAL, A & KUNDU, R.; **Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 21 jan. 2020

PIROG, *et al.* **HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases.** *Modern Pathology*, v. 27, n. 12, p. 1559–1567, 25 dez. 2014.

RICHARDS, K.F; MUKHERJEE, S; BIENKOWSKA-HABA, M; *et al.* **Human papillomavirus species-specific interaction with the basement membrane-resident non-heparan sulfate receptor.** *Viruses.* Dec 5;6(12):4856-79. 2014

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

SILVA LR, ALMEIDA CAPL, SÁ GGM. *et al.* **Educação em saúde como estratégia de prevenção do câncer do colo do útero: revisão integrativa.** *Rev Pre Infec e Saúde[Internet]* 3(4):35-45. 2017.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Executive board, session 144; document EB144/28, 30 January, 2019.

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

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

TABELAS

ANEXO IV- DADOS REFERENTES AS ANÁLISES DE α -INIBINA

| Número | Mês/ano | % Células | | Porcentagem α -Inibina | | | | Intensidade α -Inibina | | | | Idade | Grau do tumor |
|--------|---------|-----------|----|-------------------------------|---|----------|---|-------------------------------|---|----------|---|-------|---------------|
| | | FD | FI | Score FD | | Score FI | | Score FD | | Score FI | | | |
| | | | | N | C | N | C | N | C | N | C | | |
| 6 | 05/10 | 0 | 4 | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 | 39 | 1 |
| 8 | 03/11 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 34 | 1 |
| 9 | 07/10 | 4 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 25 | 1 |
| 11 | 06/11 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 51 | 1 |
| 13 | 06/11 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 59 | 1 |
| 16 | 05/11 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 45 | 1 |
| 19 | 03/11 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | 3 | 2 | 74 | 1 |
| 21 | 07/10 | 4 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 42 | 1 |
| 25 | 04/12 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 40 | 1 |
| 29 | 07/11 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | 4 | 2 | 62 | 1 |
| 30 | 01/11 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 60 | 1 |
| 32 | 01/11 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 3 | 3 | 38 | 1 |
| 1 | 02/11 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 46 | 2 |
| 3 | 05/09 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 50 | 2 |
| 4 | 07/09 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 1 | 4 | 1 | 63 | 2 |
| 5 | 07/09 | 3 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 4 | 2 | 75 | 2 |
| 7 | 09/10 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 53 | 2 |
| 4 | 03/11 | 4 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 48 | 2 |
| 12 | 09/11 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 32 | 2 |
| 15 | 05/11 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 34 | 2 |
| 17 | 07/08 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 30 | 2 |
| 18 | 06/09 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 2 | 42 | 2 |
| 20 | 02/11 | 1 | 1 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 1 | 2 | 1 | 38 | 2 |
| 22 | 09/11 | 1 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 57 | 2 |
| 23 | 07/08 | 3 | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | 1 | 1 | 2 | 4 | 52 | 2 |
| 24 | 07/09 | 1 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | 1 | 2 | 37 | 2 |
| 26 | 12/12 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 70 | 2 |
| 27 | 08/09 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 72 | 2 |
| 28 | 12/11 | 1 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 1 | 45 | 2 |

Legenda: FD=Fenótipo diferenciado; FI= Fenótipo indiferenciado; N=núcleo; C= citoplasma ; 1= Carcinoma pouco diferenciado; 2= Carcinoma moderadamente diferenciado

ANEXO V- DADOS REFERENTES AS ANÁLISES DA SUBUNIDADE β A

| Caso | Mês/ano | % Células | | PORCENTAGEM β A | | | | INTENSIDADE β A | | | | Grau do tumor | Idade |
|------|---------|-----------|----|-----------------------|---|----|----|-----------------------|----|----|----|---------------|-------|
| | | FD | FI | FD | | FI | | FD | | FI | | | |
| | | | | N | C | N | C. | N | C. | N | C. | | |
| 6 | 05/10 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 3 | 3 | 1 | 39 |
| 8 | 03/11 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 | 34 |
| 9 | 07/10 | 4 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 | 25 |
| 11 | 06/11 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | 4 | 4 | 1 | 51 |
| 13 | 06/11 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 59 |
| 16 | 05/11 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 45 |
| 19 | 03/11 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 2 | 3 | 1 | 74 |
| 21 | 07/10 | 4 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 | 42 |
| 25 | 04/12 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 | 40 |
| 29 | 07/11 | 4 | 1 | 2 | 4 | 3 | 4 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 | 62 |
| 30 | 01/11 | 4 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 60 |
| 32 | 1/11 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | 4 | 4 | 1 | 38 |
| 1 | 2/11 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 46 |
| 3 | 05/09 | 4 | 4 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 2 | 50 |
| 4 | 07/09 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 63 |
| 5 | 07/09 | 3 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 2 | 75 |
| 7 | 09/10 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 3 | 2 | 4 | 1 | 2 | 53 |
| 10 | 03/11 | 4 | 0 | 34 | 5 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 48 |
| 12 | 09/11 | 4 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 32 |
| 15 | 05/11 | 4 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 34 |
| 17 | 07/08 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 30 |
| 18 | 06/09 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 42 |
| 20 | 02/11 | 1 | 1 | 3 | 4 | 2 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 38 |
| 22 | 09/11 | 1 | 3 | 1 | 3 | 0 | 4 | 1 | 3 | 0 | 4 | 2 | 57 |
| 23 | 07/08 | 3 | 3 | 1 | 4 | 3 | 5 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 52 |
| 24 | 07/09 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 4 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 37 |
| 26 | 12/12 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 2 | 4 | 2 | 70 |
| 27 | 08/09 | 4 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 72 |
| 28 | 12/11 | 1 | 4 | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 45 |

Legenda: FD=Fenótipo diferenciado; FI= Fenótipo indiferenciado; N=núcleo; C= citoplasma; 1= Carcinoma pouco diferenciado; 2= Carcinoma moderadamente diferenciado

ANEXO VI- DADOS REFERENTES AS ANÁLISES DA PROTEÍNA MCM7

| Caso | Mês/ano | p16 | Profundidade. mm | Idade | Grau | FIGO | Metástase direta | Metástase distancia | Linfonodos | Tratamento | óbito | observação |
|------|---------|-----|------------------|-------|------|----------|------------------|---------------------|------------|--------------|-------|--|
| 22 | 09/11 | 1 | 4 | 57 | 2 | IA1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | Invasão do miométrio |
| 49 | 01/20 | 1 | 15 | 42 | 2 | IA1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | |
| 29 | 07/11 | 1 | 5 | 62 | 1 | IA2 | 0 | 0 | 0 | QT | 0 | Adenocarcinoma associado |
| 8 | 03/11 | 1 | 4 | 34 | 1 | IB | 0 | 0 | 0 | QT | 0 | - |
| 20 | 02/11 | 1 | 5 | 38 | 2 | IB1 | 1 | 0 | 0 | HTA | NI | Metástase Bexiga |
| 9 | 07/10 | 1 | 10 | 25 | 1 | IB1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 13 | 06/11 | 1 | 80 | 59 | 1 | IB1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 1 | 02/11 | 1 | 7 | 46 | 2 | IB1 | 0 | 0 | 0 | QT +RT | 0 | - |
| 10 | 03/11 | 1 | 14 | 48 | 2 | IB1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 12 | 09/11 | 1 | 2 | 32 | 2 | IB1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 38 | 01/21 | 1 | 8 | 45 | 2 | IB1 | 0 | 0 | 0 | QT +RT | 0 | Em exames de acompanhamento |
| 45 | 05/19 | 1 | 1 | 46 | 2 | IB1 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | HIV + |
| 56 | 08/20 | 1 | 10 | 36 | 2 | IB1 | 1 | 0 | | HTA+ QT + RT | | Metástase Bexiga |
| 15 | 05/11 | 1 | 15 | 34 | 2 | IB2 | 0 | 0 | 0 | HTA + RT | NI | último dado do prontuário 2011 |
| 21 | 07/10 | 1 | 25 | 42 | 1 | IB2 | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 40 | 05/19 | 1 | 5 | 76 | 1 | IIB | 1 | 1 | 1 | QT+RT+BRAQ. | 0 | Recidiva vaginal/ metástase Pulmão e osso |
| 58 | 02/20 | 1 | 4 | 41 | 2 | IIB | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 43 | 10/20 | 1 | 4 | 43 | 2 | IIB /IVA | 1 | 1 | 1 | QT +RT | 1 | Recidiva vaginal/metástase. |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---|----|----|---|------|----|----|---|-----------------|----|--|
| | | | | | | | | | | | | reto, bexiga/ obito 11/21 |
| 26 | 12/12 | 1 | 7 | 70 | 2 | IIIA | 1 | 1 | 1 | QT + RT | NI | Recidiva 1 ano/ metástase pulmão |
| 31 | 10/11 | 1 | 5 | 33 | 1 | IIIB | 1 | 1 | 1 | QT + RT | NI | Metástase Renal |
| 5 | 07/09 | 1 | 3 | 75 | 2 | IIIB | 1 | 0 | 0 | QT + RT | NI | Metástase pélvica |
| 46 | 05/20 | 1 | 12 | 35 | 2 | IIIB | 1 | 1 | 1 | HTA +Qt+RT | 1 | Recidiva Vaginal/ metástase pulmão e bexiga/ obito 04/22 |
| 7 | 09/10 | 1 | 3 | 53 | 2 | IIIB | 0 | 0 | 0 | QT + RT | 0 | - |
| 2 | 01/08 | 1 | 4 | 32 | 2 | IIIB | 1 | 0 | 0 | QT + RT | 0 | Invasão do Miométrio / metástase bexiga |
| 54 | 08/19 | 0 | 6 | 41 | 2 | IVA | 1 | 0 | 0 | QT + RT | NI | metástase bexiga |
| 53 | 03/19 | 0 | 5 | 46 | 2 | IVA | 1 | 1 | 1 | QT + RT | 1 | Data óbito não informada |
| 33 | 06/10 | 1 | 9 | 68 | 2 | IVA | 1 | NI | 1 | QT + RT | 1 | Recidiva vaginal obito 07/12 |
| 50 | 30/20 | 1 | 4 | 60 | 2 | IVA | 1 | 1 | 1 | QT + RT | 1 | Metástase pulmão e bexiga/ obito 08/20 |
| 37 | 07/19 | 1 | 7 | 27 | 2 | IVA | 1 | 0 | 1 | QT +RT+ BRAQ | 1 | Metástase Bexiga e reto/ obito 02/20 |
| 44 | 06/20 | 1 | 7 | 31 | 1 | IVA | 1 | 0 | 0 | QT +RT | 0 | Metástase pélvica/ lupus |
| 35 | 01/20 | 1 | 15 | 45 | 1 | NI | NI | NI | 1 | HTA+QT+RT | NI | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---|----|----|----------|----|----|----|---|---------|----|---|
| 55 | 08/19 | 1 | 3 | 72 | 1 | NI | 1 | 1 | 1 | NI | NI | recidiva Vaginal/metástase pulmão |
| 59 | 01/21 | 0 | 2 | 56 | 2 | NI | 1 | 1 | 1 | QT + RT | NI | Metástase Pulmão e cérebro |
| 36 | 04/20 | 1 | 25 | 38 | 1 | NI | NI | NI | 0 | NI | NI | - |
| 23 | 07/08 | 1 | 4 | 52 | 2 | NI | 1 | 0 | 0 | HTA | NI | - |
| 16 | 05/11 | 1 | 3 | 45 | 1 | NI | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 3 | 05/09 | 1 | 3 | 50 | 2 | NI | 0 | 0 | 0 | QT + RT | 0 | -- |
| 41 | 05/19 | 1 | 3 | 53 | 2 | NI | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 48 | 02/20 | 1 | 15 | 58 | 2 | NI | 0 | 0 | 0 | HTA+RXT | 0 | - |
| 51 | 10/20 | 1 | 6 | 55 | 2 | NI | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | - |
| 6 | 05/10 | 1 | 3 | 39 | 1 | | 0 | 0 | 0 | HTA | 0 | sem lesão residual após HTA |

Legenda: QT= quimioterapia; RT= radioterapia; HTA= histerectomia abdominal total; BRAQ.= braquiterapia

A-ARTIGOS PUBLICADOS:

ARTIGO A1- Infection and disruption of placental multidrug resistance (MDR) transporters: Implications for fetal drug exposure.

ARTIGO A2- Immunostaining of β A-Activin and Follistatin Is Decreased in HPV(+) Cervical Pre-Neoplastic and Neoplastic Lesions.

B- ARTIGOS SUBMETIDOS

ARTIGO B1- RAP1-GTPase Immunostaining is Altered in Human Precancerous and Cancerous Cervical Lesions.

ARTIGO B2- β A- and α -inhibin subunits are differentially expressed in mature and immature cell phenotypes of the squamous cervical carcinoma

C- CAPITULOS DE LIVROS PUBLICADOS

CAPÍTULO 1- Papel do HPV na gênese das lesões pré-malignas do colo do útero

CAPÍTULO 2- Biologia molecular do câncer cervical

CAPÍTULO 3: Lesões intraepiteliais no colo uterino

ARTIGO A1:

Toxicology and Applied Pharmacology 499 (2022) 116544



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yap

Infection and disruption of placental multidrug resistance (MDR) transporters: Implications for fetal drug exposure

C.H.V. Andrade^{a,b}, L.V.A. Lopes^c, T.M. Ortiga-Carvalho^b, S.G. Matthews^{d,e,f,g}, E. Bloise^{c,*}^a Instituto de Medicina Cirúrgica Celso Figueiredo, Laboratório de Endocrinologia, Translacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil^b Departamento de Histologia e Imunologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil^c Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil^d Department of Physiology, Temerty Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Canada^e Department of Obstetrics & Gynecology, Temerty Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Canada^f Department of Medicine, Temerty Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, ON, Canada^g Dana Health System, Dana-Farber Cancer Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada

ARTICLE INFO

Editor: Lawrence Tebb

Keywords:

Infection

Placenta

Multidrug resistance (MDR) transporters

P-glycoprotein (P-gp)/MDR1/ABCB1

Breast cancer resistance protein (BCRP)/

ABCG2

Toll-like receptors (TLR)

ABSTRACT

P-glycoprotein (P-gp, encoded by the ABCB1 gene) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) are efflux multidrug resistance (MDR) transporters localized at the syncytiotrophoblast barrier of the placenta and protect the conceptus from drug and toxin exposure throughout pregnancy. Infection is an important modulator of MDR expression and function. This review comprehensively examines the effect of infection on the MDR transporters, P-gp and BCRP in the placenta. Infectious PAMPs such as bacterial lipopolysaccharide (LPS) and viral polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and flagellin, as well as infection with Zika virus (ZIKV), *Plasmodium falciparum* ANKA (malaria parasite in pregnancy – MIP) and polymicrobial infection of intrauterine infection (chorioamnionitis) all modulate placental P-gp and BCRP at the levels of mRNA, protein and at function, with specific responses varying according to gestational age, trophoblast type and species (human vs. mice). Furthermore, we describe the expression and localization profile of Toll-like receptors (TLR) proteins of the innate immune system at the maternal-fetal interface, aiming to better understand how infective agents modulate placental MDR. We also highlight important gaps in the field and propose future research directions. We conclude that alterations in placental MDR expression and function induced by infective agents may not only alter the intramembrane distribution of important MDR substrates such as drugs, toxins, hormones, cytokines, chemokines and water-soluble foetal, but also impact normal placentation and adversely affect pregnancy outcomes and neonatal/neonatal health.

1. Introduction

Infection during pregnancy may lead to several obstetric/anaesthet conditions. The severity of a gestational infection depends on its nature, intensity and duration and/or on the resulting inflammatory response. This is compounded by fetal genetic background, gestational age, maternal stress levels, intercurrent illness and nutritional/immunological status (Adams Waldorf and McAdams, 2013; Challinor et al., 2007). As such, a group of parasitic/protozoan, bacterial and viral infective agents comprised of *Toxoplasma gondii* (the etiologic agent of toxoplasmosis), *Trichomonas vaginalis* (syphilis), rubella virus (German measles), cytomegalovirus (CMV), and herpes simplex virus (HSV), also known as

“TORCH”, have been classically associated with adverse pregnancy outcomes and teratogenesis (Adams Waldorf and McAdams, 2013). Pregnant women infected with other pathogens such as *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* (malaria), Zika (ZIKV) and even SARS-CoV-2 (COVID-19), as well as other examples including *Staphylococcus aureus* (bacterial vaginosis), vaginal infection with bacterial vaginosis (polyamniotic), influenza virus (flu), human immunodeficiency virus (HIV) and Dengue virus (DENV), may also exhibit a higher risk of adverse pregnancy outcomes (Adams Waldorf and McAdams, 2013; Bloise et al., 2021b; Epöhrlein et al., 2017; Gokoumzin et al., 2016; Wang et al., 2021). These pathogens elicit specific cytokine/chemokine inflammatory responses broadly associated with the induction of miscarriage

* Corresponding author at: Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, PO-302, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil.

E-mail address: ebloise@icb.ufmg.br (E. Bloise).

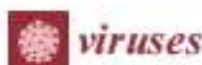
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116544>

Received 10 September 2022; Received in revised form 7 December 2022; Accepted 11 December 2022

Available online 13 December 2022

0273-2303/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

ARTIGO A2:



Article

Immunostaining of β A-Activin and Follistatin Is Decreased in HPV(+) Cervical Pre-Neoplastic and Neoplastic Lesions

Victor Jesus Huaranga Payano ¹, Lara Verónica de Araújo Lope ¹, Larissa Rodrigues Peixoto ¹, Keila Alves da Silva ², Tania Maria Ortega-Carvalho ^{2,3}, Alexandre Tafuri ², Annamaria Ravara Vagó ^{1,4,*} and Enrico Bloise ^{5,6,7}

¹ Laboratório de Patógenos Moleculares, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-910, MG, Brazil

² Laboratório de Endocrinologia Tradicional, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

³ Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, Belo Horizonte 30070-333, MG, Brazil

* Correspondence: aravag@ufmg.br (A.R.V.); eblaise@ufmg.br (E.B.)

[†] These authors contributed equally to this work.

Abstract: The activin–follistatin system regulates several cellular processes, including differentiation and tumorigenesis. We hypothesized that the immunostaining of β A-activin and follistatin varies in neoplastic cervical lesions. Cervical paraffin-embedded tissues from 162 patients sorted in control ($n = 15$), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade I ($n = 38$), CIN2 ($n = 27$), CIN3 ($n = 39$), and squamous cell carcinoma (SCC; $n = 33$) groups were examined for β A-activin and follistatin immunostaining. Human papillomavirus (HPV) detection and genotyping were performed by PCR and immunohistochemistry. Sticker samples were inconclusive for HPV detection. In total, 93% of the specimens exhibited HPV positivity, which increased with patient age. The most detected high-risk (HR)-HPV type was HPV16 (41.2%) followed by HPV18 (16%). The immunostaining of cytoplasmatic β A-activin and follistatin was higher than nuclear immunostaining in all cervical epithelium layers of the CIN1, CIN2, CIN3, and SCC groups. A significant decrease ($p < 0.05$) in the cytoplasmic and nuclear immunostaining of β A-activin was detected in all cervical epithelium layers from the control to the CIN1, CIN2, CIN3, and SCC groups. Only nuclear follistatin immunostaining exhibited a significant reduction ($p < 0.05$) in specific epithelial layers of cervical tissues from CIN1, CIN2, CIN3, and SCC compared to the control. Decreased immunostaining of cervical β A-activin and follistatin at specific stages of CIN progression suggests that the activin–follistatin system participates in the loss of the differentiation control of pre-neoplastic and neoplastic cervical specimens predominantly positive for HPV.

Keywords: β A-activin; follistatin; activin; inhibitor; cervical intraepithelial neoplasia (CIN); squamous cell carcinoma (SCC); human papillomavirus (HPV); HPV genotyping; p16



Citation: Payano, V.J., Lope, L.V., Silva, K.A., Ortega-Carvalho, T.M., Tafuri, A., Vago, A.R., Bloise, E. Immunostaining of β A-Activin and Follistatin Is Decreased in HPV(+) Cervical Pre-Neoplastic and Neoplastic Lesions. *Viruses* **2023**, *15*, 1412. <https://doi.org/10.3390/v15111412>

Academic Editor: Jia S. Myerovik

Received: 29 March 2023

Revised: 30 April 2023

Accepted: 30 April 2023

Published: 23 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer among women, resulting in an estimated mortality rate (2018–2020) of 311,000 women worldwide [1]. The development of cervical cancer is strongly related to high-risk (HR) Human Papillomavirus (HPV) infection [2–4]. However, other endogenous and exogenous risk factors contribute to advancing cervical cancer. Examples of these exogenous factors comprise sexual promiscuity, a diversity of sexual partners, the presence of co-infection, the socio-economic profile [3,5], and HPV typing (high versus low risk) [6].

HPV is a small non-enveloped circular DNA virus classified into two main categories: HR-HPVs, which include the HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68, with HPV16 and HPV18 being the most prevalent and oncogenic ones, and low-risk (LR)-HPVs, which include the HPV types 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, and 81, that are

ARTIGO B1:**Modern Pathology****RAP1-GTPase Immunostaining is Altered in Human Precancerous and Cancerous Cervical Lesions**

--Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | RAP1-GTPase Immunostaining is Altered in Human Precancerous and Cancerous Cervical Lesions |
| Article Type: | Research Article |
| Section/Category: | |
| Keywords: | RAP1-GTPase; immunohistochemistry; cervical intraepithelial neoplasia (CIN); Squamous cell carcinoma (SCC); Human Papillomavirus (HPV) detection; HPV genotyping |
| Corresponding Author: | Adriano Sabino Federal University of Minas Gerais BRAZIL |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Federal University of Minas Gerais |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Paula Cristina de Vasconcelos Vieira |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Paula Cristina de Vasconcelos Vieira Tulio Resende Freitas Lara Verônica de Araújo Lopes Larissa Rodrigues Peixoto Annamaria Ravaro Vago Marcelo Pascoal Xavier Anna Carolina Cañado Figueiredo Karolina Lopes Dias Jaqueline Germano de Oliveira Paulo Guilherme de Oliveira Salles Adriano Sabino Maria Gabrielle de Lima Rocha |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Manuscript Region of Origin: | BRAZIL |
| Abstract: | Cervical cancer (CC), the fourth most common type of cancer in women worldwide is closely associated with human papillomavirus (HPV) infection. RAP1 protein plays important roles in cell biology, participating in several signaling pathways, the assembling and stability of cell junctions, cellular polarity, and migration. We hypothesized that RAP1 immunostaining varies in a cell type-dependent manner in CC progression. Immunolocalization of RAP1 was evaluated in pre-neoplastic and neoplastic lesions and the resulting immunolabeling data was compared with HPV infection. In this retrospective cohort study, cervical paraffin-embedded tissues (PET) from 101 patients were sorted into control (N=13), altered cervicitis (CEH; N=06), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade 1 (N=25), CIN2 (N=17), CIN3 (N=20) and |

| | |
|--------------------------------|--|
| | <p>Squamous cell carcinoma (SCC; N=20) groups. A semiquantitative immunoreactive score was employed to compare labeling intensity, cellular localization, nuclear labeling, percentage, and distribution of reactive cells from stained areas among distinct study groups. HPV detection and genotyping were performed by PCR and Automatic DNA sequencing. Seventy-three % (72/99) of cervical specimens were HPV+. The most detected high-risk (HR)-HPV type was HPV16 (76%) followed by HPV31 (6.45%), HPV33 (4.84%), and HPV45 (3.23%). RAP1 was localized in the nucleus and cytoplasm of all sample tissues. Cytoplasmic immunoscore (IRS) of RAP1 was higher than nuclear IRS in all cervical epithelium layers of CIN1, CIN2, CIN3, and SCC groups. An important increase in the RAP1 intensity labeling was observed according to the lesion severity ($p=0.013$ and 0.017, respectively). These data suggest that the RAP1 intensity staining is a good parameter for identifying more severe cervical injuries. Labeling of RAP1 was predominantly intense regardless of the histopathological grading of SCC: 58% of MSCC and 70% of PSCC exhibited intense immunostaining. Therefore, RAP1 can be considered an efficient biomarker for detecting invasive lesions, but less useful to distinguish between different grades of SCC types.</p> |
| Suggested Reviewers: | |
| Opposed Reviewers: | |
| Additional Information: | |
| Question | Response |

ARTIGO B2:

----- Encaminhado por Enrico Bloise/PROF/MOR/ICB/UFMG em 08/05/2023 12:19 PM -----

Para: ebloise@icb.ufmg.br

De: "Endocrine Pathology" <Lovely.Obico@springernature.com>

Data: 08/05/2023 12:16 PM

Assunto: Endocrine Pathology - Receipt of Manuscript 'α- and βA-...'

Ref: Submission ID 31eb8039-8d4c-4feb-86b0-b8d6d3314d2f

Dear Dr Bloise,

Thank you for submitting your manuscript to Endocrine Pathology.

Your manuscript is now at our initial Technical Check stage, where we look for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies. If there are any points that need to be addressed prior to progressing we will send you a detailed email. Otherwise, your manuscript will proceed into peer review.

You can check on the status of your submission at any time by using the link below and logging in with the account you created for this submission:

https://researcher.nature.com/your-submissions?utm_source=submissions&utm_medium=email&utm_campaign=confirmation-email&journal_id=12022

Kind regards,

CAPITULO C1:

EDITORIA
P PASTEUR

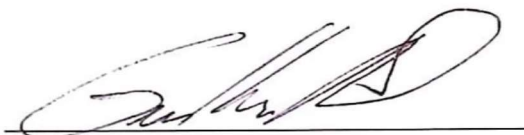
www.editorapasteur.com.br

CARTA DE PUBLICAÇÃO

LARISSA KENNEDY MOREIRA FREITASE - BÁRBARA MÁRCIA MARINHO SILVA - DÉBORA CAROLINE GONÇALVES CORREA - ALINE APARECIDA SILVA MARTINS - LARA VERÔNICA DE ARAÚJO LOPES, ESTE DOCUMENTO ATESTA QUE O ESTUDO PAPEL DO HPV NA GÊNESE DAS LESÕES PRÉ MALIGNAS DO COLO DO ÚTERO FOI PUBLICADO EM 2022 PELA EDITORA PASTEUR, IRATI/PR, NO LIVRO SAÚDE DA MULHER - EDIÇÃO II, ISBN 978-65-815-4926-8, [HTTPS://DOI.ORG/10.29327/564663.2-15](https://doi.org/10.29327/564663.2-15).

O livro atende a todos os requisitos solicitados pela CAPES, e.g. corpo editorial, ISBN, índice remissivo e avaliação por pares.

Agradeço suas contribuições para produção desse livro.



Dr. Guilherme Barroso L. de Freitas
Diretor Científico do Instituto de Ensino Pasteur
Editor Chefe da Editora Pasteur

Para validar o certificado acesse <https://editorapasteur.com.br/sistema/public/certification> e insira o DOI:10.29327/564663.2-15

CAPÍTULO C2:

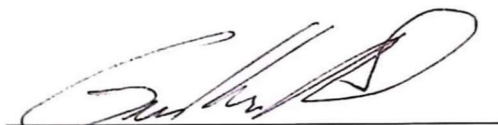
EP EDITORA
PASTEUR
www.editorapasteur.com.br

CARTA DE PUBLICAÇÃO

DÉBORA CAROLIN GONÇALVES CORRÊA - LARISSA KENNEDYMOREIRA FREITAS - BARBARA MÁRCIA MARINHO SILVA - ALINE APARECIDA SILVA MARTINS - LARA VERÔNICA ARAÚJO LOPES, ESTE DOCUMENTO ATESTA QUE O ESTUDO **BIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER CERVICAL** FOI PUBLICADO EM 2022 PELA EDITORA PASTEUR, IRATI/PR, NO LIVRO **SAÚDE DA MULHER - EDIÇÃO II**, ISBN 978-65-815-4926-8, [HTTPS://DOI.ORG/10.29327/564663.2-14](https://doi.org/10.29327/564663.2-14).

O livro atende a todos os requisitos solicitados pela CAPES, e.g. corpo editorial, ISBN, índice remissivo e avaliação por pares.

Agradeço suas contribuições para produção desse livro.



Dr. Guilherme Barroso L. de Freitas
Diretor Científico do Instituto de Ensino Pasteur
Editor Chefe da Editora Pasteur

Para validar o certificado acesse <https://editorapasteur.com.br/sistema/public/certification> e insira o DOI:10.29327/564663.2-14

CAPÍTULO C3:

EP EDITORA
PASTEUR

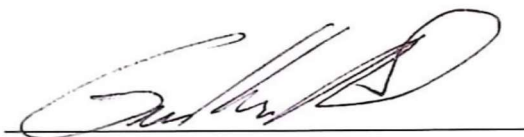
www.editorapasteur.com.br

CARTA DE PUBLICAÇÃO

BÁRBARA MÁRCIA MARINHO SILVA - DÉBORA CAROLINE GONÇALVES CORREA - LARISSA KENNEDY MOREIRA FREITAS - LARA VERONICA DE ARAÚJO LOPES - ALINE APARECIDA SILVA MARTINS, ESTE DOCUMENTO ATESTA QUE O ESTUDO **LESÕES INTRAEPITELIAL NO COLO UTERINO** FOI PUBLICADO EM 2022 PELA EDITORA PASTEUR, IRATI/PR, NO LIVRO **SAÚDE DA MULHER - EDIÇÃO II**, ISBN 978-65-815-4926-8, [HTTPS://DOI.ORG/10.29327/564663.2-11](https://doi.org/10.29327/564663.2-11).

O livro atende a todos os requisitos solicitados pela CAPES, e.g. corpo editorial, ISBN, índice remissivo e avaliação por pares.

Agreço suas contribuições para produção desse livro.



Dr. Guilherme Barroso L. de Freitas
Diretor Científico do Instituto de Ensino Pasteur
Editor Chefe da Editora Pasteur

Para validar o certificado acesse <https://editorapasteur.com.br/sistema/public/certification> e insira o DOI:10.29327/564663.2-11

ASPECTOS ETICOS

PARECER COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de Proteínas reguladoras do ciclo e de vias de Sinalização celular na patogênese do câncer cervical, e sua correlação com a infecção pelo Papilomavirus humano.

Pesquisador: ANNAMARIA RAVARA VAGO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55168020.7.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.715.546

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo retrospectivo, transversal, para analisar a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (P16 INK4a e KI-67), reguladoras da duplicação do DNA (MCM7), e envolvidas na sinalização celular (Ativinas, Inibinas, Folistatina, RAP1 e seus receptores) com o objetivo de avaliar o potencial dessas moléculas como Biomarcadores celulares de desenvolvimento do Câncer cervical e sua correlação com a infecção pelo Papilomavirus humano nos tecidos tumorais.

O câncer de colo do útero é uma doença gerada a partir de alterações no ciclo celular das células desse tecido e essas mudanças levam a um crescimento celular desordenado que não é controlado pelo organismo e pode ser causada pela infecção do Papilomavirus Humano (HPV). Essa enfermidade constituiu o terceiro tipo de tumor mais frequente na população feminina brasileira e é responsável pela morte de uma grande quantidade de mulheres por ano em todo o mundo. O carcinoma cervical, quando comparado às demais neoplasias, apresenta alto potencial de prevenção e cura, quando diagnosticado precocemente por análise morfológica de biópsia de lesões suspeitas. Porém, devido à subjetividade das análises morfológicas (variação inter observador), as taxas de resultados falso-negativo e falso-positivo têm variado bastante, tornando-se necessária a descoberta de Biomarcadores específicos que possam aumentar a especificidade e a sensibilidade de detecção de lesões cervicais com maior risco de progressão da doença e, portanto, complementar o Exame Citológico e o teste do DNA/HPV utilizado como

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha.
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.715.546

padrão conferindo-lhe maior acurácia.

Este projeto se propõe a analisar a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (P16 INK4a e Ki-67), reguladoras da duplicação do DNA (MCM7), e envolvidas na sinalização celular (Ativinas, Inibinas, Folistatina, RAP1 e seus receptores por exame de Imunohistoquímica em lâminas histológicas obtidas de 150 amostras de tecido cervical incluídas em parafina, apresentando Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) de graus I, II e III, 100 amostras parafinadas de Carcinoma cervical, e 30 amostras de tecido cervical sem alterações neoplásicas (Controles), totalizando 280 amostras. Será também analisado o status da infecção pelo Papilomavírus Humano pela detecção do HPV e Genotipagem dos tipos de HPV de alto-risco por meio da técnica de PCR convencional e Nested - PCR, além da investigação da Carga viral e do Estado físico do DNA do HPV 16 pela técnica de PCR em Tempo Real. Os dados obtidos pela detecção e Genotipagem dos HPV de alto risco serão comparados com os dados de expressão das proteínas acima descritas, envolvidas na regulação de importantes eventos celulares como proliferação, sinalização e apoptose.

A Hipótese dos pesquisadores é que exista expressão das proteínas descritas em diferentes grupos de lesão cervical, com possível expressão elevada em amostras teciduais de câncer cervical, com correlação significativa entre a expressão dessas proteínas e a infecção pelo Papilomavírus Humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo principal: Analisar a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, reguladoras da duplicação do DNA e envolvidas na sinalização celular em biópsias cervicais portadoras de graus distintos Lesões Intraepiteliais Cervicais, e a sua correlação com a presença e a persistência da infecção por HPV de alto-risco. Avaliar o potencial dessas moléculas como Biomarcadores de progressão das lesões do Câncer cervical e com a infecção pelo Papilomavírus Humano.

Objetivo secundário:

- 1) Avaliar simultaneamente a área, a distribuição e a topografia da expressão citoplasmática e nuclear das proteínas p16INK4a e Ki-67, respectivamente, em amostras cervicais de graus distintos de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC I, II, III), por meio da técnica de imunofluorescência;
- 2) Avaliar, a área e a distribuição da expressão das proteínas MCM7, Ativinas, Inibinas e Folistatina por meio da técnica de Imunohistoquímica, em amostras de NIC I, II e III, e em amostras de Carcinoma cervical de diferentes graus de diferenciação.
- 3) Identificar nas amostras de tecido cervical, a presença da infecção pelo HPV e dos tipos de HPV

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha.
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

Continuação do Parecer: 5.715.546

de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58) por meio da reação de PCR em amostras de DNA extraídas das amostras cervicais.

4) Avaliar a persistência da infecção pelo HPV 16 através da análise da integração do DNA viral nas células do hospedeiro por meio da técnica de Híbridização in situ e PCR em tempo real.

5) Avaliar uma possível correlação existente entre (i) a expressão das proteínas P16INK4a, Ki-67, MCM7, Ativinas, Inibinas e Folistatina, (ii) o grau de lesão cervical e o grau de diferenciação do Câncer cervical, (iii) a presença e a persistência da infecção viral e de tipos de alto risco, com o objetivo de determinar se a expressão dessas moléculas poderá ser utilizada como Biomarcadores de fator de progressão, de prognóstico e de proliferação das alterações celulares investigadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos da pesquisa são os relacionados apenas ao vazamento de dados dos participantes, entretanto os pesquisadores se comprometem a manter sigilo sobre a identidade dos pacientes participantes da pesquisa, que se limitará à utilização das amostras coletadas para fins exclusivamente científicos. O material de biópsia a ser examinado já foi coletado previamente, na ocasião da abordagem propedêutica das pacientes.

Benefícios: A detecção de biomarcadores do câncer cervical e sua correlação com a infecção pelo Papilomavirus humano podem contribuir para maior sensibilidade e eficiência de Métodos diagnósticos durante os procedimentos de triagem, acompanhamento e tratamento de mulheres portadoras de Lesões cervicais que poderão evoluir ao Câncer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para as áreas de saúde pública, saúde da mulher e oncologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) CARTA-REPOSTA AO PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP, número 5.329.587
- 2) Folha de rosto preenchida e assinada.
- 3) Apresentadas as Informações básicas do projeto
- 4) Aprovação da Departamento de Morfologia - ICB UFMG incluída
- 5) Instrumentos de coleta de dados apresentados
- 6) Projeto completo
- 7) Anuência do laboratório Dr. Tafuri para participação no projeto

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.715.546

8) Termo de constituição de biorrepositório

9) TCLE como carta convite, resguardando a confidencialidade dos dados, o anonimato, o direito à recusa, e desistência de participação a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Foi informado sobre o objetivo e a metodologia. Os procedimentos para a guarda de dados estão claros no TCLE. Esclarece que não haverá qualquer forma de pagamento. Dados do pesquisador e do COEP relatados.

Recomendações:

Recomenda-se que os critérios de inclusão e exclusão sejam explicitados claramente, embora estejam implícitos no texto da brochura do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Segue lista das pendências apresentadas no Parecer número 5.329.587

PENDÊNCIA 1: "Incluir no projeto os critérios de inclusão e exclusão de participantes".

PENDÊNCIA RESOLVIDA. Segundo a carta resposta "No presente Projeto os Critérios de inclusão e de exclusão das participantes não foram alterados".

Eles estão implícitos no texto da brochura.

PENDÊNCIA 2: "Adequar texto do TCLE. EXCLUIR o texto referente aos riscos da biópsia. As biópsias já foram realizadas e não fazem parte desta pesquisa. Nesta pesquisa só será analisado material que está armazenado em laboratório. Não serão realizadas novas biópsias".

PENDÊNCIA RESOLVIDA. O texto foi adequado.

PENDÊNCIA 3: "Incluir no projeto informações de quando e como serão colhidas as assinaturas no TCLE após o contato com as pacientes".

PENDÊNCIA RESOLVIDA. As referidas informações foram incluídas no Projeto.

PENDÊNCIA 4: "ESCLARECER qual o procedimento será tomado quando as pacientes (potenciais participantes) não puderem ser contactadas, independentemente do motivo, para solicitação do TCLE. Ressalta-se que, caso haja a possibilidade de não conseguir entrar em contato com o participante para ele(a) anuir o uso do material assinando TCLE, a proponente deve informar esse aspecto no protocolo. Por exemplo, em caso de falecimento ou participante não foi encontrado no contato (após tentativas), pode-se solicitar a dispensa condicional de TCLE para esses

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 - 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha.
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.715.546

participantes, sendo necessário incluir TCUD para garantia de sigilo”.

PENDÊNCIA RESOLVIDA. Um novo subitem foi acrescentado ao Projeto (brochura) do Pesquisador na Seção 4. Materiais e Métodos – item 1. População Estudada – Caracterização das Amostras: “1.1 Procedimento de acesso às Participantes do Estudo e Coleta das Assinaturas no TCLE” no qual são apresentadas tais informações. Gentileza consultar a página 22 do Projeto (brochura) do Pesquisador. Tais modificações também foram acrescentadas no Protocolo de Pesquisa da Plataforma Brasil. Registra-se também a inclusão do TCUD – Termo de Compromisso de Utilização de Dados da Instituição Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri como novo documento do Projeto na Plataforma Brasil.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1515270.pdf | 28/09/2022 17:25:32 | | Aceito |
| Outros | carta_coep_proj_Tafuri_Dilig.pdf | 08/07/2022 16:27:04 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Outros | tcud_tafuri_2022.pdf | 08/07/2022 16:25:46 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Brochura Pesquisa | brochura_proj_tafuri_Dilig.pdf | 08/07/2022 16:22:12 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle_proj_tafuri_Dilig.pdf | 08/07/2022 16:21:44 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Outros | carta_coep_projeto_tafuri.pdf | 18/01/2022 12:13:00 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | brochura_proj_tafuri_rev.pdf | 18/01/2022 12:12:39 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.715.546

| | | | | |
|---|--------------------------|------------------------|--------------------------|--------|
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle_proj_tafuri_rev.pdf | 18/01/2022 12:11:50 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Folha de Rosto | folha_rosto_tafuri.pdf | 02/03/2020 15:35:08 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Parecer_CD_Tafuri.pdf | 21/02/2020 14:56:29 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Declaração de concordância | Termo_Anuenc_Tafuri.pdf | 21/02/2020 14:54:51 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Termo_BioRep_Tafuri.pdf | 21/02/2020 14:54:02 | ANNAMARIA RAVARA VAGO | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Outubro de 2022

Assinado por:
Crissia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 - 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha.
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS
RECENTES

CO-ORIENTAÇÃO EM PROJETO DE EXTENSÃO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **LARA VERÔNICA DE ARAÚJO LOPES**, Doutoranda do Programa de Pós - graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do ICB-UFMG, atuou como **Co- Orientadora** da aluna **Alice Maria de Oliveira Reis** do curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da UFMG, MATRÍCULA **2018113580**, **Bolsista** do Programa de Bolsas de Extensão da UFMG – PROEX, no período de 1º de Abril de 2021 até 02 de Abril de 2022, cumprindo a carga horária de 10 horas semanais. O Projeto de Extensão sediado no Departamento de Morfologia do ICB-UFMG no qual a Doutoranda atuou como Co-Orientadora é intitulado **“Museu de Ciências Morfológicas: Ciência, Educação e Promoção Social”**, e está regularmente registrado no SIEX-UFMG (Sistema de Informações da Extensão) sob o número 004833.

Belo Horizonte, 06 de Junho de 2022.



Profa. Annamaria Ravara Vago

**Chefe *Pro-Tempore* do Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Portaria N° 4.035 de 31/07/2020.**

ANAIS DO CONGRESSO IPVC 2021: 34th International Papillomavirus Conference **Virtual Conference | November 15 -19 2021- PRIMEIRA AUTORA**

13-15 NOVEMBER, 2021

P063 / #957

E-POSTER VIEWING TOPIC: AS02: Clinical Research / AS2.01 HPV Diagnostics and Biomarkers for Early Detection and Prognosis of HPV-related Cancers

EVALUATION OF MCM7 AND ALPHA-INIBIN PROTEINS AS VALUABLE BIOMARKERS FOR THE CERVICAL CANCER PROGNOSIS

L.V.D.A. Lopes¹, L. Pelxoto¹, V. Payano¹, C. Buzzelin², J. Oliveira³, M. Buzzelin⁴, E. Blotse⁵, A. Vago¹
¹Universidade Federal De Minas Gerais, Laboratory Of Molecular Pathogenesis, Department Of Morphology, Institute Of Biological Sciences, Belo Horizonte, Brazil, ²Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Laboratory Of Breast Pathology, Department Of Anatomy And Pathology, Faculty Of Medicine, Belo Horizonte, Brazil, ³FIOCRUIZ, Renée Rachou Research Institute, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Santa Casa de Misericórdia Hospital, Minas Gerais state, Brazil, ⁵Laboratory Of Histopathology Diagnosis, Belo Horizonte, Brazil

Introduction: One of the most important challenges for the oncology medicine is to predict the outcome of cancer cases in variable types of tumor. In this context, the development of cell markers that could evaluate the prognostic of cancer patients is of extreme relevance for the planning of effective follow-up and management actions. In this study, the usefulness of Minichromosome maintenance protein7 (MCM7) and alpha-inibin immuno-labeling as prognostic biomarkers of cervical cancer was evaluated by Immunohistochemistry (IHC) technique. MCM7 is part of a complex responsible for licensing DNA replication, while alpha-inibin is a member of the TGF-beta family involved in cell signaling, differentiation, apoptosis and cell-migration.

Methods: In this retrospective-study 29 cervical-tissue samples were obtained by total-sterectomy from women with invasive Squamous cell carcinoma (SCC). Based on the FIGO criteria, tumor-samples were histopathologically classified as Moderately-differentiated (MD) and Poorly-differentiated (PD)-SCC, which are associated with a better and a worse prognosis, respectively

Results: HPV-DNA was detected by Nested-PCR in 42% of SCC. The MCM7 immuno-labeling was only observed in nuclei of atypical epithelial-cancer cells, whilst alpha-inibin exhibited nuclear and cytoplasmic labeling patterns. Additionally, two distinct cancer-cell populations were characterized: the type-I, with variable nuclei-shape and size, and abundant cytoplasm, and type-II, exhibiting morphological aspects characteristic of immature cells, such as smaller and rounded nuclei and scarce cytoplasm (Figure 1). In moderately-differentiated cancer tissue-samples, a significant intensity of MCM7 and alpha-inibin immuno-labeling could be observed in the nucleus and the cytoplasm of mature type I subpopulation, respectively (p<0,0001)

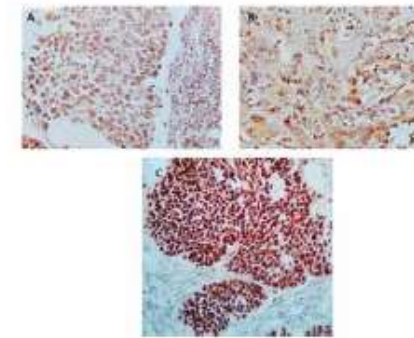


FIGURA 1-LEGENDA: MCM7 (1C) e alpha-inibin (1A, 1B)

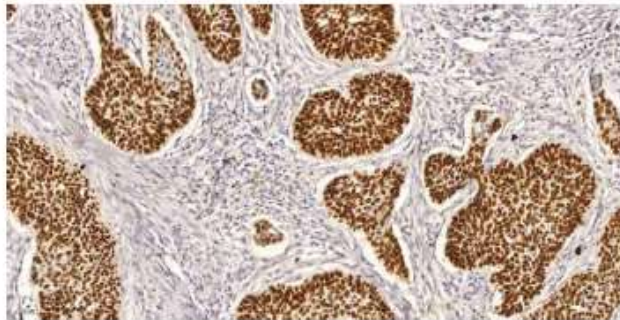
Conclusions: In SCC tissue-samples, MCM7 demonstrated to be a powerful proliferation marker, able to detect cell-populations under proliferative-events, while alpha-inibin was able to identify cancer-cells subpopulations possibly more committed with cell-differentiation pathways.

ANAIS DO CONGRESSO IPVC 2021: 34th International Papillomavirus Conference Virtual Conference | November 15 -19 2021- SECUNDA AUTORA

13-15 NOVEMBER, 2021

Table 2: HR-HPV-positivity, sensitivity and specificity for CIN2+ detection for CIN2+ detection of QT assay with different cut-off values.

| Cut-off value | Viral load 10 copies/10.000 cells | Viral load 50 copies/10.000 cells | Viral load 100 copies/10.000 cells | Viral load 500 copies/10.000 cells | Viral load 1000 copies/10.000 cells | Viral load 10000 copies/10.000 cells |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| HR-HPV-positivity | 66.5% | 63.0% | 61.5% | 55.5% | 50.5% | 38.0% |
| Sensitivity | 93.5% | 91.3% | 90.2% | 83.5% | 76.1% | 59.8% |
| Specificity | 56.5% | 61.1% | 63.0% | 67.6% | 71.3% | 80.6% |



Conclusions: Overall OncoPredict reflex assay showed a good performance with good relative sensitivity and specificity compared to the previously validated assay. The choice of cut-off values allowing a high SCR sensitivity combined with a higher QT specificity could allow to improve identification of women at higher risk of disease.

P062 / #949

E-POSTER VIEWING TOPIC: AS02. Clinical Research / AS02.01 HPV Diagnostics and Biomarkers for Early Detection and Prognosis of HPV-related Cancers

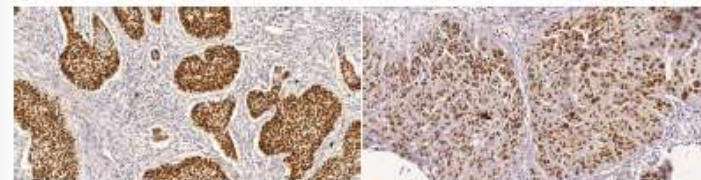
MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN (MCM)-7 IMMUNOLABELING IN CERVICAL CANCER DIFFERENTIATION AND ITS CORRELATION WITH HPV

L. Peixoto¹, L.V.D.A. Lopes¹, B. Almeida¹, V. Pathano¹, K. Silva¹, A. Tafuri¹, C. Buzzellin¹, E. Paulino², E. Bloise¹, A. Vago¹
¹Universidade Federal De Minas Gerais, Laboratory Of Molecular Pathogenesis, Department Of Morphology, Institute Of Biological Sciences, Belo Horizonte, Brazil, ²Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Laboratory Of Breast Pathology, Department Of Anatomy And Pathology, Faculty Of Medicine, Belo Horizonte, Brazil

Introduction: Cervical cancer (CC) is considered one of the most important causes of cancer deaths in the female population. Minichromosome maintenance proteins (MCMs), including MCM7 are essential for DNA replication and cell cycle control. These proteins (MCM2-7) are used in several studies as proliferation and prognostic biomarkers in different types of carcinomas. We hypothesize that MCM7 protein has potency to be evaluated as a prognostic biomarker for CC, and whose cervical tissues-immunolabeling would be related to the presence of high-risk human papillomaviruses (HR-HPVs).

Methods: Forty-three CC and 15 cervixitis paraffin-embedded tissues (PETs) were obtained from a large histopathology-laboratory and evaluated concerning the tissue-immunolabeling for MCM7 by using Immunohistochemistry and a morphometric-based analysis (Figure 1). Analysis of HPV-DNA and HPV16-DNA presence was performed using Nested-PCR and Hem-nested PCR.

Results: Presence of HPV-DNA was observed in 70,68% of the cervical tissue-samples, and 41,37% were positive for HPV16-DNA. In normal epithelium, MCM7-immunolabeling was observed only in the proliferative layers, while a strong MCM7 nuclear labeling was verified in tumor cells/nests located in the stromal. Regarding the cell-density (cellularity) parameter, CC samples showed a higher number of MCM7-labeled cells when compared to controls. Poorly (PD-SCC) and moderately (MD-SCC) differentiated CC samples showed a positive correlation between the number of MCM7-positive cells, and the number of cancer cells determined in the entire tumor-areas. Concerning the differentiation tumor grading, PD-SCC is a tumor with higher proliferation-rates and more aggressive behavior than MD-SCC cancer-type.



Immuno-labelling of MCM7 protein in representative samples of Poorly differentiated Squamous Cell Carcinoma (A), and Moderately differentiated (B)

Conclusions: Our study points to the potential use of MCM7 as a biomarker of severity grading for cervical cancer that could be used to discriminate different histological grades of positive HPV-DNA and HPV16-DNA CC tissues.

Resumo extendido – V Congresso de extensão da AUGM



V CONGRESSO DE EXTENSÃO DA AUGM

UNIVERSIDADE E SOCIEDADE
CONECTADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO
REGIONAL SUSTENTÁVEL



A divulgação de conteúdo científico em mídias sociais como ferramenta informativa sobre a Saúde da mulher, com foco no carcinoma de colo uterino¹

Annamaria VAGO²

Alice REIS³

Nycolle SOUZA⁴

Larissa PEIXOTO⁵

Lara LOPES⁶

Gleydes Gambogi PARREIRA⁷

Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil

Resumo

O Carcinoma do Colo Uterino (CCU) é considerado uma das maiores causas de morte por câncer na população feminina, estando intimamente associado à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Devido à sua alta prevalência, torna-se necessário o desenvolvimento de projetos baseados na divulgação de informações, de forma bastante acessível à população, sobre temas relevantes, relacionados ao controle e à prevenção do câncer, com foco principal direcionado às lesões associadas ao HPV. Dessa forma, postagens informativas mensais vêm sendo realizadas no *Instagram* do Museu de Ciências Morfológicas (MCM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o objetivo de transmitir informações de alta qualidade científica, para a população em geral, e também às escolas de ensino básico e médio atendidas pela equipe do Museu.

Palavras-chave: HPV; CCU; Divulgação Científica; Museu de Ciências Morfológicas da UFMG; *Instagram*.

Introdução

O Carcinoma de Colo Uterino (CCU) é responsável anualmente pela morte de muitas mulheres em todo o mundo, sendo que acima de 85% delas ocorrem em regiões com baixo poder socioeconômico (IARC, 2019; WHO, 2019). No Brasil, é o terceiro

¹ Trabalho apresentado no Eixo de **Comunicações e Redes** do V Congresso de Extensão da AUGM.

² Professora da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia, ICB, email: annarvago@gmail.com

³ Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, bolsistas da PROEX-UFMG, vinculadas ao Museu de Ciências Morfológicas da UFMG, email: alicolreis@gmail.com

⁴ Estudante do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, bolsistas da PROEX-UFMG, vinculadas ao Museu de Ciências Morfológicas da UFMG, email: nycolle.deus@gmail.com

⁵ Mestre em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia, ICB, email: larissarodrigues03@gmail.com

⁶ Estudante de doutorado do Curso de Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia, ICB, email: laraveronica@gmail.com

⁷ Coordenadora do Museu de Ciências Morfológicas da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia, ICB, email: ggambogi@icb.ufmg.br



V CONGRESSO DE EXTENSÃO DA AUGM

UNIVERSIDADE E SOCIEDADE
CONECTADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO
REGIONAL SUSTENTÁVEL



tipo de câncer mais frequente na população feminina, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no país (INCA, 2020).

Diversos estudos epidemiológicos e moleculares desenvolvidos nos últimos 40 anos demonstraram que a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico está intimamente relacionado com a patologia do câncer cervical (zur HAUSEN, 1977; MUÑOZ *et al.*, 2004; CASTLE *et al.*, 2005).

Em relação às estratégias de prevenção das lesões precursoras do CCU e da infecção do HPV, destaca-se o teste de rastreamento, através do exame de Papanicolaou, além da Campanha Nacional de Vacinação contra o HPV, disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS). Entretanto, considerando-se que ainda as taxas de incidência e de mortalidade do CCU são elevadas, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias de Saúde que levem também à informação para a população feminina, de forma acessível, sobre os importantes aspectos relacionados ao controle e à prevenção do CCU. (RAMA *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2013).

Delineou-se assim o presente Projeto de Extensão, que está sendo desenvolvido por duas alunas do 6º período do curso de Ciências Biológicas da UFMG, Alice Reis e Nycolle Souza que são bolsistas da PROEX-UFMG e vinculadas ao Museu de Ciências Morfológicas (MCM) da UFMG.

O Museu é aberto à comunidade e um de seus principais objetivos é ampliar e difundir o conhecimento através de diversas ações desenvolvidas por sua equipe. Em seus programas de pesquisa, ações educativas, divulgação científica e projetos sociais, o Museu atua junto ao ensino fundamental e médio, com o objetivo de motivar a ressignificação do ensino de ciências e participa da formação de novos educadores em ciências e de profissionais de saúde, nos níveis de graduação e pós-graduação.

Objetivo Geral

Promover ações que visem a divulgação de informações sobre temas relevantes baseados em publicações científicas, relacionados à epidemiologia, patologia, fatores de risco, estratégias de prevenção e de controle do câncer, em geral, mas especialmente das neoplasias que atingem a população feminina, (i) através da elaboração de texto acessível e material gráfico sobre os temas relacionados ao câncer, que serão utilizados



V CONGRESSO DE EXTENSÃO DA AUGM

UNIVERSIDADE E SOCIEDADE
CONECTADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO
REGIONAL SUSTENTÁVEL



para a montagem de “*posts*” informativos veiculados por meio digital no *Instagram*; promover a disseminação dos conteúdos por meio de reuniões digitais, com as Escolas públicas que já desenvolvem trabalhos e parcerias com o MCM da UFMG, visando levar a informação sobre os métodos de controle e prevenção do CCU e da infecção pelo HPV.

Materiais e Métodos

Para a divulgação científica dos temas por meio dos *posts* na página do *Instagram* do Museu de Ciências Morfológicas da UFMG (<https://www.instagram.com/museudecienciasmorfológicas/>) é realizada uma pesquisa bibliográfica sobre a temática do câncer através de sites como *Google acadêmico*, *Pubmed*, *INCA*, entre outros. Após a coleta de dados, realizamos reuniões periódicas para discutir as informações obtidas e organizar a escrita e a parte gráfica dos posts.

Todos os posts são elaborados através do CANVA (<https://www.canva.com/>), uma plataforma de design gráfico com várias opções gratuitas e algumas pagas, disponível na versão *online* e para *download* em iOS e Android. Nele é adicionado o texto e as imagens que são retiradas do próprio CANVA ou dos artigos utilizados como referência, através do *upload* realizado na plataforma. Após a montagem do *post* que será publicado, uma revisão final é feita em grupo para a aprovação de todo o material que será postado.

Resultados

Até o presente momento, foram feitos dois *posts* no *Instagram* do MCM, sendo o primeiro uma abordagem geral do CCU e sua relação com o vírus-HPV, intitulado “HPV e o Câncer de Colo de Útero”, e o segundo, um panorama geral sobre a incidência global do câncer, intitulado “Incidência Global do Câncer”. Além desses, está planejado para agosto um *post* intitulado “HPV e o Câncer de Pulmão”, para abordar sobre a atuação do vírus no corpo humano e suas diferentes formas de transmissão. Futuras postagens irão abordar questões como os Fatores de risco do Câncer cervical, Vacinas como forma de prevenção do vírus, diferenças do exame preventivo pela Citologia convencional e Citologia em meio líquido. Além disso, no



V CONGRESSO DE EXTENSÃO DA AUGM

UNIVERSIDADE E SOCIEDADE
CONECTADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO
REGIONAL SUSTENTÁVEL



UFMS



mês de outubro pretendemos fazer um *post* relacionado a estratégias de cuidado às mulheres portadoras de Câncer de mama, por ser o mês de conscientização sobre o assunto.

Além da divulgação realizada através das redes sociais, atualmente nosso grupo está organizando uma ação a ser desenvolvida no 2º semestre de 2021 com algumas Escolas Públicas parceiras com o objetivo de levar informações com linguagem fácil e de forma didática sobre os métodos de controle e prevenção do CCU e da infecção pelo HPV.



Figura 1: Imagens das postagens realizadas no *Instagram* do Museu de Ciências Morfológicas da UFMG de maio a julho de 2021.

Conclusão

Projetos de extensão direcionados à divulgação de conteúdo científico, com o objetivo de levar informação sobre temas associados a diversos tipos de câncer e lesões que afetam a população feminina, mas especialmente daqueles associados à infecção pelo HPV são de extrema importância. As postagens realizadas na página do *Instagram*



V CONGRESSO DE EXTENSÃO DA AUGM

UNIVERSIDADE E SOCIEDADE
CONECTADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO
REGIONAL SUSTENTÁVEL



do Museu de Ciências Morfológicas da UFMG têm levado conhecimento à população de modo geral e a grupos de crianças e adolescentes, alunos do Ensino fundamental e médio de escolas situadas em Belo Horizonte, cumprindo assim um papel importante das Universidades Federais, relacionado à prestação de serviço a comunidade, promovendo interação entre a Universidade e a Sociedade.

Referências Bibliográficas

CASTLE, P.E.; SCHIFFMAN, M.; WHEELER, C.M.; SOLOMON, D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol.* 113 (2009), pp. 18-25.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acesso em 09 de maio de 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Cancer Today. Disponível em: Data source: GLOBOCAN 2018. Acesso em 09 de maio 2021.

MUÑOZ, N.; KJAER, S.K.; SIGURDSSON, K.; IVERSEN, O.E.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C.M.; PEREZ, G.; ET AL. HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst.* v. 102, p. 325–339, 2010;. doi: 10.1093/jnci/djp534. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Human papillomavirus (HPV). Disponível em: <<https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/>>. Acesso em 07 de agosto de 2021.

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

